

Avokadonun (*Persea americana*) *Caenorhabditis elegans* Termotoleransı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the Effects of Avokado (*Persea americana*) on Thermotolerance of *Caenorhabditis elegans*

Nazmi SAVAŞ¹, Serdal ÖĞÜT¹, Abdullah OLGUN²,

Ayşegül Köroğlu GÜVENÇ³

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Aydın, Türkiye

²İstinye Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

³Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Yaşlanma neredeyse tüm organizmalar için kaçınılmaz bir biyolojik süreçtir. Yaşlandıkça, kronik hastalıklara (obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, Alzheimer vb.) yakalanma riski de artmaktadır. Bu nedenle yaşlanma mekanizmaları ve yaşam süresini etkileyen girişimler üzerinde yapılan araştırmalar, özellikle yaşlı nüfusun oranının belirgin şekilde arttığı günümüzde daha da önem kazanmıştır. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) kısa yaşam süresi, kolay idamesi, ekonomik oluşu vb. nedenlerle yaşlanma araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. Canlıların sıcak gibi streslere dayanıklılığını artıran girişimlerin yaşam süresi üzerinde de genellikle olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Avokado (*Persea americana*) meyvesi fonksiyonel gıda olarak yaygın bir şekilde tüketilmektedir.

Yöntem: Bu çalışmada, avokado mezokarp ekstresinin 75 ile 150 µg/mL final konsantrasyonlarında *C. elegans*'ta termotolerans üzerine etkisi incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmada 75 µg/mL konsantrasyonda en yüksek sağ kalım gözlenmiş olmakla birlikte, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: Gelecekte yapılacak araştırmalarda, bu çalışmada test edilen dozların altındaki ve üstündeki dozların test edilmesi önerilir.

Anahtar Kelimeler: Avokado, *Caenorhabditis elegans*, Termotolerans, Yaşlanma.

ABSTRACT

Objective: Aging is an inevitable biological process for almost all organisms. As you get older, the risk of developing chronic diseases (obesity, diabetes, cardiovascular diseases, cancer, Alzheimer's, etc.) increases. Therefore, studies on mechanisms of aging and interventions affecting life span have been more important nowadays; since, especially, the proportion of elderly population has increased significantly. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a widely used model organism in aging research because of its short life span, easy maintenance, cost-effectiveness etc. It is known that interventions that increase the resistance of living organisms to stresses such as high temperature have generally a positive effect on their life span. Avocado (*Persea americana*) fruit is widely consumed as functional food.

Methods: In this study, the effect of avocado mesocarp extract on thermotolerance in *C. elegans* was tested at 75 to 150 µg/mL final concentrations.

Results: Although the highest survival was observed at 75 µg/mL, the difference between the groups was not statistically significant.

Conclusion: In future research, it is recommended to test doses above and below the doses tested in this study.

Key words: Avocado, *Caenorhabditis elegans*, Thermotolerance, Aging.

Sorumlu Yazar: Serdal ÖĞÜT

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Aydın, Türkiye

serdal.ogut@adu.edu.tr

*Bu makale, Nazmi SAVAŞ'ın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Geliş Tarihi: 20.07.2019 – Kabul Tarihi: 07.11.2019

1. GİRİŞ

Caenorhabditis elegans (*C.elegans*), yaklaşık 1 mm uzunluğunda mikroskopik bir nematod olup, yaşlanma genetiği ve tıp alanındaki çalışmalarda kullanılan; doğada toprakta, ağaç diplerinde serbest olarak yaşayan, şeffaf görümlü, patojen olmayan bir model organizmadır. Hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyete sahiptir (1,2). Laboratuvar koşullarında N₂ yabani tip *C. elegans* yaklaşık 3 günlük bir yaşam döngüsü sonunda yetişkin hale gelmekte, 20°C’de ortalama 18-20 gün yaşamaktadır. Bu nematod, diğer canlı organizmalarda da gözlenen bir dizi yaşa bağlı değişiklik göstermektedir (3). Çeşitli bilimsel araştırmalarda kullanılmasının en önemli sebeplerinden biri de, genlerinin insan genlerine çok (yaklaşık %83 civarı) benzemesidir (4,5). Ayrıca apoptoz (programlı hücre ölümü) dahil birçok biyolojik sürecin moleküler temellerinin keşfi de *C. elegans* kullanılması sayesinde mümkün olabilmektedir (6).

Persea americana (avokado), kapalı tohumlular sınıfından defnegiller familyasına ait, yaprak dökken bir ağaçtır. Meyvesi gıda olarak tüketilmektedir. Dünya üzerinde birçok ülkede yetişebilen, şekil olarak farklılık gösteren, her dem yeşil subtropik bir ağaçtır. Dünyada; Meksika, Orta ve Güney Amerika’da ortaya çıkmış ve ilk olarak da Meksika’da M.Ö. 500’lerin başlarında yetiştirilmiştir. Türkiye’de de Akdeniz Bölgesi ve Doğu Karadeniz Bölgesi’nde yetiştirilmektedir (7-9).

Avokadonun özellikle içerdiği yağın da etkisiyle kendine has bir tadı ve yüksek bir besin değeri bulunmaktadır. Çeşitli vitaminler (A, B, C, D, E, K) ile minerallerden (Fe, Mg, P, S, Cu gibi) zengindir. Yaklaşık %80 oranında su ve çözünebilir diyet lifi içerdiği için orta derecede enerji yoğunluğuna sahip (1.7 kcal/g) bir meyvesi vardır. Aynı zamanda yüksek yağ içeriğine (%7-25) sahiptir. Yaklaşık %15 tekli doymamış, %25 doymamış yağ asitlerini içerir. Bu da sıklıkla avokado ile birlikte tüketilen salatalar ve soslardan karotenoidlerin alınımını ve bu maddelerin vücuttaki biyoyararlanımını arttırmaya da yardımcı olur. Diğer birçok meyvelerin aksine şeker içeriği düşüktür (10,11).

Sağlık üzerine yararlı etkileri uzun yıllardır bilinen ve bu yararları son zamanlarda çeşitli bilimsel çalışmalarla da desteklenen fonksiyonel besinler, canlıların yaşam süresi üzerinde de olumlu etkiler göstermektedir (12). Organizmanın strese dayanıklılığını artmasının yaşam süresini de artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle strese dayanıklılığı artıran girişimlerin yaşam süresine de olumlu etkisinin olması beklenebilir (13). Bu çalışmada avokadodan elde edilen fonksiyonel bitki ekstresinin, *C. elegans* model organizmasının termotoleransı (sıcak stresine karşı dayanıklılık) üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Materyal

Çalışmada, N₂ yabani tip *C. elegans* kullanılmış olup, Minnesota Üniversitesi’ne bağlı *Caenorhabditis* Genetik Merkezi’nden (CGC) temin edilmiştir. Termotolerans çalışmalarında İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü laboratuvarlarının standart ekipman ve sarf malzemeleri kullanılmıştır. Avokado ekstreleri lokal marketten satın alınan meyvelerden Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı’nda hazırlanmıştır.

Deney Yöntemi

Avokado ekstresinin hazırlanması

İki adet olgun avokado yerel marketten alındı. En dış (ekzokarp) kısmı soyuldu, içindeki mezokarp kısmı ve tohum (seed) kısmı da olmak üzere üç kısma ayrıldı. Mezokarp kısmı püre haline getirildi. 60°C fırında 2 gün süreyle kurutuldu. 100 mL n-hekzan ile 50°C sıcaklıkta, 8 saat süreyle 2 gün hareketli ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstre iki gün sonunda sıvı ekstresi ile birleştirilip 40°C sıcaklıkta rotavaporda uçuruldu.

Termotolerans çalışması

C. elegans idamesi standart protokole göre yapılmıştır. Yeni nesil oluşumunu önlemek için 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FudR) içeren besiyeri (NGM: Nematode Growth Medium) kullanılmıştır. Avokado mezokarp ekstresi, E. coli OP50 bakteri solüsyonuna final konsantrasyon 75 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde eklenerek uygulanmıştır. Çalışma senkronize solucanlar kullanılarak yapılmıştır. Termotolerans çalışması, solucanlar 35°C sıcaklıktaki inkübatörde 6 saat bekletilerek yapılmıştır. Zira ön optimizasyon çalışmalarında, laboratuvar koşullarımızda ve bu sıcaklıkta hayvanların %50'sinin 6 saatte öldüğü tespit edilmiştir. Bu süre sonunda mikroskop altında platin telle dokunulduğunda hareket etmeyen solucanlar ölü kabul edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Deney sonuçlarından elde edilen verilerde, kontrol ve deney gruplarına ait sonuçlar fark testleri (t-Testi ve ANOVA) ile karşılaştırılmış olup, $p < 0,05$ değeri de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizlerinde, IBM SPSS Statistic programı 16.0 sürümü kullanılmıştır. İlgili grafikler ise, Microsoft Office Excel 2010 programında çizilmiştir.

3. BULGULAR

Avokado bitkisinden elde edilen mezokarp ekstresinin C. elegans termotoleransı üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik yaptığımız araştırmanın ham verileri Tablo-1'de sunulmuştur.

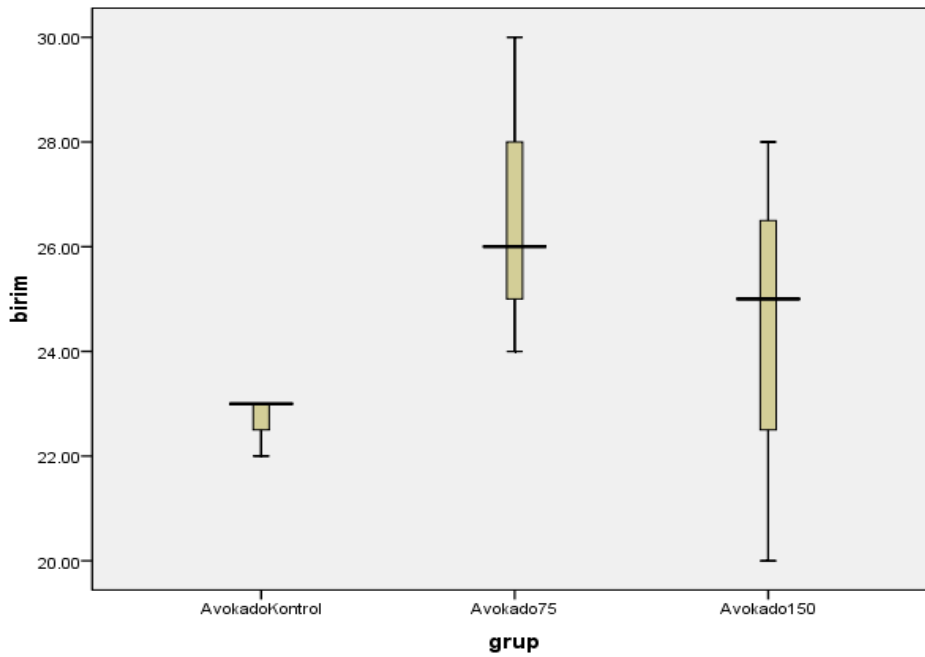
Tablo 1. Avokado ekstresinin C.elegans termotoleransı üzerindeki etkisine yönelik araştırmadan elde edilen ham veriler

Sıra	Deney grubu	Canlı	Ölü	Kayıp
1	Kontrol 1	23	17	0
2	Kontrol 2	22	18	0
3	Kontrol 3	23	17	0
4	75 µg/mL	24	16	0
5	75 µg/mL	30	10	0
6	75 µg/mL	26	14	0
7	150 µg/mM	28	12	0
8	150 µg/mL	25	15	0
9	150 µg/mL	20	20	0

Farklı konsantrasyonlardaki avokado ekstresinin, *C. elegans* termotoleransına etkisini belirlemek için, deney gruplarındaki hayatta kalan solucanların ortalamaları karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere dair tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçları Tablo 2 ve Şekil 1’de sunulmuştur.

Tablo 2. Avokado ekstresinin *C. elegans* termotoleransı üzerine etkisi ile ilgili tanımlayıcı veriler (N: deney sayısı)

	N	Ortalama	Standard sapma	Standard hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt sınır	Üst sınır		
Kontrol	3	22.6667	0.57735	0.33333	21.2324	24.1009	22	23
Avokado 75 µg/mL	3	26.6667	3.05505	1.76383	19.0775	34.2558	24	30
Avokado 150 µg/mL	3	24.3333	4.04145	2.33333	14.2938	34.3729	20	28
Toplam	9	24.5556	3.08671	1.0289	22.1829	26.9282	20	30



Şekil 1. Avokado ekstresinin *C. elegans* termotoleransı üzerine etkisini belirlemeye yönelik analiz sonuçları (Yatay çubuklar ve soldaki rakamlar 6 saatlik muamele sonunda hayatta kalan *C. elegans* sayısını ifade etmektedir. Sağdaki rakamlar grup ortalamalarını göstermektedir).

Varyans homojenitesi ve verilerin dağılımıyla ilgili normalite test sonuçları elde edildikten ve tanımlayıcı veriler değerlendirildikten sonra, avokado bitki ekstresinin konsantrasyonlarındaki değişim ile *C. elegans* termotolerans potansiyelleri arasındaki ortalamaları karşılaştırmak için Anova analizine geçilmiştir (Tablo 3).

Tek yönlü ANOVA testinde elde edilen "p" değeri 0.05 güven değerinden büyük olduğu için (0.318>0.05) tek yönlü varyans analizi için kurduğumuz H0 hipotezi kabul edilmiştir. Yani %95 güvenle, grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık yoktur sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla bu araştırmada avokado ekstresinin *C. elegans* termotoleransına etki etmediği anlaşılmıştır.

Tablo 3. Avokado ANOVA testi sonuçları.

ANOVA					
	Karelerin toplamı	df	Ortalama Kare	F	p
Gruplar arası	24.222	2	12.111	1.397	0.318
Grup içi	52	6	8.667		
Toplam	76.222	8			

Normalite testinde Shapiro-Wilk p değerleri avokado ekstresinin 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla 0.657 ve 0.726 bulunmuş olup 0.05'ten büyük olarak tespit edilmiştir. Sadece kontrol grubu için Shapiro-Wilk p değeri 0.000 elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre Avokado ekstresinin *C. elegans* termotoleransı üzerine etkisini belirlemek için yaptığımız deneylere ait verilerin normal bir dağılıma sahip olduğu tespit edilmiştir.

C. elegans termotoleransı üzerine etki etme açısından gruplar arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için uygulanan diğer test t-testidir. T-testi sonuçlarına bakıldığında Avokado-Kontrol grubu ile Avokado-75 grupları arasında p değeri 0.090 ($p>0.05$), Avokado-Kontrol grubu ile Avokado-150 grupları arasında p değeri 0.519 ($p>0.05$), Avokado-75 grubu ile Avokado-150 grupları arasında sigma değeri 0.470 ($p>0.05$) olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi t-testinde yapılan bu ikili karşılaştırmalarda da, p değerinde 0.05'ten küçük olan bir değer tespit edilmemiştir.

4. TARTIŞMA

Termotolerans, canlılarda sıcak stresine karşı geliştirilen dayanıklılıktır (direnç). Strese karşı dayanıklılık arttıkça, yaşlanma gecikmekte ve normal yaşam süresi de uzamaktadır. Antioksidan bileşikler çeşitli mekanizmaların da etkisiyle sıcak stresine karşı bir tür direnç sağlayıp, yaşlanmayı geciktirebilmekte ve dolayısıyla da canlıların yaşam süresi artmaktadır (13). Bu yapılan çalışmada da, çeşitli güçlü antioksidan aktiviteleri nedeniyle avokado bitkilerinin farklı konsantrasyonlarının, termotolerans yani, yaşam süresi üzerindeki etkilerinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Avokadonun antioksidan aktivitesi ise, farklı kısımlarda çeşitli farklılıklar göstermektedir. DPPH testi kullanılarak yapılan bir çalışmada, antioksidan kapasite; yaprak> kabuk> yağı> posası şeklinde bulunmuştur. Antioksidan aktivite, toplam flavonoid içeriği ile pozitif korelasyon göstermiş ve anlamlı bulunmuştur (14). Yapılan bir başka çalışmayla da avokado meyvesinin, iyi miktarda askorbik asit, toplam fenol konsantrasyonu, antioksidan kapasitesi ve yüksek seviye katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz aktivitelerinin olduğu kanıtlanmıştır (15).

Elde edilen veriler kontrol edildiğinde, 6 saat sonunda hayatta kalan *C. elegans* birey sayısının 75 µg/mL ekstre uygulanan grupta en yüksek olduğu tespit edilmiş olmakla beraber bu fark, gruplar arasında farkların incelendiği detaylı istatistiksel analizlerde anlamlı

bulunmamıştır. Dolayısıyla avokado ekstresinin *C. elegans*'ta termotolerans artışına sebep olduğu ve buna bağlı olarak hayatta kalan birey sayısının da kontrole göre arttığını söylemek mümkün değildir. Bu tespiti teyit etmek için ise, SPSS 16.0 programında ANOVA ve t-testi istatistiksel analizleri yapılmıştır.

Bulgular çerçevesinde, avokado ekstresinin *C. elegans* termotoleransını arttırmadığı tespit edilmiştir. Ancak bu sonucun ekstrelerin konsantrasyonları ile doğrudan bağlantılı olup olmadığı henüz bilinmemektedir. 75 µg/ml ve 150 µg/ml konsantrasyonlarındaki ekstrelerin kontrol grubu ile benzer bir sonuç vermesi ilerideki araştırmalar için yol gösterici olabilir. Etki görülmemesinin nedeni, avokadoda test edilen dozlarda termotoleransı artıracak sekonder metabolitlerin olmaması olabilir. Bu sebeple, avokadonun 75 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarında ve 150 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarında termotolerans araştırmaları yapmak gerekmektedir.

Bunun yanı sıra avokadoda bulunan sekonder metabolitlerin ayrı ayrı test edilmesi de ilerideki araştırmalar için düşünülebilir. Etkili bir bileşik tespit edilirse, *C. elegans*'ta termotoleransı arttırıcı etkisinin moleküler mekanizmaları -omik yöntemleriyle keşfedilebilir.

KAYNAKLAR

1. Hertweck, M., Hoppe, T., Baumeister, R. (2003). *C.elegans*, a model for aging with high-throughput capacity. *Experimental Gerontology*, 38(3), 327-328.
2. Savaş, N., Öğüt S., Olgun A. (2018). Toksikolojik araştırmalarda alternatif bir organizma: *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). *ADÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 2(2), 53-60.
3. Olsen, A., Vantipalli, M. C., & Lithgow, G. J. (2006). Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 120-128.
4. Lai C.H., Chou C.Y., Chang L.Y., Liu C.S., Lin W.C. (2000). Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Proteomics. *Genome Research*, 10(5), 703-713.
5. Sin O., Michels H., Nollen E.A.A. (2014). Genetic screens in *Caenorhabditis elegans* models for neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(10), 1951-1959.
6. Singh, K. D., Zheng, X., Milstein, S., Keller, M., Roschitzki, B., Grossmann, J., & Hengartner, M. O. (2017). Differential regulation of germ line apoptosis and germ cell differentiation by CPEB family members in *C. elegans*. *PloS one*, 12(7), e0182270.
7. Jackson, R. C., Morris, H. P., & Weber, G. (1978). Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumours. *British journal of cancer*, 37(5), 701.
8. Dueter K.C. (2000). Avocados a look beyond basic nutrition for one of nature's whole foods. *Nutrition Today*, 35(4), 151-157.
9. Bayram S. (2010). AVOKADO (*Persea americana* Mill.), 2010 Yılı Avokado Gelişim Raporu. BATEM, 39.

10. Unlu N.Z., Bohn T., Clinton S.K., Schwartz S.J. (2005). Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 431-436.
11. McCormack L.A., Laska M.N., Larson N.I., Story M. (2010). Review of the Nutritional Implications of Farmers' Markets and Community Gardens: A Call for Evaluation and Research Efforts. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(3), 399-408.
12. Aiello A., Accardi G., Candore G., Carruba G., Davinelli S., Passarino G., et al. (2016). Nutrigerontology: a key for achieving successful ageing and longevity. *Immunity & Ageing*, doi: 10.1186/s12979-016-0071-2.
13. Benedetti M.G., Foster A.L., Vantipalli M.C., White M.P., Sampayo J.N., Gill M.S., Olsen A., Lithgow G.J. (2008). "Compounds That Confer Thermal Stress Resistance and Extended Lifespan", *Experimental Gerontology*, 43(10), 882–891.
14. Kumar B., Cumbal L. (2016). UV-Vis, FTIR and antioxidant study of *Persea americana* (Avocado) leaf and fruit: a comparison. *Revista Farmaceuticas Ciencias Quimico*, 14, 13–20.
15. Wang M., Zheng Y., Khuong T., Lovatt C.J. (2016). Developmental differences in antioxidant compounds and systems in normal and small-phenotype fruit of 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*, 206, 15–23.