

Viscum album L. ssp. *austriacum* (WIESP.) VOLLMAN Alt Türünün Yaprak ve Meyve Ekstraktlarının *Caenorhabditis elegans*'ın Yumurta Verimi ve Fiziksel Büyüme Üzerine Etkisi

Effect of *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (WIESP.) VOLLMAN Leaf and Fruit Extracts on the Egg Productivity and Physical Growth of *Caenorhabditis elegans*

Özpinar H^{1*}, Akay E¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik AD., Sivas, Türkiye

Araştırma makalesi

Özet

Makale bilgisi

Alındı: 15.10.2019
Revize form alındı: 20.10.2019
Kabul: 25.10.2019
Online yayım: 01.12.2019

Anahtar Kelimeler
Viscum album ssp.
C. elegans
Yumurta verimi
Fiziksel büyüme

Bu çalışmada *Viscum album* ssp. *austriacum* (WIESP.) VOLLMAN (*V. album*) alt türünün yaprak ve meyve etanol ekstraktlarının *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bireyleri üzerinde yumurta verimi ve fiziksel büyüme üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan *V. album* yaprak ve meyve etanol ekstraktları *C. elegans* standart besiyerine uygulanmıştır. Çalışma sonucunda yaprak ekstresinde özellikle 0,5- 0,125 gr/100 ml' lik dozlar arasında yumurta veriminde önemli derecede bir artış tespit edilirken, meyve ekstresinde aynı durum 0,1-0,125 gr/100ml'lik konsantrasyonlar arasında gözlenmiştir. Araştırmamız sonucunda *V. album* yaprak ve meyve etanol ekstresinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. elegans* bireyleri üzerinde herhangi bir fiziksel büyüme geriliği saptanmamıştır. Etnobotanik çalışmalarda infertilite sorununun çözülmesinde kullanılan bitki örneklerinin insanlarda hormonal dengesizliği tedavi ettiği düşünülmektedir. Gelecekte in vitro ve in vivo çalışmalar, *V. album*'un tedavi edici bir ilaç olarak kullanabilmek için gereklidir.

Orijinal article

Abstract

Article info

Received: 15.10.2019
Received in revised form: 20.10.2019
Accepted: 25.10.2019
Available online: 01.12.2019

Keywords
Viscum album ssp.
C. elegans
Egg production
Physical growth

In this study, *Viscum album* ssp. *austriacum* (WIESP.) VOLLMAN subspecies the effects of leaf and fruit ethanol extracts of the on *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) individuals on egg production and physical growth were investigated. *Viscum album* ssp. *austriacum* prepared at different concentrations leaf and fruit ethanol extracts were applied to *C. elegans* standard medium. As a result of this study, significant increase in egg production was observed especially in leaf extracts of 0,5-0,125 g / 100 ml, whereas the same situation was observed between 0,1 and 0,125 g / 100 ml concentrations in fruit extract. As a result of our research, *Viscum album* L. ssp. *austriacum* no physical growth retardation was detected on *C. elegans* individuals exposed to various concentrations of leaf and fruit ethanol extracts. Ethnobotanical studies, it is thought that plant samples used to solve infertility problem treat hormonal imbalance in humans. This effect of *Viscum album* L should be supported by testing with biochemical experiments. Future in vitro and in vivo studies are necessary to be able to use *V. album* as a therapeutic remedy.

GİRİŞ

Bitkisel kaynaklı ilaçların gelişmiş ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde konvansiyonel ilaçlara alternatif olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmaktadır. Konvansiyonel ilaçların aşırı maliyetli ve yan etkilerinin bazı durumlarda tolere edilemeyecek kadar yüksek olması bitkisel materyallerin ilaç olarak kullanımını artırmıştır. Ülkemiz coğrafi konumu ve birçok bölgesinde görülen iklim farklılıkları nedeniyle florasında binlerce çeşit tıbbi ve aromatik bitkiyi barındırmaktadır. Hatta ülkemiz dünyada tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde önemli sıralarda yer almaktadır.

Ökse otu olarak ta bilinen *Viscum album* L. (*V. album*) birçok ağaç türü üzerinde yarı parazit olarak yaşayan bir bitki türüdür ve birçok tıbbi kullanım alanına sahiptir. *V. album* ile yapılan birçok çalışmada, yapısında birçok alkaloid ve diğer azotlu bileşikler, lektinler, viskotoksinler, poliholozitler, oz ve türevleri, fenilpropan ve lignanlar, fenolik asitler ve diğer bileşiklerin olduğu saptanmıştır¹. İçeriğindeki bu maddelerden dolayı bazı hastalıkların tedavisinde eczacılık açısından ve in-

san sağlığı açısından önemli bir bitki olduğu anlaşılmaktadır. *V. album*, dört mevsim yeşildir. Ağaç dalları üzerinde kümeler halinde yetişir. Meyveleri beyaz ve nohut büyüklüğündedir. Meyvelerin içinde bir iki adet tohum oluşur. Bu meyveleri yiyen kuşların dışkılarıyla birlikte ağaç dallarına düşen tohumlar üzerindeki yapışkan madde sayesinde dallara yapışmakta ve ortamdaki ürik asit sayesinde çimlenip gelişmektedir².

V. album çeşitli tıbbi etkilere sahip bir bitkidir. Ökse otunun meyve ve yapraklı dallarının; epilepsi, histeri, histerik psikoz, baş dönmesi, baş ağrısı gibi nörolojik hastalıklar³ üzerindeki etkilerinden, göğüs kanseri⁴, pankreatik kanser⁵, lösemi⁶, medulloblastom⁷, osteosarkom⁸, ewing sarkom⁹ üzerindeki tedavi edici etkilerinden, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-protozoal etkilerinden literatürde bahsedilmektedir. Dünyada doğurganlığın azalması yani infertilite gittikçe büyüyen bir sorundur. İnfertilite sorununun altında elbetteki birçok sebep yatmaktadır. Ancak dünyanın pek çok ülkesinde yapılan etnobotanik çalışmalar infertilite sorununun çözümünde de

yine birçok bitkisel drogların kullanıldığını işaret etmektedir. *V. album* türüne ait birçok çalışma olmasına rağmen, bu türün infertilite üzerine olan etkisi ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlanılamamıştır. Çalışmamızda, *V. Album*'un yaprak ve meyve etanol ekstraktlarının, doğurganlık ve fiziksel büyüme üzerine olan etkisini bir model organizma olan *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bireyleri üzerinde test ettik.

MATERYAL ve METOD

Bitki Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda kullanılacak olan *V. album*, Sivas - Tokat karayolu Çamlıbel mevki sarıçam ormanlarından 39°59'4" K, 36°30'28" D koordinatlarında, 1340 metre rakıma sahip alandan Eylül-Ekim aylarında 20 farklı çam ağacı üzerinden toplanmıştır. Toplanan örneklerin tür teşhisi Dr. Öğretim Üyesi Hülya ÖZPINAR tarafından yapılmıştır. Yaprak ve meyve örnekleri güneş almayan bir ortamda kurumaya bırakılmıştır.

Bitki Örneklerinin Ekstraksiyonu

Kurutulmuş örnekler laboratuvar tipi değirmende öğütülerek küçük parçalara ayrılmış, daha sonra 100 gr tartılarak cam kavanozlara alınmış, üzerlerine 200 ml etanol eklenmiştir. 24 saat maserasyonda bekletilen örnekler filtre kağıtlarıyla süzülerek, süzüntü içerisindeki etanol evaporatörle uçurulmuş, elde edilen kuru ekstreler kullanılıncaya kadar +4 °C de saklanmıştır.

Bitki Örneklerinin Dozlarının Ayarlanması

Elde edilen yaprak ve meyve etanol ekstrelerinden 0,2 gr, 0,1 gr, 0,5 gr, 0,25 gr, 0,125 gr tartılmış ve bu dozlar *C. elegans* bireylerinin besi ortamına katılmıştır.

C. elegans Suşlarının Eldesi

Yaban tip *C. elegans* N2 suşu *Caenorhabditis Genetic Center* (University of Minnesota, Minneapolis, USA)'dan alınmıştır.

C. elegans bireylerinin Senkronizasyonu

Yaklaşık 20 adet olgun *C. elegans* *E.coli* OP50 içeren Nematot Growth Media (NGM) petri kutusuna aktarıldı. 4-6 saat süreyle yumurtlama olduktan sonra olgun *C. elegans*' lar petri kabından çıkarıldı. Bu yumurtalar senkronize olmuş yavruları oluşturdu. Bunlar 3. Günün sonunda yetişkin forma gelince çalışmada kullanıldı. Bu işlem çalışma için yeterli *C. elegans*' in sağlanabilmesi için aynı anda 5 petri ile gerçekleştirildi.

NGM Hazırlanması

2,5 gr Peptone, 3 gr NaCl, 20 gr Agar 1 L distile su içerisinde eritilmiş ve 125 °C de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55 °C' a kadar soğutulmuştur. Daha önceden hazırlanan ve 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1mL MgSO4(1M), 1 mL kolesterol (5 mg/mL), 1 mL CaCl2 (1M), 25 mL KPO4 tampon (pH:7) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Çalışma için besiyerine *V. album* yaprak ve meyve kuru ekstreleri ayrı ayrı eklenmiştir (0,2 gr/100 mL, 0,1 gr/100 mL, 0,5 gr/100 mL, 0,25 gr/100 mL, 0,125 gr/100 mL).

Hazırlanan Nematot growth media (NGM) petri kutularına yeteri kadar aktarılmış ve katılaştıktan sonra hazırlanan *Escherichia coli* OP50 suşu NGM' a eklenerek steril kabinde kurutulmuştur. Kontrol grubu hiç bir kuru ekstre eklenmemiş besiyerinde beslenmiştir.

Yumurta Verimi Analizi

Yumurta verimi analizi için, yumurta sayımı Koelle¹⁰ protokolüne göre yapılmıştır. Buna göre *V. album* yaprak ve meyve kuru ekstrelerinin farklı dozları (0,2 gr/100 mL, 0,1 gr/100 mL,

0,5 gr/100 mL, 0,25 gr/100 mL, 0,125 gr/100 mL) ile hazırlanmış her bir petriye 25 adet iyi beslenen L4 *C. elegans* aktarılmıştır. 36 saat sonra bunların 25 tanesi yeni bir petriye aktarılarak, 20 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 20x objektif ile yumurtalar sayılmıştır. Petrilereki yumurta sayıları belirlendikten bir gün sonra çatlamayan yumurtalar tespit edilerek sayılmış ve yumurtadan çıkma yüzdesi hesaplanarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Fiziksel Büyümenin Kontrolü

Fiziksel büyümenin kontrolü amacıyla hazırlanan yaprak ve meyve kuru ekstrelerinin farklı dozları (0,2 gr/100 mL, 0,1 gr/100 mL, 0,5 gr/100 mL, 0,25 gr/100 mL, 0,125 gr/100 mL) NGM içerisine petrilere eşit miktarda *C. elegans* yumurtası ilave edilmiştir. İçlerinde 90-100'er adet yumurta bulunan petrilere, yumurtadan yavruların çıkışı ve fiziksel büyüklükleri açısından her gün kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmalar 3 kez tekrar edilerek ortalamalar belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen veriler SPSS (Ver 22) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde One Way Anova testi, gruplar arası verilerin değerlendirilmesinde Tukey testi kullanıldı. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

BULGULAR

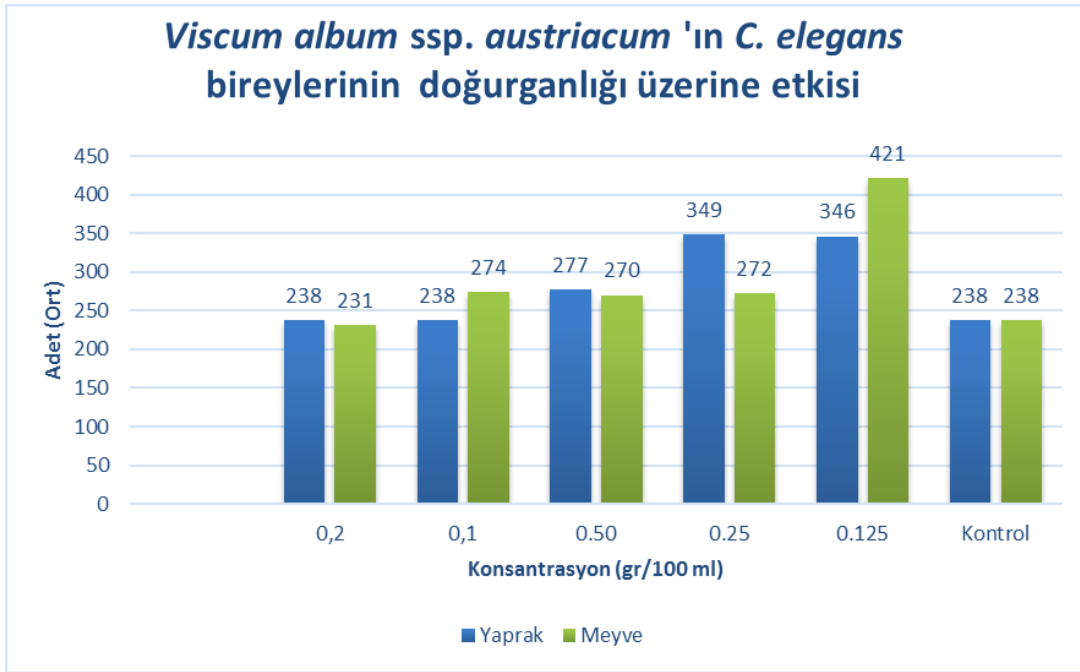
Yumurta Verimi Analiz Sonuçları

Araştırmamız sonucunda *Viscum album* yaprak ve meyve etanol ekstrelerinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. elegans* bireylerinin yumurta sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre yaprak ekstrelerinde özellikle 0,5-0,125 gr/100 mL'lik dozlar arasında yumurta veriminde önemli derecede bir artış tespit edilirken meyve ekstrelerinde aynı durum 0,1-0,125 gr/100mL'lik konsantrasyonlar arasında gözlenmiştir. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yaprak ekstreleri ile çalışılan bütün dozlar ile kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,05). Gruplar arası veriler incelendiğinde 0,2 g/100 ml'lik konsantrasyon ile 0,1 g/100 ml'lik konsantrasyon arasında fark önemsiz iken (p>0,05), diğer gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,05). Meyve ekstreleri verileri incelendiğinde kontrol grubu ile 0,5 g/100 ml'lik konsantrasyon arasındaki fark önemsiz iken (p>0,05), kontrol grubu ile diğer konsantrasyonlar arasındaki fark önemli bulunmuştur (p<0,05). Gruplar arası veriler incelendiğinde bütün konsantrasyonlarda birbirleri arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05, Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. *V. album* meyvesi su ve etanol ekstraktının *C. elegans* bireylerinde doğurganlık üzerine etkisi

Dozlar (gr/100ml)	Yaprak (Ort / Adet)	Meyve (Ort / Adet)
0,2	238 ^a	231 ^a
0,1	238 ^a	274 ^b
0,50	277 ^b	270 ^c
0,25	349 ^c	272 ^d
0,125	346 ^d	421 ^e
Kontrol	238 ^e	238 ^c

Farklı harfle belirtilen gruplar arası fark önemlidir (p<0,05), One-Way Anova Test (SPSS-21), sütunlar kendi arasında değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Meyvesi su ve ethanol ekstraktının *C. elegans* Bireylerinde Doğurganlık Üzerine Etkisi

Fiziksel Büyümenin Kontrolü Analiz Sonuçları

Araştırmamız sonucunda *Viscum album L. ssp. austriacum* (WİESP.) yaprak ve meyve ethanol ekstresinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. elegans* bireyleri üzerinde herhangi bir fiziksel büyüme geriliği saptanmamıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarih boyunca insanlar, sağlıklarını korumak ve hastalıkları tedavi etmek amacıyla çeşitli doğal kaynakları kullanmışlardır. Geleneksel yapısı bozulmamış ilkel insan toplulukları doğal bir farmakope olarak, vahşi hayvan ve ıslah edilmemiş bitki türlerinden tedavi edici amaçla yararlanmışlardır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde kırsal nüfusun % 80' i tedavi amacıyla geleneksel halk ilaçlarını hala kullanmaktadır¹¹.

Viscum album L., türü ile yapılan çalışmalarla ilgili yaptığımız literatür taramasında bu bitkinin infertilite tedavisinde kullanımı ile çok fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. Literatürde bu türün etnobotanik kullanımı ile ilgili veriler mevcuttur. Dalou ve ark.¹², tarafından yapılan etnobotanik çalışmalarda, Ürdün'ün kuzeyindeki birkaç köyde 'Şifacı' olarak adlandırılan kişiler ile görüşmeler yapılmış ve bu görüşmelerde *Viscum album L.* türünün de içinde bulunduğu bitkisel karışımların infertilite tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir. İlk bitki karışımında 1 kg *Brassica alba* tohumları, 100 gr *Viscum album L.* ile karıştırılmış öğütülen örneklerden iki tatlı kaşığı 6lt ılık su içerisine eklenmiştir. Daha sonra bu sıvı içerisinde günde en az yarım saat olmak üzere çiftlerin ayaklarını bekletmeleri istenmiştir. Tedaviyle ayaktaki sinir uçlarının uyarıldığı ve özellikle alt karın bölgesinde kan dolaşımının hızlandırıldığı iddia edilmektedir. Tedavi, tetkikler sonucu infertilite açısından herhangi bir patolojik durumun olmadığı anlaşılan, apendektomi ameliyatı geçirdikten sonra sekiz yıldır çocuğu olmayan bir kişiye ve eşine uygulandığında eşlerin çocuk sahibi oldukları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Viscum album L.*' nin bulunduğu birkaç karışıma daha yer verilmiş, bu karışımların da bayanlarda menstrual döngüyü düzenlenmede ve rahimde meydana gelen anomalileri tedavi etmede kullanıldığı bildirilmiştir.

Infertilite dünyada gittikçe büyüyen bir sorun halini almaktadır. Bu sorunun çözümünde farklı bitkilerin kullanıldığı etno-medikal prosedürlere göre oluşturulan birçok halk ilacı geliştiri-

lmıştır. Dünyanın birçok bölgesinde de bu ilaçlar kolay ulaşılabili- liliği ve kullanımındaki basit prosedürlerden dolayı gittikçe artan oranda daha fazla tercih edilmektedir¹³.

Nwoke ve ark.¹⁴ tarafından yapılan bir çalışmada, *Viscum album L. subsp. album* alt türünün antioksidant aktivitesi ve besin değeri tetkik edilmiştir. Bu çalışmada yem sıkıntısı ve kuraklık gibi şartlarda herbivorlar tarafından bu türün tüketildiğinden bahsedilmektedir. Yapılan analizler sonucunda Egbeda, Lagos, Nijerya ormanlarında yabani portakal ağaçları üzerinde bulunan ökse otu örnekleri toplanmıştır. Spektrometrik yöntemle bu örneklerin mineral analizi ve antioksidan aktivite tayini yapılmıştır ve antioksidan aktivitenin ve total fenolik madde miktarının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek oranda magnezyum (240,8mg/100gr) ve potasyum (122,4mg/100gr), orta düzeyde kalsiyum (55,2mg/100gr), sodyum (42,2mg/100gr), az miktarda da demir iyonlarına rastlanılmıştır. Ayrıca yağ, protein, lif ve karbonhidrat miktarının yüzde olarak önemli miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre, ökse otunun sağlık açısından önemli birçok bileşiği içermesinden dolayı fertilitate tedavisinde kullanılabilceği öne sürülmüştür.

Yaptığımız çalışmada *Viscum album L. ssp. austriacum* (WİESP.) yaprak ve meyve ethanol ekstresinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. elegans* bireylerinin yumurta sayılarına bakılmış ve yaprak ekstresinde özellikle 0,5-0,125 gr/100 mL'lik dozlar arasında yumurta veriminde önemli derecede bir artış tespit edilirken, meyve ekstresinde aynı durum 0,1-0,125 gr/100mL'lik konsantrasyonlar arasında gözlenmiştir. Literatürde yapılan incelemelerde, etnobotanik çalışmalarda sadece ökseotunun yapraklarının kullanıldığı belirtilmekte iken çalışmamızda bu bitkinin meyve ekstralarının de belli dozlarda en az yapraklar kadar yumurta sayısını artırdığı tespit edilmiştir.

Infertilitede endokrinolojik değerlendirme yapılması gerektiği ve çeşitli endokrinolojik bozuklukların, infertiliteye neden olabileceği ileri sürülmektedir¹⁵. İlaveten etnobotanik çalışmalarda infertilite sorununun çözümlenmesinde kullanılan bitki örneklerinin insanlarda hormonal dengesizliği tedavi ettiği düşünülmektedir. *Viscum album L.*'nin bu etkileri biyokimyasal deneylerle test edilerek desteklenmelidir.

Kaynaklar

1. Ergun F, Deliorman D. Viscum album L.(Ökse otu) Bitkisinin Kimyasal Bileşi mi. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 1995;24:21-33.
2. Becker H. Botany of European mistletoe (Viscum album L.). *Oncology*. 1986;43:2-7.
3. Szurpnicka A, Zjawiony JK, Szterk A. Therapeutic potential of mistletoe in CNS-related neurological disorders and the chemical composition of Viscum species. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019;231:241-252.
4. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Majid A, Adibah F, Jaganathan SK. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *BioMed research international*. 2014;2014.
5. Tröger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stanković N, Milićević M. Viscum album [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomised clinical trial on overall survival. *European Journal of Cancer*. 2013;49:3788-3797.
6. Park Y-K, Do YR, Jang B-C. Apoptosis of K562 leukemia cells by Abnobaviscum F®, a European mistletoe extract. *Oncology Reports*. 2012;28:2227-2232.
7. Zuzak TJ, Rist L, Eggenschwiler J, Grotzer M, Viviani A. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to Viscum album (mistletoe) preparations. *Anticancer Research*. 2006;26:3485-3492.
8. Kleinsimon S, Kauczor G, Jaeger S, Eggert A, Seifert G, Delebinski C. ViscumTT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17:26.
9. Twardziok M, Kleinsimon S, Rolff J, et al. Multiple active compounds from Viscum album L. synergistically converge to promote apoptosis in Ewing sarcoma. *PLoS One*. 2016;11:e0159749.
10. M. K. Quantitation of constitutive egg-laying. *Yale University, NewHaven, CT.USA*. 2019;http://www.wormbook.org/chapters/www_behavior/behavior.html#sec 9.
11. Acibuca V, Budak DB. Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 2018;33:37-44.
12. Abu Dalou AY, Alshboul A, Na'amneh M, Sekhaneh WA, Alrousan M. The treatment of infertility using ethnomedical practices in northern Jordan: a medical anthropological study. *Australian Journal of Herbal Medicine*. 2015;27:3.
13. Erhabor J, Idu M, Udo F. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the treatment of male infertility among the IFA Nkari People of Ini Local Government area of Akwa Ibom State, Nigeria. *Research Journal of Recent Sciences*, 2013;2277:2502.
14. Nwoke SC, Magbagbeola AO, Ebuehi OA, Iwalokun BA. Antioxidant and nutritive value of mistletoe (Viscum Album), *Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2012.
15. Demirtürk F, Hisim SY. İnfertil Kadının Değerlendirilmesinde Kullanılan Endokrinolojik Testler. *Türkiye Klinikleri Gynecology Obstetrics-Special Topics*. 2012;5:109-114.