

Çerçeve kayması ve baz çifti değişimi mutasyonlarına karşı etkili doğal iki *Taraxacum* türü: Mutajenik, antimutajenik, antioksidan değerlendirme

Ahmet UYSAL, Gökhan ZENGİN, Erdoğan GÜNEŞ, Nazife EKŞİNAR UYSAL

ÖZ

Son yıllarda bitkiler ve bitkisel ürünler, düşük toksisite ve yan etkilerinden dolayı farmakoloji ve gıda endüstrilerinde artan bir önem kazanmışlardır. Asteraceae familyasına ait olan *Taraxacum* cinsi, eski çağlardan buyana geleneksel tıpta kullanılmıştır. Bu çalışmada iki *Taraxacum* türünün (*Taraxacum mirabile* ve *Taraxacum farinosum*) antioksidan, mutajenik ve antimutajenik özellikleri araştırıldı. Antioksidan özellikler; DPPH radikal süpürme, indirgeme gücü (CUPRAC ve FRAP) ve fosfomolibdenyum yöntemlerini içeren farklı test sistemleri ile araştırıldı. Aynı zamanda toplam fenolik ve toplam flavonoit

içerikleri de bildirildi. Mutajenik ve antimutajenik aktiviteler Ames yöntemi ile test edildi. *Taraxacum* türlerinin orta düzeyde antioksidan ve ortadan güçlüye değişen oranlarda antimutajenik aktiviteye sahip olduğu görüldü. Buna rağmen türler mutajenik bulunmadı. *T. mirabile*'nin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri (23.43 mgGAE/g ekstre ve 4.58 mgRE/g ekstre) *T. farinosum*'dan (17.54 mgGAE/g ekstre ve 3.37 mgRE/g ekstre) daha yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Taraxacum mirabile*, *Taraxacum farinosum*, antimutajenik, farmasötik

GİRİŞ

Dünya üzerinde var olduğu tahmin edilen yaklaşık 500.000 bitki türünün, çok küçük bir yüzdesi (% 1-10) hem insan hem de diğer hayvan türleri tarafından yiyecek olarak kullanılmaktadır. Daha fazlasının da ilaç olarak kullanılması olasıdır (1, 2). Tedavi maksadıyla kullanılan bitkilerin miktarı antik çağdan beri devamlı bir artış göstermektedir (Mezopotamya uygarlığında 250 civarında iken, Arap-Fars uygarlığı döneminde bu sayı 4000 civarındadır)(3). Doğal olarak yetişen ve halk arasında şifalı otlar olarak adlandırılan birçok bitkisel drogun, çeşitli hastalıklara karşı eskiden olduğu gibi günümüzde de yaygın şekilde kullanıldığı bilinmektedir (4). Bu durumu destekler nitelikte, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı 19. Yüzyılda yaklaşık 13000 iken, bu sayının 20. Yüzyılda ise 20000 civarına ulaştığı belirtilmektedir (3).

Taraxacum cinsi, *Asteraceae* familyasına ait Cichorioideae alt familyasından Lactuceae tribinin bir üyesidir. Kuzey yarım kürenin sıcak bölgelerinde geniş yayılış göstermektedir. *Taraxacum* (Compositae= Asteraceae) cinsinin ülkemizdeki toplam tür sayısı 49, takson sayısı ise 54'tür. *Taraxacum* cinsine ait bitkiler uzun süredir tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bitkinin kullanımına ilişkin ilk bilgi,

Ahmet Uysal
Selçuk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Konya, Türkiye

Gökhan Zengin, Erdoğan Güneş, Nazife Ekşinar Uysal
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Türkiye

Sorumlu Yazar
Ahmet Uysal
Tel: +903322231068
e-mail: ahuyal@selcuk.edu.tr

Gönderilme / Submitted: 02.05.2016 **Düzeltilme / Revised :** 17.06.2016
Kabul / Accepted: 23.06.2016

bu cinsin Grekçeden köken alan inflamasyon anlamına gelen “taraxis” ve tedavi edici anlamına gelen “akeomai” kelimelerinden oluşan isminde belirtilmiştir. Tedavi amaçlı kullanımına ait ilk bulgular, 10. ve 11. yüzyıl Arap fizikçileri tarafından özellikle karaciğer ve dalak rahatsızlıklarında kullanıldığı yolundadır. 16. yüzyıldan bu yana Almanya, Batı dünyasında *Taraxacum*'un kullanımına ait en geniş kayıtları elde etmiştir. Alman fizikçi ve botanikçi Leonhard Fuchs, dispepsi, mide ekşimesi, hepatit ve anoreksi, gut hastalığı, diyare, su toplanması, dalak ve karaciğer şikayetlerinde bu bitkinin kullanımını tanımlamıştır. Avustralya yerlileri olarak da bilinen Aborjinler tarafından halk tıbbında, bitkinin kökünden ve kendinden yapılan infüzyonlar ve dekoksasyonlar; böbrek rahatsızlıkları, dispepsi ve mide ekşimesi tedavisinde kullanılmıştır (5). Ayrıca bu drog, kan temizleyici olarak düşünülmüş, geleneksel tıpta egzama ve cilt rahatsızlıklarının yanında eklem ve romatizmal hastalıkların tedavisinde de uygulanmıştır (6). Tüm bitkiden hazırlanan dekoksasyon, Meksikâda geleneksel olarak Diabetes mellitus hastalığının kontrolünde kullanılmaktadır (7). Geleneksel Türk tıbbında bu bitki, laksatif, diüretik ve kuvvetli anti diabetik olarak uygulanmaktadır (8). Geleneksel Çin tıbbında *Taraxacum* bazı bitkilerle kombine edilerek; hepatit tedavisinde, üst solunum yolları enfeksiyonlarında, zatürre ve bronşit gibi vakalarda immun sistemin güçlendirilmesinde ve göğüs ağrılarının baskılanmasında kullanılmaktadır (5, 9). *Taraxacum* türlerinin tedavi edici özelliklerinin seskiterpenlerden, kısmen de acı maddelerden kaynaklandığı yapılan detaylı araştırmalar ile ortaya konmuştur (10). Farmasötik kullanımının dışında, çeşitli *Taraxacum* türlerine ait çiçek durumları, yapraklar ve kökler gıda olarak kullanılmaktadır. Özellikle genç yapraklar salatalarda kullanılırken, acı tada sahip kökler kavrulmak suretiyle kahve gibi de tüketilmektedir. Ayrıca bu bitkilerden elde edilen bazı ekstrelerin alkollü içkiler, dondurulmuş tatlılar, fırınlanmış ürünler, şekerlemeler, pudingler ve peynirlere aroma verici olarak ilave edildiği de bildirilmiştir (11, 12).

Uzun süredir geleneksel tıp alanında tedavi edici olarak kullanılmasına rağmen *Taraxacum*, kullanımı daha çok deneyimlere dayanan ve bilimsel kullanımı tamamen aydınlatılmamış bir bitki grubudur (13). Pek çok *Taraxacum* türünün diüretik, safra salgılama, anti-inflamatuvar, anti-oksidadan, anti-karsinojenik, analjezik, anti-hiperglisemik, anti-koagülant/anti-trombotik ve prebiotik aktiviteleri (10) ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen; yaptığımız literatür taramalarına göre ülkemiz için endemik olan *Taraxacum mirabile* Wagenitz ve *Taraxacum farinosum* Hausskn. Et. Bornm türleri ile ilgili yapılmış detaylı

bir mutajenite, antimutajenite ve antioksidan aktivite çalışması bulunmamaktadır. Dolayısı ile bu çalışma, bu iki bitki türünün mutajenite, antimutajenite ve antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesine ilişkin ilk rapor olma niteliğini taşımaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bitki örneklerinin toplanması ve ekstrelerin elde edilmesi

Bitki örneklerinden *Taraxacum farinosum* Hausskn. et. Bornm. (Örnek no: EY-2145) Konya ili, Cihanbeyli ilçesi, Tersakan Gölü mevkiinin batı kesimlerinden; *Taraxacum mirabile* Wagenitz (Örnek no: EY-2146) Aksaray ili, Eski il ilçesi kuzey kesimi, Küngönü mevkiinden 08.08.2010 tarihinde, bitkilerin çiçekli döneminde toplandı. Bitkilerin teşhisi Dr. Evren YILDIZTUGAY (S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından yapıldı.

Bitkilerin toprak üstü kısımları gölgede kurutuldu ve sonra değirmende toz haline getirildi. Toz haline gelen örneklerden yaklaşık 10 g tartılıp soxhlet cihazında 6 saat süreyle sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstreler filtre kâğıdından (Whatman mavi band) süzüldü. Daha sonra çözücü rotary evaporatörde 40°C'de kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Elde edilen ham ekstreler analizlere kadar -4°C'de saklandı (TMM: *T. mirabile* metanol, TMA: Aseton; TMK; Kloroform ekstresi; TFM: *T. farinosum* metanol, TFA: Aseton; TFK: Kloroform ekstresi).

Mutajenite/Antimutajenite testi

Çalışmada kullanılmak üzere mutant *Salmonella typhimurium* test suşları TA98 ve TA 100 Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Bu suşlardan TA98 çerçeve kayması mutasyonlarını tespit ederken, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirlemede kullanılmaktadır. *T. mirabile* ve *T. farinosum* ekstrelerinin toksik dozlarının belirlenmesi amacı ile Dean ve ark. (14) tarafından belirlenen yöntem kullanıldı.

Ekstrelerin potansiyel mutajenik etkilerini belirlemek amacı ile *Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanıldı. Çalışmada Maron ve Ames (15) tarafından önerilen plak inkorporasyon yöntemi uygulandı. Mililitresinde yaklaşık 1-2x10⁹ bakteri içeren gecelik taze bakteri kültüründen 100 µl, S9 karışımından 500 µl (veya 500 µl fosfat tamponu) ve son olarak farklı dozlarda bitki ekstrelerinden 100 µl alınarak, 45°C'de bekletilen 2.5 ml hacimdeki üst agara eklendi.

Kısa süreli çalkalama işleminin ardından karışım önceden hazırlanan minimal glukoz agarlı plaklara döküldü ve hızlı bir şekilde çevrilerek yüzeye yayıldı. Katılaşmanın ardından plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi (16). Bu sürenin sonunda plaklardaki geri dönen (revertant) koloniler sayılarak kaydedildi. Çalışma esnasında pozitif kontrol plakları olarak S9 yokluğunda TA98 suşu için 4-nitro fenilendiamin (4-NPDA) ve S9 varlığında 2-aminofloren (2-AF) kullanıldı. TA100 suşu için S9 yokluğunda sodyum azid (SA) ve S9 varlığında 2-aminoantrasen (2-AA) kullanıldı. Negatif kontrol plakları olarak ekstrelerin çözülmesi dimetilsülfoksit içeren plaklar da hazırlandı. Sadece bakteri içeren revertant plakları da ayrıca hazırlandı. Test edilen ekstrelerin *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olabilmesi için, her ekstre ile eşzamanlı olarak hazırlanan kontrol plaklarındaki (0 dozu) koloni sayısının; maksimum sayılarının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olması gerekmektedir (15).

Antimutajenite deneyinde ise iki test suşu üzerinde mutajen olduğu bilinen maddelerin, mutajenik etkilerinin bitki ekstreleri tarafından inhibe edilme oranları belirlenmektedir. Bu amaçla Maron ve Ames (15) tarafından önerilen ve Zengin ve ark. (17) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanıldı. Kısaca; 100 µl bakteri kültürü (1-2x10⁹ bakteri/ml), 100 µl farklı dozda bitki ekstresi, 100 µl pozitif mutajen çözeltisi ve 500 µl S9 karışımı ya da fosfat tamponu (S9'suz deney için), 2.5 ml üst agar içerisine ilave edildi. Karışım vorteks ile çalkalanarak minimal glukoz agar plakalarının yüzeyine dökülerek hızlı bir şekilde yayıldı. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı ve bu sürenin ardından revertant koloniler sayıldı. İçerisinde bitki ekstresi olmayan ve sadece bakteri ve mutajenik madde ilave edilen plaklarda mutajenite oranı %100 (yani %0 antimutajenite) olarak belirlendi. Ekstrelerin antimutajenite oranları ise [(A-B)/(A-C)]x 100 formülü ile hesaplandı. Bu formülde A= Bakteri+mutajen plağındaki revertant koloni sayısı; B=Bakteri+mutajen+ekstre plağındaki revertant koloni sayısı; C=Kendiliğinden geri dönen revertant koloni sayısını (sadece bakteri plağı) ifade etmektedir (18). Buradan elde edilen sonuçlara göre % 0-25 aralığındaki inhibisyon: zayıf antimutajenite veya aktivite yok; %26-40 aralığındaki inhibisyon: orta dereceli antimutajenite; %40 ve üzeri inhibisyon: güçlü antimutajenite olarak belirlendi (19).

Antioksidan Kapasite Testleri

Toplam Fenolik Madde Tayini

Yöntemde, ekstrelerden (2 mg/ml) 250 µl deney tüplerine alındı ve sonra her bir tüpe 1ml Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9

oranında seyreltilmiş) ilave edildi. Ardından her bir tüpe 750 µl %1'lik Na₂CO₃ çözeltisinden eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbanları ölçüldü (Shimadzu UV-1800). Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği ekstrede gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak verildi (20).

Toplam flavonoit madde tayini

Yöntemde, ekstrelerden (1 mg/ml) 1 ml deney tüplerine alındı ve sonra her bir tüpe 1ml metanolik AlCl₃ çözeltisi ilave edildi. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbanı belirlendi. Aynı işlemler standart flavonoit olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Sonuçta ekstrelerin toplam flavonoit madde içerikleri ekstrede rutin eş değeri (mg RE/g) olarak verildi (20).

DPPH radikal giderme (süpürme) aktivitesinin belirlenmesi

Ekstrelerin DPPH radikalini süpürme aktivitesi Zengin ve ark. (20)'a göre yapıldı. Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı. Ekstrelerin 1 ml'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 ml'si ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapatılıp kuvvetlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanlar 517 nm'de okundu. Aynı işlemler troloks için de yapıldı ve ekstrelerin DPPH radikalini süpürücü aktiviteleri ekstrede troloks eşdeğeri olarak verildi (mgTEs/g).

FRAP testi

FRAP testinin uygulanmasında öncelikle FRAP reaktifi hazırlandı. FRAP reaktifi, 0.3 M, pH'sı 3.6 olan asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl₃'ün 10:1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Ekstrelerin 0.1 ml'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 ml'si ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların absorbanları 593 nm'de okundu. Testin sonuçları ekstrede troloks eşdeğeri olarak değerlendirildi (mgTE/g)(20).

CUPRAC testi

Yöntemde ekstrelerden 0.5 ml alındı ve her bir deney tüpüne 1 ml CuCl₂.2H₂O (10 mM), 1 ml amonyum asetat (1 M; pH:7) ile 1 ml neokuproin (7.5 mM) çözeltisi eklendi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları ekstrede troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak yorumlandı(20).

Fosfomolibdat testi

Bu yöntemde 2 mg/ml konsantrasyonunda ekstrelerden 0.3 ml bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden (0.6 M H₂SO₄, 28 mM Na₂HPO₄.12H₂O ve 4 mM amonyum molibdat) 3 ml eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95°C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de yapıldı. Antioksidan aktivite ekstrede troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak hesaplandı(20).

İstatistik değerlendirme

Bütün testler üç tekrarlı deneyler yapılarak gerçekleştirildi

ve sonuçlar üç tekrarlı deneylerin ortalaması ve standart sapması olarak verildi. Sonuçlar arasındaki anlamlılık testleri SPSS v22. programı kullanılarak ANOVA varyans analizi yardımıyla %95 güven aralığı seçilmek suretiyle ($\alpha=0.05$) Tukey testiyle belirlendi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Mutajenik/Antimutajenik özellikler

Çalışmalarda her iki bitkiye ait ekstrelerin toksik olmayan dozları yani 1000, 100 ve 10 µg/plak dozları kullanıldı. Plak inkorporasyon yöntemi kullanılarak, S9 enzimleri varlığında ve yokluğunda yapılan mutajenite testi sonuçları Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. *T. mirabile* ve *T. farinosum* ekstrelerinin mutajenik potansiyellerinin değerlendirilmesi

	Konsantrasyon (µg/plak)	His ⁺ revertant sayıları (revertant/plak)			
		TA 98		TA 100	
		S9 (-)	S9 (-)	S9 (-)	S9 (-)
*Negatifkontrol	100 µl/plak	22±1a	40±8a	118±6a	115±6a
°Pozitifkontrol		744±98b	4803±109b	1855±177b	3878±159b
	0	26±4a	40±5a	122±9a	115±16a
	1000	26±3a	37±1a	116±20a	146±7a
TMM	100	23±3a	39±6a	103±7a	118±8a
	10	23±3a	45±16a	115±3a	128±1a
	1000	27±5a	49±11a	93±13a	147±5a
TMA	100	24±5a	36±6a	111±11a	104±3a
	10	23±2a	43±3a	112±8a	110±11a
	1000	25±5a	44±8a	130±15a	132±4a
TMK	100	24±5a	46±8a	107±13a	148±8a
	10	22±2a	34±8a	109±15a	129±0a
	1000	22±1a	40±14a	124±16a	102±12a
TFM	100	23±2a	47±2a	125±25a	120±9a
	10	20±1a	44±0a	109±7a	106±15a
	1000	27±5a	41±8a	100±18a	121±5a
TFA	100	22±3a	53±9c	96±4a	124±14a
	10	20±1a	60±0c	119±8a	101±1a
	1000	24±5a	40±4a	116±22a	130±1a
TFK	100	25±2a	42±6a	130±19a	113±3a
	10	22±1a	47±2a	132±1a	111±11a

TMM: *T. mirabilem* etanol, TMA: aseton; TMK: Kloroform ekstresi

TFM: *T. farinosum* etanol, TFA: aseton; TFK: Kloroform ekstresi

* Negatif kontrol: DMSO (100 µl/plak) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda negatif kontrol olarak kullanıldı.

° Pozitif kontroller:

2-Aminofloren (7.5 µg/plak) TA98 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; 4-nitro-*O*-fenilendiamin (5 µg/plak) TA98 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

2-Aminoanthracene (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; Sodium azid (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

^{abc} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

His⁺ revertant: Histidin sentezleme yeteneğini tekrar kazanarak geri dönen bakterisi.

Elde edilen bulgulara göre bitki ekstraları; negatif kontrol plağı ile kıyaslandığında mutajenitenin göstergesi olan herhangi bir revertant koloni sayısı artışı göstermedi. Dozlar arası herhangi bir ilişkinin olup olmadığını ortaya koymak amacıyla, her iki bitkiye ait ekstraların üç farklı dozda denemesi yapıldı. Bütün test konsantrasyonlarında ekstralar, spontan revertantların iki katı veya daha fazlası bir koloni sayısı artışı göstermedi. Sonuç olarak *T. farinosum* ve *T. mirabile* ekstraları, S9 enzimleri varlığında ve yokluğunda

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları üzerine herhangi bir mutajenik etki göstermedi. Bu sonuçlar, bu bitki ekstralarının insanlar tarafından kullanımının güvenli olabileceğini ve daha ileri tıbbi araştırmalarda kullanılabileceğini gösterdi.

Her ekstrenin antimutajenik etkisi; plak başına düşen revertantların ortalamaları, standart sapmaları ve bilinen mutajenlere karşı belirlenen % inhibisyon oranları değerlendirilerek belirlendi. Azalan revertant koloni sayıları ve antimutajenite oranları Tablo 2'de verildi.

Tablo 2. *Taraxacum* ekstralarının bilinen mutajenlere karşı TA98 ve TA100 suşları üzerinde (S9 varlığında ve yokluğunda) belirlenen % inhibisyon oranları ve revertant koloni sayıları

	Konsantrasyon (µg/plak)	His ⁺ revertant sayıları (revertant/plak)							
		TA 98				TA 100			
		S9 (-)	%inhibisyon	S9 (+)	%inhibisyon	S9 (-)	%inhibisyon	S9 (+)	%inhibisyon
†Negatif kontrol	100 µl/plak	48±5a		40±8a		146±4a		115±6a	
*Pozitif kontrol	0	898±39b	0	4803±109b	0	2897±142b	0	4042±159b	0
	0	49±6a		40±5a		140±9a		115±16a	
TMM	1000	601±39c	35	3447±82c	28	1691±201c	44	3144±189c	23
	100	718±1b	21	3579±179c	26	1759±62c	41	3349±130c	18
	10	781±88b	14	3784±143d	21	1803±46c	40	3712±288c	8
TMA	1000	660±11c	28	3131±114c	35	1851±124c	38	3425±212c	16
	100	777±62b	14	3464±416c	28	2027±151bc	32	4417±158b	0
	10	761±25b	16	4046±74b	16	2129±133bc	28	4882±169d	0
TMK	1000	705±63bc	23	2725±275e	44	1845±66c	38	2384±78e	42
	100	759±81bc	16	3396±35c	30	2000±108bc	33	3431±192c	16
	10	946±39d	0	3772±42d	22	1900±173c	36	3508±185c	14
TFM	1000	797±85bc	12	2079±158f	57	1885±115c	37	2244±112e	46
	100	784±92bc	13	3156±62c	35	1762±90c	41	2478±180e	40
	10	731±13bc	20	3757±290d	22	1911±86c	36	3297±151c	19
TFA	1000	681±21c	26	3234±128c	33	1686±98c	44	2238±134e	46
	100	716±21bc	21	3750±223d	22	1644±50c	46	3112±122c	24
	10	803±85b	11	4050±258b	16	2122±72bc	28	3231±148c	21
TFK	1000	746±21bc	18	3278±214c	32	1801±85c	40	1645±73f	61
	100	766±77b	16	3688±145d	23	1927±40c	35	1834±82f	56
	10	822±72b	9	4647±162b	3	2108±132bc	29	3119±211c	24

TMM: *T. mirabile* metanol, TMA: aseton; TMK; Kloroform ekstresi; TFM: *T. farinosum* metanol, TFA: aseton; TFK: Kloroform ekstresi

†Negatif kontrol: DMSO (100 µl/plak) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda negatif kontrol olarak kullanıldı.

* Pozitif kontroller:

2-Aminofloren (7.5 µg/plak) TA98 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; 4-nitro-*O*-fenilendiamin (5 µg/plak) TA98 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

2-Aminoanthracene (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; Sodium azid (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

^{abcdef} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

His⁺ revertant: Histidin sentezleme yeteneğini tekrar kazanarak geri dönen bakteri.

TA98 suşu üzerinde sadece TMM ve TMA ekstraları 1000 µg/plak dozlarında 4-NPDA'ya karşı S9 enzimleri yokluğunda sırasıyla %35 ve %28 oranlarında inhibisyon göstererek orta dereceli bir antimutajenik aktivite ortaya koydu. Bunların dışında kalan ve her iki bitkiye ait ekstraları 4-NPDA'ya karşı TA98 suşu üzerinde zayıf antimutajenik etki gösterdi. Ortama s9 enzimlerinin eklenmesi ile özellikle TFM ve TMK ekstraları 1000 µg/plak konsantrasyonda 2-AF'ye karşı sırasıyla %57 ve %44 inhibisyon göstererek güçlü antimutajenik aktivite sergilediler. TMM, TMA, TFA ve TFK ekstraları aynı dozlarda orta dereceli antimutajenik aktivite gösterdiler (sırasıyla %28, %35, %33 ve %32). TA100 suşları değerlendirildiğinde, TMM ekstresinin S9 yokluğunda 1000 ve 100 µg/plak dozlarında %41 ve %44 inhibisyon oranları ile güçlü antimutajenik olduğu tespit edildi. TFM ekstresi 100 µg/plak ve TFA ekstresi ise 1000 ve 100 µg/plak dozlarında %40'ın üzerinde bir oranla SA'nın mutajenik etkisine karşı güçlü antimutajenite ortaya koydular (sırasıyla %41, %44 ve %46). Bu bahsi geçen ekstraların dışında kalan bütün ekstralar SA'ya karşı %28 den %40'a varan oranlarda orta dereceli antimutajenik aktivite gösterdi. Test ortamına metabolik aktivasyon enzimlerinin eklenmesiyle özellikle TMK ekstresinin 1000 µg/plak dozu hariç, diğer TM ekstralarında önemli derecede bir aktivite kaybının olduğu görüldü. Buna rağmen TFM ve TFA ekstraları en yüksek konsantrasyonda 2-AA'ye karşı %46 oranında inhibisyon göstererek güçlü antimutajenik olarak nitelendirildi. TFK ekstresinde ise 1000 µg/plak dozunda en yüksek aktivite olarak %61 oranında inhibisyon belirlendi. Aynı şekilde metabolik aktivasyon enzimlerinin ilavesi 100 µg/plak konsantrasyonda %35 olan aktiviteyi %56'ya taşıyarak 2-AA'ya karşı güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdi.

Yapılan bir çalışmada Takasaki ve ark. (21), *T. japonicum* kök su ekstresinin farelerde, farklı tipte öncü maddeler ile indüklenen iki kademeli karsinogenez olan cilt kanserine karşı başlama ve artış dönemlerinde inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının ikinci kısmında ise *T. japonicum*'dan izole edilen 11 triterpenin etkisini in vivo olarak araştırmışlardır. İlerleyen bu iki kademeli testte, taraksasterol ve tarakssterol fare cilt tümörü karsinogenezinde güçlü bir inhibe edici etki göstermiştir. İlâveten taraksasterol 100 ml içme suyunda 2.5 mg konsantrasyonda ağız yoluyla verildiği durumda kendiliğinden oluşan meme tümörüne karşı fark edilir derecede inhibe edici etki göstermiştir (22). Choi ve ark. (23) tarafından yürütülen diğer bir çalışmada *T. coreanum*'dan izole edilen taraksinik asit (taraksasinik asit-1-O-β-D glukopiranosit'den türetilen) kanser hücrelerine karşı anti kanser etkisi yönüyle araştırılmış ve 34.5–135.9 µM

konsantrasyonlarda, HL-60 hücrelerinde önemli derecede sitotoksitite gösterdiği bildirilmiştir. Bunun aksine Ko ve ark. (24), *T. mongolicum*'un liyofilize etanol ekstresinin, insan AGS gastrik kanser hücrelerinde, hücre sel büyüme üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Ames testi ile yapılan çalışmamızda *T. farinosum* ve *T. mirabile* ekstraları mutajenik bulunmamıştır. Bu nedenle yapılan antimutajenite çalışmalarında ise *T. farinosum* ve *T. mirabile* ekstralarının orta değerden güçlüye varan derecelerde antimutajenik aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. S9 metabolik aktivasyon enzimleri bazı durumlarda aktivite artışına neden olurken bazı aktivitelere düşüşe neden olmuştur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile daha önce farklı *Taraxacum* türleri ile yapılan antikarsinogenez çalışmalarının sonuçları ile uyum göstermektedir. *T. farinosum* ve *T. mirabile* ekstralarının çerçeve kayması ve baz çifti mutasyonuna neden olan mutajenlere karşı doğal antimutajenik ajanlar olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Antioksidan Kapasite

Antioksidan kapasite üzerine literatürlerde çok fazla sayıda yöntem tanımlanmış olmasına rağmen antioksidan kapasiteyi tümüyle yansıtan tek bir yöntem henüz mevcut değildir. Bu bağlamda, farklı mekanizmalara sahip yöntemler kullanılarak ortaya çıkan tablonun yorumlanması ile antioksidan kapasite hakkında daha doğru bir yargıya ulaşılabileceği belirtilmektedir(25). Bu amaçla çalışmamızda *Taraxacum* türlerinin metanol ekstralarının antioksidan kapasitesi için, serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH testi), indirgeme gücü (CUPRAC ve FRAP testleri) ve fosfomolibdat testleri kullanıldı. Ayrıca ekstraların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri de hesaplandı. Antioksidan kapasite sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir. Antioksidan kapasite sonuçlarına bakıldığında *T. mirabile* metanol ekstresinin daha güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu söylenebilir. Örneğin, DPPH radikali süpürücü aktivitesi *T. mirabile* için 48.63 mgTE/g ekstre iken bu değer *T. farinosum* için 38.33 mgTE/g ekstre dir. DPPH radikali bitkisel ekstraların veya sentetik bileşiklerin radikal süpürme aktivitelerinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan radikaldır ve antioksidan bileşiklerin DPPH radikale hidrojen veya elektron aktarması sonucu mor renkli radikalin rengindeki açılmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. İndirgeme gücü antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir ve bu amaçla CUPRAC ve FRAP testleri gerçekleştirilmiştir. İndirgeme gücü açısından da her iki test sisteminde *T. mirabile* (CUPRAC için 85.21 mgTE/g ekstre ve FRAP için

58.87 mgTE/g ekstre) *T. farinosum*'a (CUPRAC için 64.46 mgTE/g ekstre ve FRAP için 34.03 mgTE/g ekstre) kıyasla daha aktiftir. Fosfomolibdat testi son yıllarda kullanılan reaktiflerinin ucuzluğu ve basitliğinden dolayı sıklıkla kullanılan testlerden biridir. Test sisteminde asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesi ve oluşan kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Diğer antioksidan test sistemlerini doğrular nitelikte, bu test sisteminde *T. mirabile* daha güçlü etkinliğe sahiptir. Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit içerikleri sırasıyla Folin-Ciocalteu ve AlCl₃ yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Her iki içerik açısından da *T. mirabile* ekstresi daha zengindir. Toplam fenolik içerik *T. mirabile* ekstresinde

23.43 mgGAE/g iken *T. farinosum*'da 17.54 mgGAE/g olarak bulundu. Benzer şekilde toplam flavonoid içerik *T. mirabile* için 4.58 mgRE/g iken *T. farinosum*'ün 3.37 mgRE/g olarak tespit edilmiştir. Bu noktadan hareketle, *T. mirabile* için gözlenen güçlü antioksidan aktivite fenolik bileşiklerin daha yüksek miktarda bulunması ile açıklanabilir. Fenolik bileşikler antioksidanların en önemli gruplarından biri olup bünyelerinde bulundukları hidroksil grupları ve kararlı kimyasal yapıları ile güçlü antioksidan etkinliklere sahiptirler (26). Yapılan birçok çalışmada toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite arasında güçlü bir pozitif korelasyonun varlığı ortaya konulmuştur (27-29). Çalışmamızın sonuçları da bu durumu doğrular niteliktedir.

Tablo 3. *Taraxacum* türlerinin metanol ekstrelerinin antioksidan özellikleri

Antioksidan parametreler	<i>T. mirabile</i>	<i>T. farinosum</i>
Toplam fenolik içerik (mgGAE/g ekstre)	23.43±0.35*	17.54±0.23
Toplam flavonoit içerik (mgRE/g ekstre)	4.58±0.20	3.37±0.07
DPPH radikal süpürücü aktivitesi (mgTE/g ekstre)	48.63±0.16	38.33±0.70
CUPRAC aktivitesi (mgTE/g ekstre)	85.21±0.78	64.46±2.19
FRAP aktivitesi (mgTE/g ekstre)	58.87±0.97	34.03±1.04
Fosfomolibdat aktivitesi (mgTE/g ekstre)	148.56±4.43	102.03±1.44

* Üç paralel ölçümün ortalaması ± standart sapma. GAE: gallik asit eşdeğeri; RE: rutin eşdeğeri; TE: trolox eşdeğeri

Literatür taraması yapıldığında *Taraxacum* üyelerinden özellikle *T. officinale*'nin antioksidan özellikleri bazı araştırmacılar tarafından değerlendirilmiştir. Hagymási ve ark. (30), *T. officinale* ekstresinin Wistar farelerinin karaciğer mikrozomal enzimleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Karaciğer mikrozomları, NADPH ve ADP-Fe²⁺ varlığında inkübe edildiklerinde lipid peroksidasyona karşı aşırı duyarlıydılar. Hem kök hem de yaprak ekstreleri, enzimatik olarak indüklenmiş lipid preoksidasyonu azaltmış ve NADPH varlığında ve yokluğunda sitokrom c'yi indirgemişlerdir. Araştırmacılar bir diğer çalışmalarında, bitkinin liyofilize edilmiş kök ve yaprak ekstrelerinin; hidrojen verme yeteneği,

indirgeyici güç özelliği, radikal süpürme kapasitesini ortaya koymuşlardır. Yüksek polifenol içeriğinden dolayı yaprak ekstresi, kök ekstresi ile kıyaslandığında hidrojen vericiliği, hidrojen peroksit süpürme kapasitesi ve indirgeyicilik yönünden daha etkili bulunmuştur (31).

Popovic ve ark. (32), *T. officinale* bitkisinin çeşitli ekstrelerini antioksidan/pro-oksidan aktiviteleri yönünden değerlendirmişlerdir. Bitkinin kök, gövde, yaprak ve çiçek ekstreleri hem CCl₄ veya fullerenol ile kombine edilmiş hem de tek başlarına, Fe²⁺ ve askorbik asit ile indüklenmiş lipozomal lipid peroksidasyon yönünden incelenmiştir. CCl₄ ile kombine edilmiş çiçek etil asetat ekstresi, hem

tek hem CCl₄ ile kombine edilmiş gövde su ve kloroform ekstresi ve hem CCl₄ ile kombine edilmiş hem de edilmemiş kök su ekstresi hariç geri kalan ekstrelerde antioksidan aktivite gözlenmiştir. Fullerenol, bütün kombine edilen ekstrelerde antioksidan aktivite göstermiştir. Hu ve Kitts (33) çalışmalarında, *T. officinale* çiçek ekstresinin özellikle de etil asetat fraksiyonunun, reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürdüğünü ve *in vitro* olarak DNA'yı ROS indüklenmiş zarardan koruduğunu ortaya koymuşlardır. Oksidatif stresin engellenme nedeni olarak luteolin ve luteolin 7-O-glukozit gösterilmiştir. Başka bir çalışmada Kaurinovic ve ark. (34), hidroksil radikalleri üretiminin en etkili inhibisyonunun, *T. officinale* çiçek etil asetat ve su ekstreleri ile kök su ekstresi tarafından gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Belirgin bir inhibitör etki yaprak ekstrelerinde de gözlenmiştir.

SONUÇ

Günümüzde değişen hayat şartları ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak çeşitli hastalıkların toplumdaki yaygınlığı büyük oranda artış göstermiştir. Bu noktadan hareketle alternatif tedaviler ve bu tedaviler için yeni kaynaklar büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda bitkiler veya bitkisel ürünler alternatif tedaviler için essiz bir kaynaktır. Çalışmamızın sonucunda tıbbi özelliği uzun yıllardır bilinen *Taraxacum* cinsine ait iki türün antioksidan, mutajenik ve antimutajenik özellikleri ortaya konulmuştur. Çalışılan örneklerin mutajenik etkilere sahip olmamaları bunun yanında orta ve yüksek derecede antimutajenik ve orta derecede antioksidan özelliklere sahip olmaları bu bitkilerin doğal ajanların (güvenli antimutajenik ve antioksidan) bir kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Natural two *Taraxacum* species effective against frameshift and base pair substitution mutations: mutagenic, antimutagenic and antioxidant evaluation

ABSTRACT

Plant or plant products have gained increasing importance in pharmacology and food industries in recent years due to their lower toxicity and side effects. The genus *Taraxacum* belonging to Asteraceae family have been used in traditional medicine since ancient times. In this study, antioxidant, mutagenic and antimutagenic properties of two *Taraxacum* species namely *T. mirabile* and *T. farinosum* were investigated. Antioxidant

properties were determined by different test systems including DPPH radical scavenging, reducing power (CUPRAC and FRAP assays) and phosphomolybdenum assays. Total phenolic and flavonoid contents were also reported. Mutagenic and anti-mutagenic activities were tested by Ames assay. It was seen that *Taraxacum* species have moderate antioxidant and antimutagenic activities ranging between moderate to strong. However, the species were found to be non-mutagenic. It was determined that total phenolic and flavonoid contents in *T. mirabile* (23.43 mgGAE/g extract and 4.58 mgRE/g extract) were higher than *T. farinosum* (17.54 mgGAE/g extract and 3.37 mgRE/g extract).

Keywords: *Taraxacum mirabile*, *Taraxacum farinosum*, antimutagenic, pharmaceuticals.

Kaynaklar

- Borris RP. Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company. J Ethnopharmacol 1996; 51: 29-38.
- Moerman DE. An analysis of the food plants and drug plants of native North America. J Ethnopharmacol 1996; 52: 1-22.
- Baytop T. Therapy with Medicinal Plants in Turkey; Today and in Future (in Turkish). Istanbul University Press, İstanbul. 1999.
- Ertürk Ö, Demirbağ Z. Scorzonare mollis Bieb (Compositae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. Çevre Koruma Derg 2003; 12: 27-31.
- Sweeney B, Vora M, Ulbricht C, Basch E. Evidence-based systematic review of dandelion (*Taraxacum officinale*) by natural standard research collaboration. J Herb Pharmacother 2005; 5: 79-93.
- Grainger Bisset N, Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, Germany. 2001.
- Hernandez-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaria L, Roman-Ramos R, Chavez-Miranda AA, Garcia-Vega LM, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. Proc West Pharmacol Soc. 2002;45:118-24.
- Ertas O, Aktas H, Haznedaroglu M. Analysis of sodium and potassium levels in *Taraxacum officinale* by flame emission photometry. Acta Pharm Turc 2005; 47: 127-30.
- Leu YL, Wang YL, Huang SC, Shi LS. Chemical constituents from roots of *Taraxacum formosanum*. Chem Pharm Bull 2005; 53: 853-5.
- Schutz K, Carle R, Schieber A. *Taraxacum* - A review on its phytochemical and pharmacological profile. J Ethnopharmacol 2006; 107: 313-23.
- Leung AY. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. Wiley, 1980.
- Rivera-Nunez D. *Taraxacum vulgare* (Lam.) schrank on *T. officinale* Weber. Incafo Madrid. 1991. pp. 35-46.
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 2006; 27: 1-93.
- Dean BJ, Brooks TM, Hodsonwalker G, Hutson DH. Genetic Toxicology Testing of 41 Industrial-Chemicals. Mutat Res 1985; 153: 57-77.

15. Maron DM, Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
16. Uysal A, Lazarova I, Zengin G, Gunes E, Aktumsek A, Gevrenova R. New Perspectives on *Asphodeline lutea* from Bulgaria and Turkey: Anti-mutagenic, Anti-microbial and Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity. *Brit J Pharm Res* 2016; 10:1-10
17. Zengin G, Uysal A, Gunes E, Aktumsek A. Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. *Plos One* 2014; 9: 1-13.
18. Uysal A, Gunes E, Sarikurkcü C, Celik H, Durak Y, Uren MC. New Prospective Materials for Chemoprevention: Three *Phlomis*. *Brit J Pharm Res* 2016; 10: 1-13.
19. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003; 80: 393-7.
20. Zengin G, Sarikurkcü C, Aktumsek A, Ceylan R. *Sideritis galatica* Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's and diabetes mellitus. *J Funct Foods* 2014; 11: 538-47.
21. Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. I. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 602-5.
22. Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, Masuda K, Arai Y, Shiojima K, Ageta H. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 606-10.
23. Choi JH, Shin KM, Kim NY, Hong JP, Lee YS, Kim HJ, Park HJ, Lee KT. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum* NAKAI, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1446-50.
24. Ko SG, Koh SH, Jun CY, Nam CG, Bae HS, Shin MK. Induction of apoptosis by *Saussurea lappa* and *Pharbitis nil* on AGS gastric cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1604-10.
25. Wong SP, Leong LP, Koh JHW. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem* 2006; 99: 775-83.
26. RiceEvans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20: 933-56.
27. Bi W, Shen J, Gao Y, He C, Peng Y, Xiao P. Ku-jin tea (*Acer tataricum* subsp. *ginnala* or *A. tataricum* subsp. *theiferum*), an underestimated functional beverage rich in antioxidant phenolics. *J Funct Foods* 2016; 24: 75-84.
28. Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chem* 2016; 208: 228-38.
29. Yasir M, Sultana B, Nigam PS, Owusu-Apenten R. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC-ESIMS/MS identification of phenolic components. *Food Chem* 2016; 199: 307-13.
30. Hagymási K, Blázovics A, Feher J, Lugasi A, Kristó ST, Kéry A. The in vitro effect of dandelions antioxidants on microsomal lipid peroxidation. *Phytother Res* 2000; 14: 43-4.
31. Hagymási K, Blázovics A, Lugasi A, Kristó ST, Fehér J, Kéry Á. In vitro antioxidant evaluation of dandelion (*Taraxacum officinale* WEB.) water extracts. *Acta Aliment Hung* 2000; 29: 1-7.
32. Popovic M, Kaurinovic B, Mimica-Dukic N, Vojinovic-Miloradov M, Dordevic A. Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal lipid peroxidation. Part 3. Dandelion extract-CCl4/fullerenol. *Oxid Commun* 2001; 24: 335-43.
33. Hu C, Kitts DD. Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent-fractionated dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 301-10.
34. Kaurinovic B, Popovic M, Cebovic T, Mimica-Dukic N. Effects of *Calendula officinalis* L. and *Taraxacum officinale* Weber(Asteraceae) extracts on the production of OH radicals. *Fresen Environ Bull* 2003; 12: 250-3.