
Araştırma Makalesi / Research Article

***Plumbago europaea* L.'nin Besi Ortamındaki *Saccharomyces cerevisiae* Üzerine Etkileri**

Burak BİRCAN^{1*}, Sevda KIRBAĞ²

¹Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye
²Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

Özet

Plumbaginaceae ailesinin bir üyesi olan *P. europaea*, antibakteriyal, antifungal, antikanser ve antimutajenik özellik gösteren medikal bir bitkidir. Bu çalışma *S. cerevisiae* kültür ortamında oluşturulan oksidatif strese karşı *P. europaea* özütünün antioksidan etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* besiyerinde çoğaltıldı ve oksidatif stres oluşturmak amacıyla ortama H₂O₂ + FeCl₂ (bitki grubuna H₂O₂ + FeCl₂ ilave olarak *P. europaea* özütü (PLM)) eklendi. *P. europaea*'nın maya kültür ortamında oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu etkisi malondialdehit (MDA) seviyesi, glutatyon, total protein ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini ölçülerek belirlendi. Bitki özütü eklenen grupta MDA ve total protein seviyeleri reaktif grubuna (FR) kıyasla arttı ancak glutatyon miktarı anlamlı seviyede azaldı (p<0.05). Sodyum dodesil sülfatlı-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-Page) analizinde ise SOD ve katalaz (CAT) miktarının FR grubuna kıyasla azaldığı tespit edildi. Çalışma sonuçlarımız *P. europaea*'nın maya kültürü üzerine oksidan etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu etkinin nasıl meydana geldiği veya maya üzerine hangi bileşiklerin toksik etki gösterdiğini belirlemek için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *Plumbago europaea*, *Saccharomyces cerevisiae*, antioksidan aktivite, toplam protein

The Effect of *Plumbago europaea* L. on *Saccharomyces cerevisiae* in Medium

Abstract

The *P. europaea* is a medical plant having antibacterial, antifungal, anticancer and antimutagen characteristic as a member of Plumbaginaceae family. This study was achieved to determine the antioxidant effects of the *P. europaea* extract against oxidative stress to be formed in *S. cerevisiae* media. The *S. cerevisiae* that was used in the study, was proliferated in the medium and the media was added H₂O₂ + FeCl₂ (to the plant group H₂O₂ + FeCl₂ plus *P. europaea* extract (PLM)) to form the oxidative stress. The protective effect of the *P. europaea* against oxidative stress to be formed in yeast culture media was determined by measuring the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione, total protein and superoxide dismutase (SOD). The levels of MDA and total protein in the group that was added plant extract, with compare to the reactive group (FR), however the amount of the glutathione significantly decreased (p<0.05). The sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis indicated that the SOD and catalase (CAT) amounts were seen to be reduced with compare the FR group. The conclusions of our study indicate that *P. europaea* has oxidant effects on yeast culture. There are more comprehensive studies to be done to explain how this effect occur or which compounds have toxic effects on the yeast.

Keywords: *Plumbago europaea*, *Saccharomyces cerevisiae*, antioxidant activity, total protein

*Sorumlu Yazar: burak.bircan@gmail.com

1. Giriş

Dünya nüfusunun yaklaşık %80'i sağlığına kavuşmak için geleneksel tıbbi ve tıbbi bitkileri kullanmaktadır [1]. Bitkilerin tedavi edici özelliklerini belirlemek üzere birçok ön çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde literatürde en çok karşılaşılanlar ise oksidatif stres çalışmalarıdır [2-4]. Plumbaginaceae familyasında yer alan *P. europaea*, çok yıllık çiçekli bir bitkidir. Yapılan çalışmalar *P. europaea*'da plumbagin, hidropalumbagin ve mirisetin-3-O-glukozid maddelerinin bulunduğunu göstermektedir [3].

Plumbagin maddesinin antibakteriyal, antifungal, antikanser, antimutajenik ve antioksidan, anti-leishmanial, anti-plasmodial, anti-alerjik ve aynı zamanda da toksik etkilerinin olduğu bildirilmektedir [5].

Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için besinlerin antioksidan etkilerinin bilinmesi önemlidir. Son yıllarda gerçekleştirilen maya kültürü oksidatif stres çalışmaları genellikle *S. cerevisiae* üzerine yoğunlaşmakta ve bu mikroorganizma üzerine yapılan çalışmalar referans olarak kabul edilmektedir [6]. Bu çalışmada, *P. europaea*'nın kültür ortamında ki antioksidan etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan *P. europaea* Elazığ ilinden toplandı. Bitki örneği için 1/5 (g/mL) oranında %80'lik metanol özütü hazırlandı.

Kültür ortamında antioksidan etkinin belirlenmesi amaçlandı ve bu amaçla deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae* FMC16'nın gelişimi ve çoğalması için Malt Ekstrakt Buyyon (MEB) (17 g/L) besiyeri ortamı hazırlandı. Çalışmada aşağıdaki gruplar oluşturuldu:

Kontrol Grubu: Sadece MEB besiyeri ortamına *S. cerevisiae* ilave edildi.

FR Grubu: Kontrol grubundan farklı olarak, inkübasyonun 24. saatinde bu gruba $H_2O_2 + FeCl_2$ çözelti karışımı eklendi.

PLM Grubu: FR grubundan farklı olarak başlangıçta MEB besiyeri ortamı ve bitki ekstraktları ilave edildi.

Ayrıca 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, gruplara %4'lük butilhidroksitoluen (BHT) eklenerek santrifüj edildi. Pellet, fosfat tamponu (pH: 7.4) ile yıkandı ve üzerine 3 mL TAE (0.03 M Tris, 114 µL asetik asit, 0.5 M EDTA) tamponu ilave edilerek 40 s sonikasyon yapıldı. İşlem sonrasında +4°C'de 9000 rpm/10 dk santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımları glutatyon ve protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla tüplere alındı.

Maya kültürü protein miktarı Lowry vd.'ne [7] göre belirlendi. Standart olarak sığır serum albumin (Sigma-Aldrich, ABD) kullanıldı. Lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA, 2- thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonunu takiben spektrofotometre ile ölçüldü. MDA analizi için 1mL supernatant 1mL %6'lık TBA ile karıştırıldı ve üzerine 1mL %20'lik trikloroasetik asit eklenerek karışım 95°C'de 120 dk boyunca inkübe edildi. Analiz Pegg'in [8] yöntemine göre yapıldı ve sonuçlar nmol/mL maya olarak verildi.

Maya kültürünün glutatyon miktarı Ellman metoduna göre 412 nm'ye ayarlanmış UV-VIS spektrofotometrede belirlendi [9]. Bu amaçla bilinen glutatyon konsantrasyonlarında bir standart eğri grafiği hazırlandı ve sonuçlar bu grafiğe göre nmol/mg olarak hesaplandı.

Maya kültüründeki SOD ve CAT düzeyleri SDS-Page analizi yapılarak gösterildi [10]. Bu amaçla öncelikle maya hücreleri besi ortamından santrifüj edilerek toplandı ve Wang vd'nin [11] belirttiği metoda göre protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Jel kuyucuklarına protein markırı

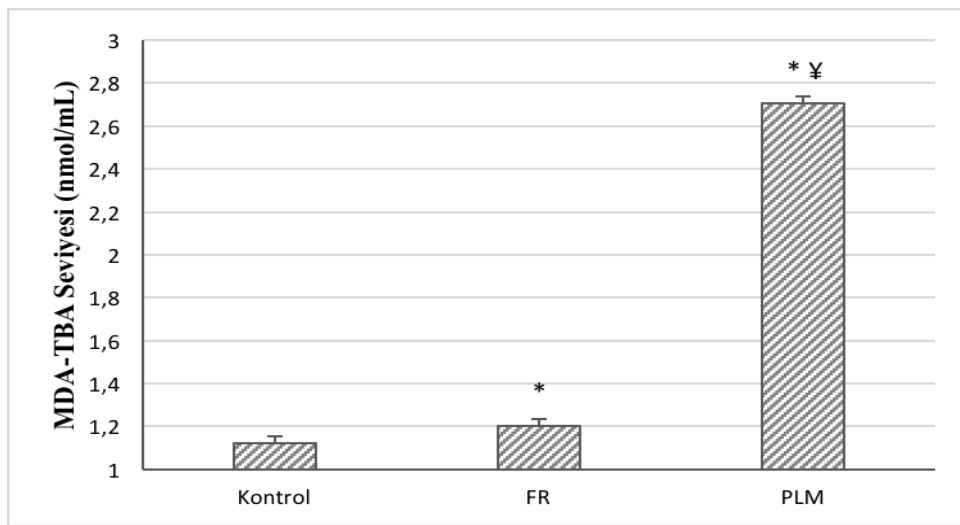
(Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker) ve örnekler (5:1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ oranında) yüklendi. Elektrophoresis işlemi jelin 20 mA'de koşturulması ile gerçekleşti.

İstatistik analizi için, SPSS 16.0 yazılımı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar Ortalama±Standart hata (SH) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklarda $p<0.05$ değeri kullanıldı.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Grupların MDA-TBA Seviyeleri

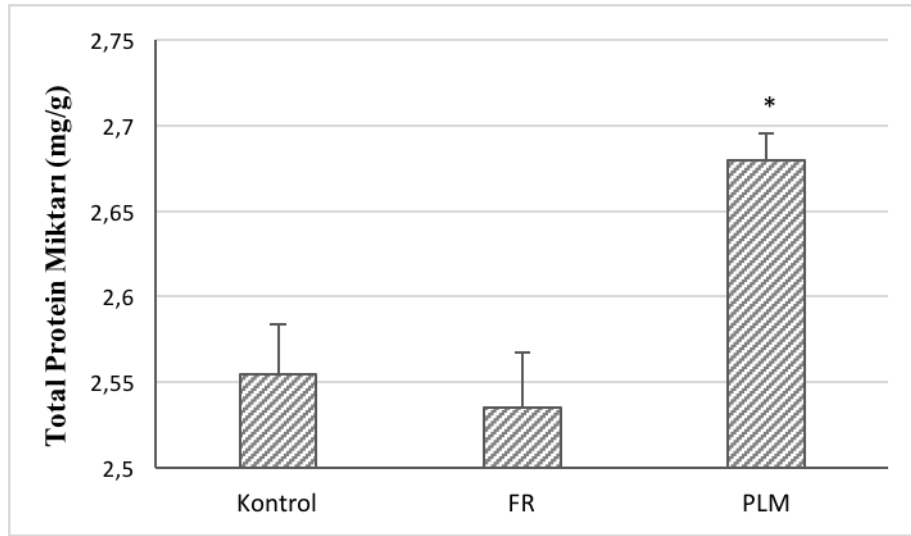
S. cerevisiae'da ki lipid peroksidasyon (LPO) miktarı kontrol grubuna kıyasla FR grubunda artış gösterdi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile PLM grubu LPO miktarı bakımından kıyaslandığında ise PLM olarak tespit edildi ($p<0.05$). *S. cerevisiae*'nın lipid peroksidasyon ürünlerinin çok düşük seviyelerde olduğu saptandı (Şekil 1). Bunun nedeninin *S. cerevisiae*'nin kullanılan radikallere karşı oldukça yüksek seviyede direnç oluşturmasından kaynaklanabileceği sonucuna varıldı. Bu durum aynı zamanda PLM grubunun yapısında bulunan bir maddenin maya hücresi üzerinde toksik etki göstererek LPO'yu arttırdığını da düşündürmektedir. Teshome vd. çalışmalarında *P. zeylanica*'nın toksik etki gösterdiğini bildirilmiştir [12]. Folmer vd. ise çalışmalarında *S. cerevisiae*'nin plazma membranlarının H_2O_2 'ye maruz kaldıktan birkaç dakika sonra hızlı bir şekilde geçirgenlik ve biyofizyolojik özelliklerini değiştirdiğini gözlemlemiş ve bu değişikliklerin lipid bileşimindeki değişimlerden kaynaklandığını ileri sürmüştür [13]. Hidrojen peroksitine karşı hücre zarının potansiyel geçirgenliği üzerine yağ asit sentetaz geni tarafından kodlanan yağ asidi sentezinin rolü incelenmiştir [14]. Maya hücresinin H_2O_2 'ye karşı yağ asidi sentaz aktivitesini arttırdığı, membran yağ kompozisyonunda ki bu artış hücrenin H_2O_2 geçirgenliğine direnç göstermesi ve canlılık halinin uzamasına neden olduğu sonucuna varılmıştır [14].



Şekil 1. Bitki özütünün *S. cerevisiae*'nin MDA-TBA seviyesi üzerine etkisi (nmol/mL). Deneyler farklı zamanlarda 5 tekrar olarak gerçekleştirildi. * $p<0.05$, kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, § $p<0.05$; FR grubuna kıyasla PLM grubu.

3.2. Grupların Toplam Protein Miktarları

Bitki özütünün maya hücresi üzerindeki total protein miktarı üzerine olan etkisi incelendiğinde Kontrol grubu ile FR grupları arasında herhangi bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 2). Kontrol grubuna göre PLM grubunun önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Vido vd. [15] yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae*'nin oksidatif stres oluşturulmak üzere verilen metallerle karşı direnç gösterdiğini, bunu da bazı proteinlerin sentezini artırırken bazı proteinlerin sentezini azaltarak gerçekleştirdiğini bildirmektedir. Bu durumun *S. cerevisiae*'nin ortamdaki reaktif direnç göstermesine dayandırılabilir. *P. europaea*'nin maya hücresi proteinlerini koruduğunu düşündürmektedir.



Şekil 2. Bitki özütünün *S. cerevisiae*'nin toplam protein miktarı üzerine etkisi (mg/g). Deneyler farklı zamanlarda 5 tekrar olarak gerçekleştirildi. * $p<0.05$; kontrol ve FR grubuna kıyasla PLM grubu

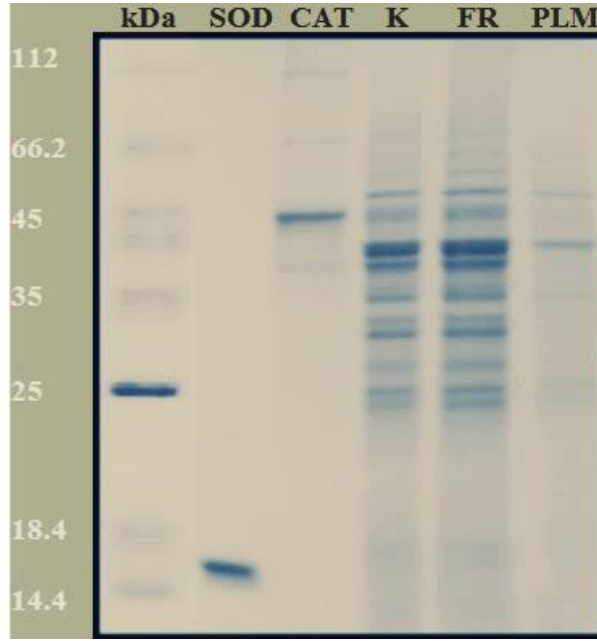
3.3. SOD, CAT ve Glutasyon Düzeyleri

SDS-Page jel görüntüsü değerlendirilecek olursa, jelde yer alan 2. ve 3. bant standart olarak yüklenen SOD ve CAT enzimleridir. Gruplarda ki SOD miktarını gösteren protein bandı kontrol ve FR gruplarında kısmen belirgindir. CAT miktarı kontrol grubuna kıyasla FR grubunda görülen protein bandının belirginliği bu enzimin ekspresyonun miktarının arttığını göstermektedir (Şekil 3). $FeCl_2+H_2O_2$ 'nin gruplarda enzimin ekspresyon düzeyini arttırdığı bantların belirgin olmasından anlaşılmaktadır. PLM grubunda protein bantlarının zayıflığı bu grupta ekspresyon düzeyinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Maya kültüründe gerçekleştirilen bir çalışmada H_2O_2 ve parakuat ilavesi ile oluşturulan oksidatif stres sonucu antioksidan enzim düzeyleri ve farklı hava basınçları altında organizmanın canlılık düzeyleri test edilmiştir [16]. Sonuç olarak SOD, CAT ve glutasyon redüktaz miktarlarının kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra artış gösterdiği belirlenmiştir [16].

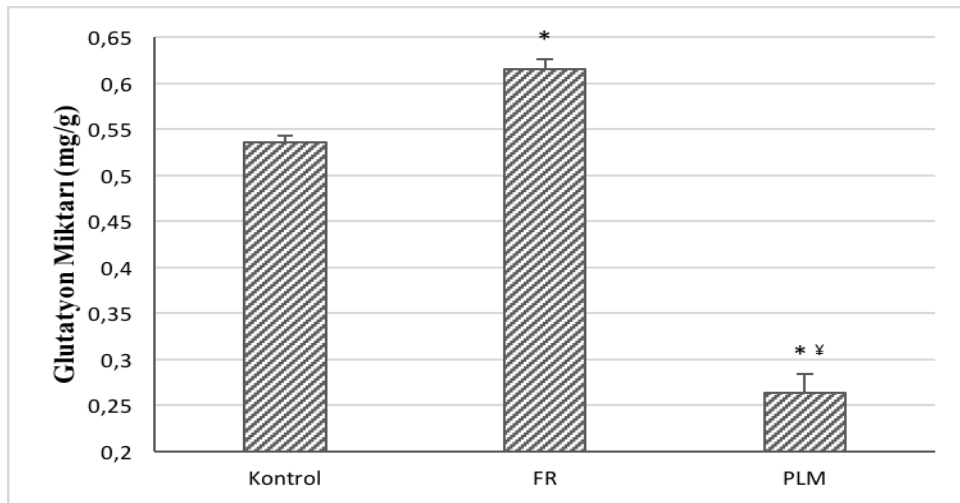
Glutasyon miktarları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında FR grubunda arttığı ($p<0.05$), PLM grubunda ise önemli ölçüde azaldığı ($p<0.05$) tespit edildi. PLM grubunda glutasyon düzeyi ise diğer gruplara kıyasla düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4). Izawa vd. [17] maya kültür ortamına eklenen H_2O_2 sonrası hücre içi glutasyon düzeyinin artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu artışın hücrelerin oksidatif strese karşı direnç oluşturmak amacıyla gerçekleştirdiklerini düşünmektedir

[17]. Diğer bir çalışmada ise *S. cerevisiae*'da oksidatif strese cevap olarak glutasyon biyosentezinin artış gösterdiği bildirilmektedir [18].

Oksidatif strese karşı bitki sekonder ürünleri olan flavonoid ve fitosteroller yararlı moleküllerdir. Yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin oksidatif stresi azaltarak, lipid peroksidasyon ürünlerini baskıladığı gösterilmiştir [19, 20]. Ancak bu çalışmada, bitki özütü eklenen grupta glutasyon, SOD ve CAT düzeylerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını belirledik. *P. europea* özütü içerisindeki toksik etki gösteren bileşiklerin bulunması [12], hücre antioksidan sistemini baskılayarak oksidasyon düzeyinde artışa neden olmuş olabilir. Bu durum sonucunda lipid oksidasyon düzeyinin artış gösterdiğini düşünmekteyiz.



Şekil 3. *S. cerevisiae*'nin SDS-Page analizi



Şekil 4. Bitki özütünün *S. cerevisiae*'daki glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g). Deneyler farklı zamanlar da 5 tekrar olarak gerçekleştirildi. * $p < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, † $p < 0.05$, FR grubuna kıyasla PLM grubu.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde 2119 no'lu proje ile mali desteğini sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne (FÜBAP), deneysel çalışmalarında sundukları laboratuvar imkânlarından dolayı Prof. Dr. Ökkeş Yılmaz ve Yrd. Doç. Dr. Abdullah Aslan'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS, 2011. Geçmisten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi, Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11 (1): 52-67.
2. Erden Y, Kırbağ S, Yılmaz Ö, 2013. Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Some Scorzonera Species, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 83 (2): 271-276.
3. Serrilli AM, Sanfilippo V, Ballero M, Sanna C, Poli F, Scartezzini P, Serafini M, Bianco A, 2010. Polar and antioxidant fraction of *Plumbago europaea* L., a spontaneous plant of Sardinia, Nat Prod Res, 24 (7): 633-9.
4. Yılmaz O, Ozsahin AD, Bircan B, Erden Y, Karaboga Z, 2010. Radical Scavenging Activity of the *Pistacia terebinthus* in Fenton Reagent Environment and Its Protective Effects on the Unsaturated Fatty Acids, Asian Journal of Chemistry, 22 (10): 7949.
5. Demma J, Hallberg K, Hellman B, 2009. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells, Toxicol In Vitro, 23 (2): 266-71.
6. Navarrete C, Siles A, Martinez JL, Calero F, Ramos J, 2009. Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*, FEMS Yeast Res, 9 (4): 582-90.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, J Biol Chem, 193 (1): 265-75.
8. Pegg RB, 2001. Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products, Current protocols in food analytical chemistry, 1-18.
9. Ellman GL, 1959. Tissue sulfhydryl groups, Arch Biochem Biophys, 82 (1): 70-7.
10. Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227 (5259): 680-5.
11. Wang KK, Posner A, Hajimohammadreza I, 1996. Total protein extraction from cultured cells for use in electrophoresis and western blotting, BioTechniques, 20 (4): 662-668.
12. Teshome K, Gebre-Mariam T, Asres K, Perry F, Engidawork E, 2008. Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine, Journal of Ethnopharmacology, 117 (2): 236-248.
13. Folmer V, Pedroso N, Matias AC, Lopes SCDN, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS, 2008. H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1778 (4): 1141-1147.
14. Matias AC, Pedroso N, Teodoro N, Marinho HS, Antunes F, Nogueira JM, Herrero E, Cyrne L, 2007. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂, Free Radic Biol Med, 43 (10): 1458-65.
15. Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J, 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 276 (11): 8469-8474.

16. Pinheiro R, Belo I, Mota M, 2002. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (6): 842-847.
17. Izawa S, Inoue Y, Kimura A, 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 368 (1): 73-76.
18. Penninckx M, 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (9-10): 737-742.
19. Yang D, Wang XY, Gan LJ, Zhang H, Shin JA, Lee KT, Hong ST, 2015. Effects of flavonoid glycosides obtained from a *Ginkgo biloba* extract fraction on the physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions prepared from a stripped structured lipid with a low omega-6 to omega-3 ratio, *Food Chemistry*, 174: 124-131.
20. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7): 933-956.

Geliş Tarihi: 04/06/2015

Kabul Tarihi: 19/10/2015