



## Kola Özütünün Farklı Dozlarının *Caenorhabditiselegans* Bireylerinde Yaşam Süresi, Yumurtadan Çıkma Oranı ve Fiziksel Büyüme Üzerine Etkileri

Necati ÖZPINAR<sup>1\*</sup>, Şifa TÜRKÖĞLU<sup>2</sup>, Şeker DAĞ<sup>2</sup>, Hülya ÖZPINAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>3. Ordu B Tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı, Erzincan, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas, TÜRKİYE

Received: 09.07.2013; Accepted: 06.08.2013

**Özet.** Bu çalışmada kola endüstrisinde kullanılan kola özütünün *Caenorhabditiselegans*'in (*C. elegans*) yaşam süresi, yumurtadan çıkma oranı ve fiziksel büyüme üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kola özüt solüsyonları (1 gr/100 ml, 2 gr/100 ml, 6 gr/100 ml, 10 gr/100 ml) *C. elegans* standart besiyerine uygulanmıştır. Kola özütü içeren deney grupları kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalarda *C. elegans* bireylerine uygulanan tüm dozların yaşam süresi ve yumurtadan çıkma oranını kontrol grubuna göre azalttığı bulunmuştur. Ayrıca, bu maddenin *C. elegans* bireylerinin fiziksel büyümeleri üzerine de etkili olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Caenorhabditiselegans*, Kola, Yaşam Süresi

## The Effects On Lifespan of *Caenorhabditis elegans*, Hatching Rate and Physical Growth to Different Doses of Cola Extract

**Abstract.** In this study effects of cola extract which is used in cola industry were investigated on *Caenorhabditiselegans*'s lifespan, hatching rate and physical growth. The cola extract solutions prepared in different concentrations (1 gr/100 ml, 2 gr/100 ml, 6 gr/100 ml, 10 gr/100 ml) have been applied to the *C. elegans* standart medium. The experimental groups which are consist of cola extract were compared with control groups. It was found that all doses used in these comparisons on *C. elegans* individuals were found to reduces the life span and hatching rate compared to the control group. In addition, it was observed that the substance effected on physical growth of *C. elegans* individuals.

**Keywords:** *Caenorhabditiselegans*, Cola, Lifespan

### 1. GİRİŞ

Kola ilk olarak yaşadığı dönemde saygın bir eczacı olan J.S. Pemberton tarafından evinde şurup olarak bulunmuştur ve bunun formülü dünyanın en gizli sırrı olarak 125 yıldan fazla süredir saklanmaktadır. Kolanın temel içeriği yüksek oranda fruktoz şekeri, kafein, boya maddeleri, tatlandırıcılar, lezzet artırıcılar, karbondioksit gazı ve kola özütünden meydana gelmektedir. Bugün kola dünya çapında çok fazla tüketilen bir içecek haline gelmiştir. Çocuk ya da erişkin her yaşta insan bu içeceğe rahatlıkla ulaşabilmekte sınırsızca tüketebilmektedir. Peki kola görüldüğü kadar masum bir içecek midir?

\* Corresponding author. Email address: necatiozpinar@gmail.com

## Kola Özütünün Farklı Dozlarının *Caenorhabditiselegans* Bireylerinde Yaşam Süresi

Birçok araştırmacı tarafından yapılan farklı çalışmalarda kolanın zararlı etkileri gösterilmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır; Jacopson [1], yaptığı çalışmada düzenli olarak kola tüketen kişilerde kalsiyum, magnezyum, askorbik asit, riboflavin ve A vitamininin düşük miktarlarda emildiğini göstermiştir. Ayrıca içeriğinde yer alan kafeinden dolayı bağımlılık yapabildiği, özellikle kadınlarda osteoporeze[2], çocuklarda içeriğindeki asitten dolayı diş erezyonlarına[3] neden olabildiği bildirilmiştir. Yüksek miktardaki fruktoz şekeri ve diğer tatlandırıcıların varlığının ise obezite ve şeker hastalığına yol açabildiği belirtilmiştir [4]. Yine yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada kolanın içeriğinde yer alan benzoikasitin (gıda koruyucu olarak kullanılıyor) de toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [5].

Yapılan literatür taramalarında kola özütü ile gerçekleştirilmiş bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada kola özütünün *Caenorhabditiselegans*(*C. elegans*) da yaşam süresi, yumurtadan çıkma oranları ve fiziksel büyüme üzerine olan etkilerinin çalışılması amaçlanmıştır. Model organizma olarak kullanılacak olan *C. elegans* zamanlarda yapılan birçok bilimsel çalışmalarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [6-9]. 1mm boyunda toprakta yaşayan apatojen bir nematottur. Kısa yaşam süresine (ortalama 14-20 gün 20°C ta) sahip olduğundan yaşlanma çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır [5, 10].Genom dizisi saptanan ilk hayvandır. Yaklaşık 20.000 civarında geni ve toplamda 6 kromozomu vardır. Bu genlerin önemli bir kısmı insan genlerine büyük benzerlik gösterdiği saptanmıştır [11].

## 2. MATERYAL METOT

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 MgSO<sub>4</sub>(1M), 1 mLCholesterol (5 mg/mL), 1 mL CaCl<sub>2</sub> (1M), 25 mLKPO<sub>4</sub> tampon (pH:7)besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Çalışma için besiyerinekola özütü ayrı ayrı eklenmiştir (1 gr/100 ml, 2 gr/100 ml, 6 gr/100 ml, 10 gr/100 ml). Hazırlanan Nematotgrowthmedia (NGM) petri kutularına yeteri kadar aktarılmış ve katılaştıktan sonra hazırlanan *Escherichiacoli* OP50 suşu NGM' a eklenerek steril kabinde kurutulmuştur. Kontrol grubu kola özütü eklenmemiş besiyerinde beslenmiştir.

Yaşam süresi analizinde; kullanılacak NGM' ler yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Ancak yaşam süresi analizi süresince *C. elegans*' ların yumurta gelişimini önlemek amacıyla NGM'a hazırlama aşamasında fluorodeoxyuridine (FUDR) eklenmiştir. Senkronizasyonu yapılmış *C. elegans*' lardankola özütünün farklı dozları (1 gr/100 ml, 2 gr/100 ml, 6 gr/100 ml, 10 gr/100 ml) ile hazırlanmış her bir petriye 20' şer adet aktarılmıştır. Bütün petrilerdekiC.

*elegans*'lar ölene kadar her gün aynı saatte canlı hayvanlar sayılmış ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Yumurta verimi analizinde; içinde FUDR bulunmayan NGM ler kullanılmıştır. Yumurta sayımı Koelle [12] protokolüne göre yapılmıştır. Buna göre kola özütünün farklı dozları (1 gr/100 ml, 2 gr/100 ml, 6 gr/100 ml, 10 gr/100 ml) ile hazırlanmış her bir petriye 25 adet iyi beslenen L4 *C. elegans* aktarılmıştır. 36 saat sonra bunların 20 tanesi yeni bir petriye aktararak, 20 °C'de 30 dak. 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 amacıyla hazırlanan ve aynı dozlarda kola etken maddesi içeren NGM içerisine flurodeoxyuridine (FUDR) eklenmeyerek petrilere eşit miktarda *C.elegans* yumurtası ilave edilmiştir. İçerlerinde 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 belirlenip SPSS programı ile gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

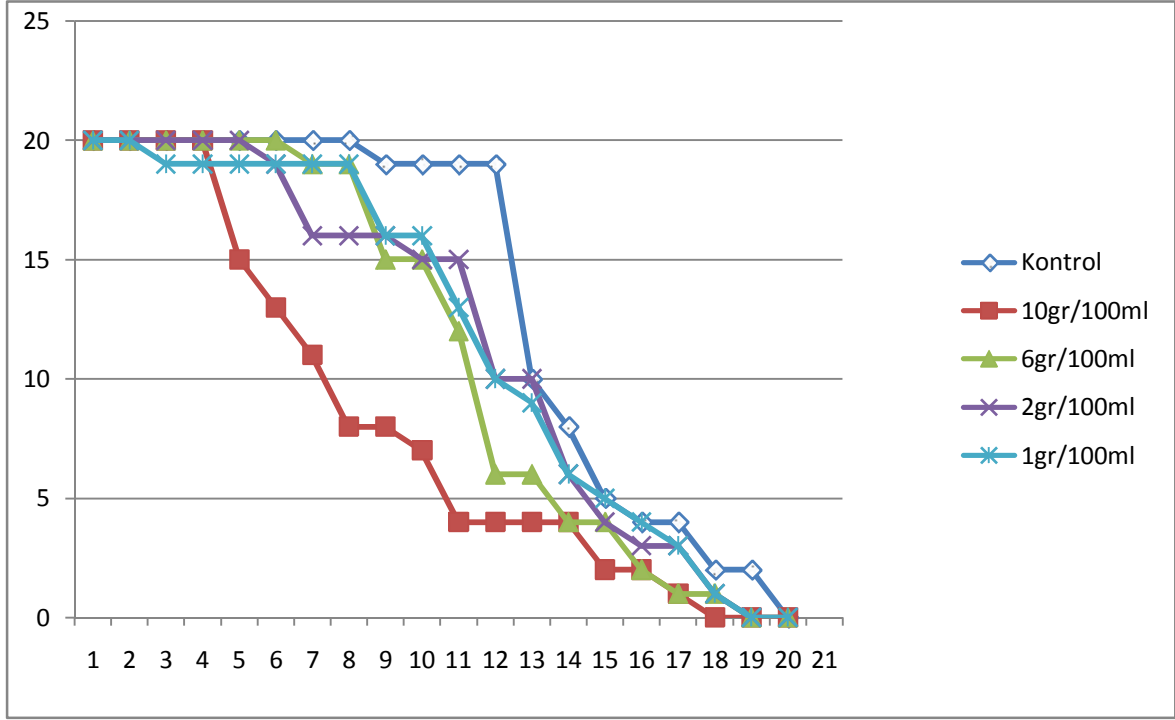
Kola özütünün farklı dozlarının *C. elegans* besiyerine uygulanması sonucu elde edilen ergin ve L1 formuna ait yaşam süresi oranları, yumurtadan çıkma oranları ve fiziksel büyümeye ilişkin veriler Tablo 1-3 ve Şekil 1-3 de görülmektedir.

**Tablo 1.** Kola özütü ile muamele edilen ergin *C. elegans*'da ömür uzunluğu oranları

Gruplar	Ortalama ± Standart hata	p
KONTROL – 1gr/100ml	1,619 ± 2,201	0.003*
KONTROL – 2gr/100ml	1,761 ± 2,256	0,002*
KONTROL – 6gr/100ml	2,238 ± 3,144	0,004
KONTROL – 10gr/100ml	5,142 ± 5,198	0,000*
1gr/100ml – 2gr/10ml	0,142 ± 1,195	0,590
1gr/100ml – 6gr/10ml	0,619 ± 1,359	0,050
1gr/100ml – 10gr/100ml	3,523 ± 3,789	0,000*
2gr/100ml – 6gr/100ml	0,476 ± 1,806	0,241
2gr/100ml – 10gr/100ml	3,380 ± 3,499	0,000*
6gr/100ml – 10gr/100ml	2,904 ± 3,686	0,002*

\* Ortalama değerler p<0,05 için önemlidir

## Kola Özütünün Farklı Dozlarının *Caenorhabditiselegans* Bireylerinde Yaşam Süresi



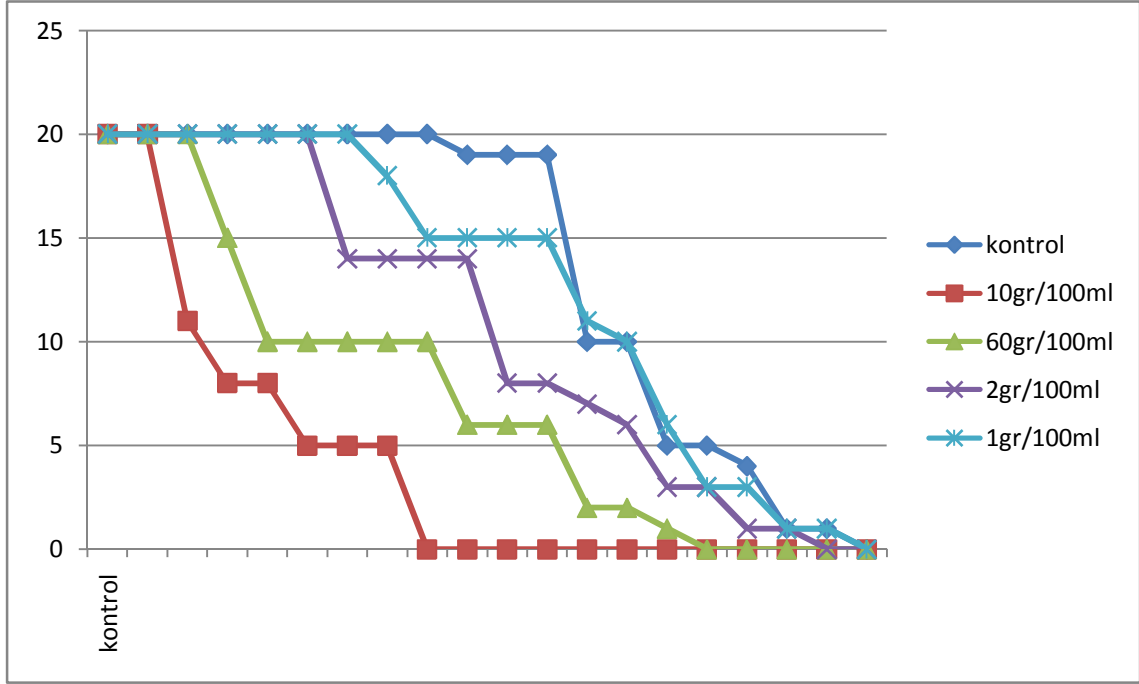
Şekil 1. Kola özütünün farklı dozlarının ergin *C. elegans* bireylerinde yaşama uzunluğu üzerine etkisi

Tablo 1 ve Şekil 1 de ergin *C. elegans* bireylerinde kola özütünün doz artışına bağlı olarak ömür uzunluğunda bir azalmanın olduğu görülmektedir. Bu azalmanın doz artışına paralel olduğu söylenebilir.

Tablo 2. Kola özütü ile muamele edilen *C. elegans* 'ın L1 formu ömür uzunluğu oranları

Gruplar	Ortalama ± Standart hata	p
KONTROL – 1gr/100ml	1,000 ± 1,835	0,025*
KONTROL – 2gr/100ml	3,000 ± 3,539	0,001*
KONTROL – 6gr/100ml	6,250 ± 4,799	0,000*
KONTROL – 10gr/100ml	9,550 ± 7,148	0,000*
1gr/100ml – 2gr/10ml	2,000 ± 2,492	0,002*
1gr/100ml – 6gr/10ml	5,250 ± 3,945	0,000*
1gr/100ml – 10gr/100ml	8,550 ± 6,082	0,000*
2gr/100ml – 6gr/100ml	3,250 ± 3,160	0,000*
2gr/100ml – 10gr/100ml	6,550 ± 5,246	0,000*
6gr/100ml – 10gr/100ml	3,300 ± 3,310	0,000*

\* Ortalama değerler  $p < 0,05$  için önemlidir



**Şekil 2.** Kola özütünün farklı dozlarının L1 formu *C. elegans* bireylerinde yaşama uzunluğu üzerine etkisi

Kola özütünün L1 formu *C. elegans* bireylerinin ömür uzunluğunda daha etkili olduğu Tablo 2 ve şekil 2 de görülmektedir. Yine bu grupta da azalma doz artışına paralel olarak gerçekleşmektedir.

Aynı maddenin farklı dozlarının *C. elegans*'da yumurtadan çıkma oranlarına etkisi incelendiğinde ise kontrol grubu ile en yüksek doz olan 10 gr/ 100 ml lik grup arasında yarı yarıya bir azalmanın olduğu görülmüştür (Tablo 3).

**Tablo 3.** Kola özütü ile muamele edilen *C. elegans* 'da yumurtadan çıkma oranları

Doz	Yumurtadan çıkma oranları (%)
Kontrol	92
1 gr /100 ml	90
2 gr /100 ml	88
6 gr /100 ml	85
10 gr /100 ml	40

## Kola Özütünün Farklı Dozlarının *Caenorhabditiselegans* Bireylerinde Yaşam Süresi

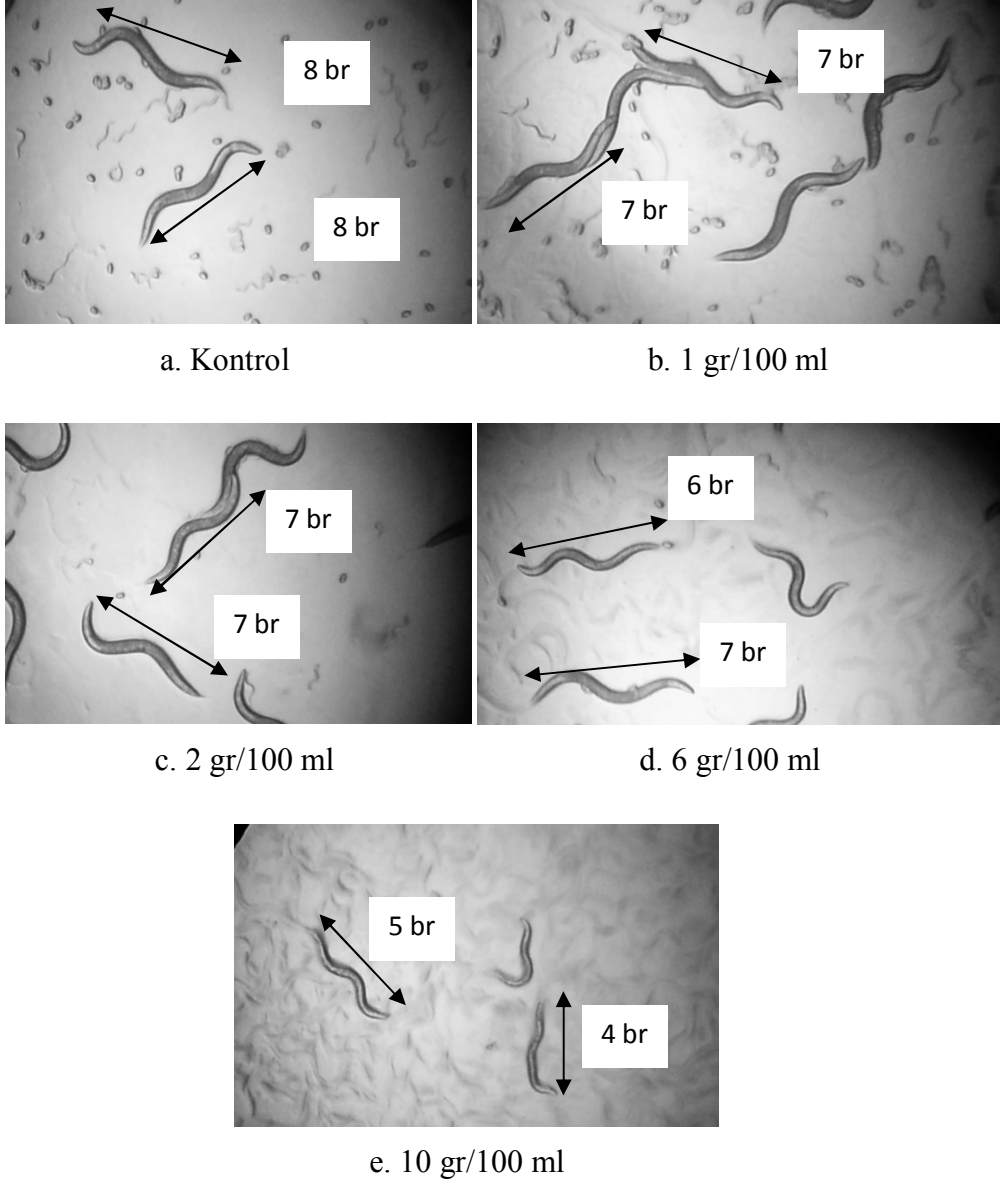
*C. elegans* bireylerinde fiziksel büyüme üzerine kola özütünün etkileri incelendiğinde doz artışına paralel olarak bireylerde fiziksel olarak büyümenin baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 3).

Bu çalışmada 6 gr/100ml ve 10 gr/100ml dozlarında kola etken maddesi içeren NGM ler içerisine aktarılan yetişkin *C.elegans*' ların yaşam süresinde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde bir azalma gözlemlenmiştir. Daha düşük dozlarda kontrol grubuyla bir fark oluşmamıştır. Yine aynı dozlarda NGM ler üzerine 100'er adet yumurta bırakılması sağlandığında yumurtalardan yavruların yukarıda belirtilen oranlarda çıktığı fakat yumurtadan çıkan yavrularda 3. günün sonunda belirgin düzeyde fiziksel büyüme geriliği olduğu saptanmıştır.

Kola ve kolalı içecekler zamanla dünyada en fazla tüketilen içecek haline gelmiştir. Bundan dolayı kolayla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Literatürde birçok çalışmada kolanın insan sağlığına zararlı etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra kolanın tedavi amaçlı kullanılabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Y.W.Chung ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada bir gastricdiopyrobozoars olgusunu endoskopik kola enjeksiyonu yöntemiyle tedavi etmeyi başarmışlardır [13]. Yine başka bir çalışmada Phytobezoar olgusu kola ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir [14].

Kolanın kanserojen etkilerinin var olduğunu gösteren çalışmalar da vardır [15]. Bunun yanı sıra kolanın düzenli tüketimi sonucunda eroziv etkilerinin varlığı, bu etkilerinden dolayı ağızda ve dişlerde olumsuz etkilerinin olduğu insan ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla bildirilmiştir [16-18].

Yapılan literatür taramasında kolanın herhangi bir model organizma üzerinde yaşam süresi, yumurtadan çıkma oranı ve fiziksel büyüme geriliği üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma sonucu elde edilen bulgular ilk olmaları açısından önemlidir. Bu çalışmanın ve sonrasında gerçekleştirilmesi planlanan daha kapsamlı çalışmaların bilim dünyasına bu konuda temel oluşturabileceği düşünülmektedir. Biz bilim insanları olarak, özellikle çocuklarımız yani gelecek nesiller için büyük bir tehlike arz eden bu ve benzeri içeceklerin tüketiminde öncelikle ebeveynlere ve sonrasında hükümet ve öğretmenlerimize büyük görevler düştüğü görüşündeyiz.



Şekil 3. Kola özütünün farklı dozlarının *C. elegans* bireylerinde fiziksel büyüklük üzerine etkisi (br: birim)

#### KAYNAKLAR

[1] Jacobson, M. F., 2005. Liquid Candy: How Softdrinks are Harming Americans' Health. Center for Science in the Public Interest, pp. 5–6.

[2] Tucker, K. L., Morita, K., Qiao, N., Hannan, M. T., Cupples, L. A., and Kiel, D. P., 2006. Colas, but not other carbonated beverages, are associated with low bone mineral

density in olderwomen: TheFraminghamOsteoporosisStudy, Am. J. Clin. Nutr., vol. 84, no. 4, 936-942.

[3] Ehlen, L.A, Marshall, T.A, Qian, F, Wefel, J.S, Warren, J.J., 2008. Acidicbeveragesincreasethe risk of in vitrotootherosion. Nutr. Res., 28 (5), 299–303.

[4] Fagherazzi, G., Vilier, A., Sartorelli, D.S., Lajous, M., Balkau, B. and Clavel-Chapelon, F., 2013. Consumption of ArtificiallyandSugarSweetenedBeveragesandIncidentType 2 Diabetes,AmericanJournal of ClinicalNutrition, 97 (3), 517-523.

[5] Özpınar, H.,Özpınar, N., Kılıçgün, H., Dağ, Ş., Sarı, M., 2013. Physiologicalandlifespanalterations in *Caenorhabditiselegans*exposedtobenzoicacid. Uluslararası Hakemli Akademik Spor Sağlık ve Tıp Bilimleri Dergisi, 7 (3), 39-47.

[6] Watts,D.J.,Strogatz,S.H., 1998. Collectivedynamics of small-worldnetworks, Nature 393 (6684), 440–442.

[7] Kamath, R.,Fraser, A., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., 2003. Systematicfunctionalanalysis of the*Caenorhabditiselegans*genomeusing RNAi,Nature 421 (6920), 231–237.

[8] Gönczy, P. and Rose, L.S., 2005. Asymmetriccelldivisionandaxisformation in theembryo, WormBook, ed. The C. elegans ResearchCommunity, WormBook.

[9] Feng, Z.,Li, W., Ward, A., Piggott, B. J., Larkspur, E. R., Sternberg, P.W., Xu, X.Z., 2006.A C. elegans model of nicotine-dependentbehavior: regulationby TRP familychannels.Cell, 3, 127 (3), 621-33.

[10] Chuang, M. H.,Chiou, S. H., Huang, C.H., Yang, W. B., Wong, C.H., 2009. Thelifespan-promotingeffect of aceticacidandReishipolysaccharide. Bioorganic&MedicinalChemistry, 17, 7831–7840.

[11] Olgun, A., Aleksenko, T., Pereira-Smith, O.M., Vassilatis, D.K., 2005. Functionalanalysis of MRG-1: Theortholog of human MRG15 in *Caenorhabditiselegans*,J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci., 60 (5), 543-548.

[12] Koelle, M., 2005. Quantitation of constitutiveegg-laying, Yale University, New Haven,CT,USA,[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_behavior/behavior.html#sec9](http://www.wormbook.org/chapters/www_behavior/behavior.html#sec9).

[13] Chung, Y.W., Han, D.S., Park, Y.K.,et al., 2006.Hugegastricdiopsyrobezoarssuccessfullytreatedby oral intakeandendoscopic injection of Coca-Cola, DigestiveandLiverDisease, 38, 515–517.

[14] Juan, M., Lapiedra, M., Picazo, V., 2006. Phytobezoardissolutionwith Coca-Cola,GastroenterolHepatol, 29 (5), 291-293.



- [15] Belpoggi, F., Soffritti, M., Tibaldi, E., et al., 2006. Results of Long-Term Carcinogenicity Bioassays on Coca-Cola Administered to Sprague-Dawley Rats, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1076, 736–752.
- [16] Turgut, M.D., Tekçiçek, M., Çetin, N., Pınar, A., Ölmez, S., Alpar, R., 2004. The erosive effects of some carbonated beverages consumed in Turkey, *Journal of Hacettepe Faculty of Dentistry*, 28, 3, 8-14.
- [17] Orbak, R., Dayı, E., Atasever, M., 2002. An experimental study on the effect of acidic drinks on gingival health in dogs, *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 1277-1281.
- [18] Rahim, T., Rahim, A., Mohamad, D., Akil, H., 2012. Water sorption characteristics of restorative dental composites immersed in acidic drinks, *Dental materials*, 28, e63–e70.