

**T.C**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***HERICIUM ERINACEUS* EKSTRELERİNİN MCF-7 HÜCRE HATTINDA  
TELOMERAZ AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyolog Duygu GENÇALP**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Handan AK**

**İZMİR**

**2015**

## ÖNSÖZ

Öncelikle saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Handan AK'a ve değerli hocam Prof. Dr. H. Hakan AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarımız, başta Bölüm Başkanı Prof. Dr. Eser SÖZMEN olmak üzere, Prof. Dr. Taner ONAT, Prof. Dr. Nevbahar TURGAN, Prof. Dr. Ferhan SAĞIN, Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN, Prof. Dr. Yasemin AKÇAY, Doç. Dr. A. Mert ÖZGÖNÜL ve Doç. Dr. Ebru SEZER'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam sırasında bilgi ve emeklerini benden esirgemeyen, tezimin plan ve programında bana destek olan doktora öğrencisi değerli arkadaşım Uzman Sevcan ATAY'a sabrı ve hoşgörüsü için minnetlerimi sunarım.

Beni bugüne hazırlayan ve her zaman yanımda olan sevgili annem Reyhan GENÇALP, sevgili babam Hasan Hilmi GENÇALP'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca yanımda olan sevgili ablam Ulaş GENÇALP'e ve değerli arkadaşım Cenk Serhan ÖZVEREL'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Ege Üniversitesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı yönetim kuruluna ve görevli tüm çalışanlara teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez projeme maddi desteğinden dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederim.

İZMİR, 2015

Duygu GENÇALP

Biyolog

## ÖZET

### ***Hericium erinaceus* Ekstrelerinin MCF-7 Hücre Hattında Telomeraz Aktivitesine Etkisinin Araştırılması**

*Hericeum erinaceus* (*Basidiomycetes*) yaygın olarak Japonya ve Çin’de *canlılığını* kaybetmiş veya kaybetmekte olan ağaçlar üzerinde yetişen yenebilen bir mantar türüdür.

Bu tez çalışmasının amacı, *Hericium erinaceus* ekstraktlarının MCF-7 östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri hücre hattında telomeraz aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Bunun için öncelikle *Hericium erinaceus* mantarından elde edilen altı farklı ekstraktın (Etanol, Eter, Etilasetat, Etanol-Su, Metanol-Su, Su) MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri WST-8 yöntemi ile belirlendi. Su ekstraktı canlılık inhibisyonunda diğer ekstraktlara göre daha etkili bulundu. *Hericeum erinaceus* su ekstraktının  $IC_{(50)}$  dozu 72. saatte 250  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi. 72 saat 250  $\mu\text{g/ml}$  su ekstraktı ile inkübasyonun ardından hücreler toplanarak su ekstraktının telomeraz aktivitesi üzerine olan etkileri analiz edildi.

*Hericium erinaceus* MCF-7 meme kanseri hücre hattında telomeraz aktivitesi üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Bu sebeple *Hericium erinaceus* su ekstraktının MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkisini başka mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** *Hericium erinaceus*, MCF-7, telomeraz aktivitesi.

## ABSTRACT

### **Investigating the effects of *Hericium erinaceus* extracts on telomerase activity in MCF-7 cells**

*Hericium erinaceus* (Basidiomycetes) class, is an edible mushroom widely grows on dead or decaying trees especially in Japan and China.

The aim of this thesis is to determine the effects of *Hericium erinaceus* extracts on telomerase activity in MCF-7 estrogen receptor positive breast cancer cell lines. Firstly, we determined the effects of six different *Hericium erinaceus* extracts (Ethanol, Ether, Ethylacetate, Ethanol-water, Methanol-water, Water) on cell viability in MCF-7 cells by WST8 method. Water extract was found to be the most effective extract among others in the inhibition of cell viability. The IC<sub>(50)</sub> dose of *Hericium erinaceus* water extract was detected as 250 µg/ml at 72 h in MCF-7 cells. After incubation with 250 µg/ml water extract for 72 h., cells were collected and effects of water extract on telomerase activity were analyzed.

*Hericium erinaceus* showed no significant effect on telomerase activity in MCF-7 breast cancer cells. Therefore, it is contemplated that water extract of *Hericium erinaceus* shows its cytotoxic effects through other mechanisms in MCF-7 cells.

**Keywords:** *Hericium erinaceus*, MCF-7, telomerase activity.

## İÇİNDEKİLER

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ.....                                                 | i    |
| ÖZET.....                                                  | ii   |
| ABSTRACT .....                                             | iii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                      | vii  |
| GRAFİK DİZİNİ.....                                         | viii |
| TABLolar DİZİNİ .....                                      | x    |
| KISALTMALAR.....                                           | xi   |
| 1.GİRİŞ .....                                              | 1    |
| 1.1. Araştırmanın konusu .....                             | 1    |
| 1.2. Araştırmanın Amacı .....                              | 2    |
| 1.3. Hipotezler .....                                      | 2    |
| 1.4. Araştırmanın Önemi.....                               | 2    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                     | 3    |
| 2.1. Kanser .....                                          | 3    |
| 2.1.1. Kanserin Özellikleri .....                          | 3    |
| 2.1.2. Telomer ve Telomeras .....                          | 4    |
| 2.2. Meme Kanseri.....                                     | 7    |
| 2.2.1. Meme Kanserinin Türkiye ve Dünya’ daki Durumu ..... | 7    |

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri.....                        | 8         |
| 2.2.4. Meme Kanseri Alternatif Tedavisinde Mantarların Rolü ..... | 9         |
| <b>2.3. <i>Hericium erinaceus</i> .....</b>                       | <b>12</b> |
| 2.3.1. <i>Hericium erinaceus</i> ' un Temel Özellikleri .....     | 12        |
| 2.3.2. <i>Hericium erinaceus</i> 'un Anti-Kanser Özelliği .....   | 14        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                    | <b>17</b> |
| <b>3.1. Gereç.....</b>                                            | <b>17</b> |
| 3.1.1. Kullanılan Materyal .....                                  | 17        |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler.....       | 17        |
| 3.1.3 Kullanılan Cihazlar .....                                   | 18        |
| <b>3.2. Yöntem .....</b>                                          | <b>19</b> |
| 3.2.1. Hücre Kültürü.....                                         | 19        |
| 3.2.1.1 MCF-7 Hücre Hattı .....                                   | 19        |
| 3.2.1.2. Hücre Büyüme Ortamının Hazırlanması.....                 | 19        |
| 3.2.1.3. Hücre Dondurma Ortamının Hazırlanması .....              | 19        |
| 3.2.1.4. Hücrelerin Rutin Kontrolü .....                          | 19        |
| 3.2.1.5. Hücre Ortamının Değiştirilmesi.....                      | 20        |
| 3.2.1.6. Hücrelerin Toplanması.....                               | 20        |
| 3.2.1.7. Pasajlama.....                                           | 20        |
| 3.2.1.8. Hücre Sayımı.....                                        | 21        |
| 3.2.1.9. Hücrelerin Dondurulması.....                             | 21        |
| 3.2.1.10. Hücrelerin Çözülmesi.....                               | 21        |
| 3.2.2. Sitotoksosite Analizi .....                                | 21        |
| 3.2.2.1. Hücrelerin toplanması .....                              | 24        |
| 3.2.2.2. Hücrelerin ekilmesi .....                                | 24        |
| 3.2.2.3. Canlılık tayininin yapılması .....                       | 25        |
| 3.2.3 Telomeraz Aktivite Tayini .....                             | 26        |
| 3.2.3.1. Hücre Ekstraktının Hazırlanması .....                    | 27        |
| 3.2.3.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....                 | 28        |
| 3.2.3.3. PCR Amplifikasyonu .....                                 | 29        |
| 3.2.3.4. ELISA .....                                              | 30        |

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                  | <b>32</b> |
| <b>4.1. IC<sub>(50)</sub> Değerinin Belirlenmesi.....</b> | <b>32</b> |
| <b>4.2. Telomeraz aktivite tayini.....</b>                | <b>52</b> |
| <b>5. TARTIşMA .....</b>                                  | <b>53</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                          | <b>55</b> |
| <b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>                             | <b>56</b> |
| <b>ÖZGEÇMİş.....</b>                                      | <b>62</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Telomer yapısı. ....                                                                                                    | 5  |
| Şekil 2. Telomeraz enzimi ve telomer.....                                                                                        | 7  |
| Şekil 3. Mantar yetiştiriciliği yapılan ‘Fungi Perfecti’ adında merkezde bulunan <i>Hericium erinaceus</i> yetiştirme odası..... | 10 |
| Şekil 4. Kayın gövdesi üzerinde yetişkin <i>Hericium erinaceus</i> . ....                                                        | 13 |
| Şekil 5. Fungal $\beta$ -glukan triple heliks yapısının temel moleküler yapısı. ....                                             | 14 |
| Şekil 6. Heriserin’ in kimyasal yapısı. ....                                                                                     | 15 |
| Şekil 7. WST-8 ve WST-8 formazan’ ın kimyasal gösterimi. ....                                                                    | 23 |
| Şekil 8. TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA kitinin genel çalışma prensibi. ....                                                     | 27 |



## GRAFİK DİZİNİ

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafik 1. Yıllara Göre Kadınlarda Görülen Meme Kanseri İnsidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu).....                  | 8  |
| Grafik 2. WST-8 formazan’ ın absorbsiyon spektrumu.....                                                                     | 24 |
| Grafik 3. <i>Hericium erinaceus</i> etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.....      | 33 |
| Grafik 4. <i>Hericium erinaceus</i> etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.....      | 34 |
| Grafik 5. <i>Hericium erinaceus</i> etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.....      | 35 |
| Grafik 6. <i>Hericium erinaceus</i> eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.....        | 36 |
| Grafik 7. <i>Hericium erinaceus</i> eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.....        | 37 |
| Grafik 8. <i>Hericium erinaceus</i> eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.....        | 38 |
| Grafik 9. <i>Hericium erinaceus</i> etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.....  | 39 |
| Grafik 10. <i>Hericium erinaceus</i> etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği..... | 40 |
| Grafik 11. <i>Hericium erinaceus</i> etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği..... | 41 |
| Grafik 12. <i>Hericium erinaceus</i> su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.....         | 42 |
| Grafik 13. <i>Hericium erinaceus</i> su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.....         | 43 |
| Grafik 14. <i>Hericium erinaceus</i> su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.....         | 44 |
| Grafik 15. <i>Hericium erinaceus</i> etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.....  | 45 |
| Grafik 16. <i>Hericium erinaceus</i> etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.....  | 46 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafik 17. <i>Hericium erinaceus</i> etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği .....                                | 47 |
| Grafik 18. <i>Hericium erinaceus</i> metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği .....                               | 48 |
| Grafik 19. <i>Hericium erinaceus</i> metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği .....                               | 49 |
| Grafik 20. <i>Hericium erinaceus</i> metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği .....                               | 50 |
| Grafik 21. <i>Hericium erinaceus</i> su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24., 48., ve 72. saatlerde hücre canlılık grafiği .....                     | 51 |
| Grafik 22. <i>Hericium erinaceus</i> su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saatte TRAP yöntemi ile elde edilen % telomeraz aktivite değerleri..... | 52 |

## **TABLÖLAR DİZİNİ**

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kiti içerisinde yer alan solüsyonlar.<br>..... | 28 |
| Tablo 2. Reaksiyon karışımının hazırlanması. ....                                      | 29 |



## KISALTMALAR

AIC: Apoptoz inhibitör kompleksi

Bax: Bcl-2 bağlantılı x proteini

Bcl-2: B-hücreli lenfoma 2

CCK 8: Hücre sayım kiti 8

c-FLIP: Selüler FLICE- inhibitör proteini

CIAP: Calf intestinal alkaline fosfatase

COX-2: Siklooksijenaz-2

DIG: Dioksijenin

DISC: Ölümü indükleyici sinyal kompleksi

DMSO: Dimetil sülfoksit

ER: Östrojen reseptörü

ER (+): Östrojen reseptör pozitif

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent analizi

ERK: Ekstraselüler regüle kinaz

FBS: Fetal sıgır serumu

HE: *Hericium erinaceus*

Her2: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü-2

Her2 (+): İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü-2 pozitif

IC<sub>50</sub> : Hücre proliferasyonunun % 50' sini inhibe eden konantrasyon

JNK: Janus N-terminal kinaz

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz

Mmp: Metalloproteinaz

MTP: Mikroplak

NF-kB: Nükleer faktör kappa B

p: Anlamlılık seviyesi

P53: Tümör protein 53

PR: Progesteron reseptörü

PR (+): Progesteron reseptörü pozitif

PBS: Fosfat tamponu

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

POD: Peroksidaz

RPMI: Roswell Park Memorial Institute ortamı

TRAP: Tartarat-dirençli asit fosfataz

TMB: Tetrametilbenzidin

u-PA:  rokinaz tip plazminojen



# 1.GİRİŞ

## 1.1. Araştırmanın konusu

*Hericium erinaceus* tıbbi özellikleri olan yenilebilir önemli bir fungustur. Basidiomiset grubu bir fungus olan *Hericium erinaceus*'un miselyum ve meyve organları ilaç görevi gören birçok biyoaktif bileşik içermektedir (1).

*Hericium erinaceus*'un antikanser ve antimetastatik özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (2, 3). Kanser hücrelerinin replikatif immortalitelerini çoğunlukla telomeraz aktivitesi aracılığıyla sağlamaktadır (4, 5).

Yapılan çalışmalar ile *Hericium erinaceus* makro-mantarından sıcak su kullanılarak 15 polisakkarit ayrıştırılmıştır (6). Bunlardan 5 tanesi (*glukoksilan, ksilan, heteroksiloglukan, glukoksilan protein kompleksi* ve *galaktoksiloglukan protein kompleksi*) güçlü anti-tümör aktivitesi göstermiştir. Ayrıca, *Hericium erinaceus*'ta bulunan *hericenones, erinacines, hericerin* ve *hericenones* aromatik bileşenleri geniş çaplı *in vitro* ve *in vivo* biyoaktivite göstermektedir (7, 8). Bunun yanı sıra, *herisenon* ve *heriserin* gibi bazı asidik-fenol benzeri ve doğal yağ asidi benzeri bileşenler *Hericium erinaceus*'ta saptanmıştır (2).

*Hericium erinaceus* ekstraktlarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki anti-kanser etkisini telomeraz aktivitesinin regülasyonu üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediğine dair literatürde yayınlanan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında *Hericium erinaceus* çeşitli ortamlarda hazırlanan (etanol, eter, etilasetat, etanol-su, metanol-su, su) ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında telomeraz aktivitesine etkisi araştırılmıştır.

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Bu projenin amacı *Heridium erinaceus* ekstrelerinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında telomeraz aktivitesine etkilerinin belirlenmesidir.

## 1.3. Hipotezler

*Heridium erinaceus* 'un farklı ekstrelerinin östrojen pozitif insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde telomeraz aktivitesini inhibe yeteneğini ve bu etki ile anti-proliferatif etki arasında olası bir ilişki bulunup bulunmadığını araştırmak.

## 1.4. Araştırmanın Önemi

Ökaryotik kromozomların sonlarında yer alan DNA zinciri üzerindeki telomer adı verilen bölgelerin immortalite sürecinde önemli olduğu göstermiştir (9). Telomerik DNA normal insan hücrelerinde, hücre döngüsünün her bir tam turunda giderek kısalmaktadır (10). Tekrarlayan hücre döngülerinin sonucu olarak telomerler kritik bir şekilde kısalıp kromozomal DNA uçlarını koruma yeteneklerini kaybetmektedir (11-13). Buna karşılık immortalize tümör hücrelerinde telomer uzunluğu sabittir (10). Kanser hücrelerinin replikatif immortalite özelliklerini telomer uzunluklarının korunması yoluyla elde ettikleri bilinmektedir (10). Bu sebeple, telomerleri sentezleyen ve koruyan bir reverse transkriptaz enzim olan telomeraz enziminin aktivitesinin ihhibisyonu ile malign hücrelerin büyüme özellikleri değiştirebilir ve anti-neoplastik terapiler için yeni stratejiler geliştirilebilir (14).

Bu tez çalışması ile elde edilen veriler *Heridium erinaceus* 'un ekstraktlarının kanser hücreleri üzerinde farklı derecelerde anti-proliferatif etkiye sebep olduğunu göstermiştir. İstatiksel olarak anlamlı anti-proliferatif etki gösteren su ekstraktının telomeraz enzim aktivitesine etkisi ise minimaldir.

Bu tez çalışması, *Heridium erinaceus* ekstraktlarının anti-proliferatif etkilerinin bir tümör hücre hattında detaylı olarak araştırıldığı ilk çalışma olması sebebiyle önemlidir. Elde edilen sonuçlar, özellikle su ekstraktının karakterizasyonunun yapılarak bu ekstraktan elde edilecek etkin maddeler ile ileri çalışmalarının yapılmasının önemini ortaya koymaktadır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanser**

Kanser, bir grup anormal hücrenin kontrolsüz çoğaldığı, komşu dokulara invaze olduğu ve diğer organlarda kolonileşme yeteneği kazandığı kompleks bir hastalıktır. Karsinogenez, normal hücrelerin malignant hücrelere progresif dönüşümünü yönlendiren genetik ve epigenetik değişimleri biriktirdiği çok basamaklı bir prosesdir. Bu şekilde, kanser hücreleri kanser progresyonunu teşvik eden genlerde (onkogenler) veya azaltan genlerde (tümör süpresör genler) değişiklikler gerçekleştirirler. Transformasyon işleminin sonunda, malignant hücreler hücresel özelliklerini kaybedip büyüme bağımsızlığı, invazivlik yetenekleri kazanmakta ve senesens ile apoptoza direnç geliştirmektedirler (15, 16).

#### **2.1.1. Kanserin Özellikleri**

Kanser hücreleri vücuttaki diğer hücrelerden farklı olarak gelişimleri esnasında altı biyolojik özellik göstermektedir. Bu özellikler proliferatif sinyalizasyonun devamı, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, hücre ölümüne direnç, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenezin indüklenmesi ve invazyon ile metastazın aktivasyonunu içermektedir (16). Bu özelliklere ek olarak tümörler sadece çoğalan hücre kitleleri olmayıp aynı zamanda birden fazla farklı hücre tipinin birbirleriyle heterotipik etkileşimlerde bulunduğu kompleks dokulardır. Kanserin altı karakteristik özelliği, tümör büyümesini ve metastatik yayılmasını sağlayan ayırt edici ve tamamlayıcı yetenekleri, kanserin biyolojisini anlamak için bir temel oluşturmaktadır.

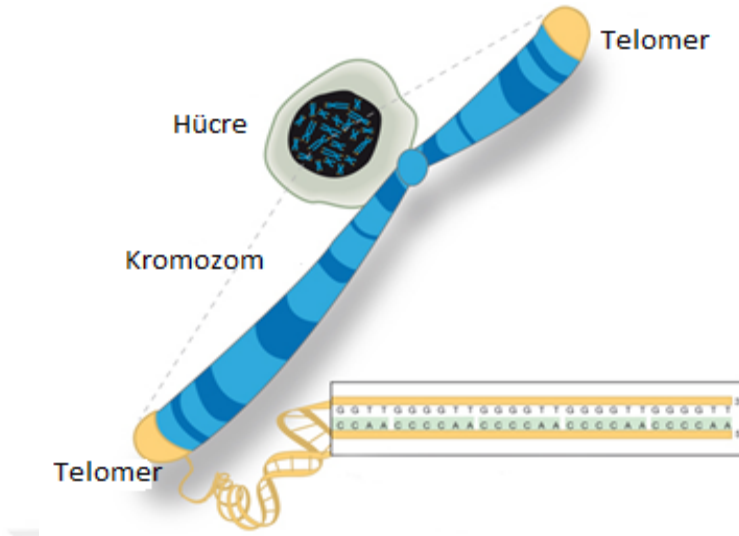
Kanser hücrelerinin en temel özellikleri kendi proliferasyonlarını sürdürebilmeleridir. Normal dokular hücre büyüme ve bölünme döngüsünü düzenleyici sinyallerin üretimi ve salınımını dikkatli bir şekilde kontrol etmektedirler. Bu süreç normal dokularda hücre sayısının kontrol altında tutulması sağlanmaktadır. Kanser hücrelerinde ise durum farklıdır. Kanser hücreleri bu

sinyalleri “degrede” etmektedirler. Etkinleştirme sinyalleri, hücre yüzey reseptörlerine bağlanan ve hücreiçi tirozin kinaz domeynleri içiren büyüme faktörleri aracılığıyla büyük ölçüde taşınmaktadırlar (16). Kanser hücreleri otokrin proliferatif uyarım ile sonuçlanan büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler (16).

Kanser hücrelerinin makroskopik tümörleri oluşturmak için sınırsız replikatif potansiyele ihtiyaç duydukları kabul edilmiştir. Bu yetenek, vücutta sadece sınırlı sayıda ardışık hücre büyümesine sahip olan ve hücre döngüsü kontrol noktalarından geçebilen normal hücrelerinin soyunun davranışına belirgin bir biçimde zıt olarak ön plana çıkmaktadır. Bu bölünme sınırlandırması proliferasyonun iki farklı engeli ile sağlanmaktadır: i) proliferatif olmayan fakat yaşamaya devam eden hücrelerde geri dönüşümsüz bir süreç olan senesens ve ii) hücre ölümünü içeren kriz safhası. Benzer şekilde, hücre kültüründe sınırsız olarak çoğaldıklarında, hücrelerde ilk olarak senesens indüksiyonu ve daha sonra bu engeli aşmakta başarılı olan hücreler için popülasyondaki hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğü kriz fazı gözlenmektedir. Nadir durumlarda, kriz safhasında olan bir popülasyonda bazı hücreler sınırsız replikatif potansiyel sergileyebilmektedirler. Bu hücreler hücre kültüründe ne senesens ne de kriz safhasına girmeden proliferere olma yeteneği (ölümsüzlük) kazanmışlardır (16).

### **2.1.2. Telomer ve Telomeraz**

Telomerler ökaryotik DNA kromozomlarının uçlarında bulunan ve DNA ‘yı degradasyon ve rekombinasyon hatalarından koruyan özelleşmiş yapılardır (Şekil 1) (17). Birçok ardışık hekzanükleotit tekrardan oluşan telomerler, kültürde büyüyen immortalize olmayan hücrelerde gittikçe kısalırlar. İnsanlarda ve diğer tüm omurgalılarda, telomerik DNA guaninden zengin yüksek derecede korunmuş TTAGGG tekrar dizilerinden oluşmaktadır. Normal insan somatik hücreleri replikasyonun her turunda 50-100 bp’lık terminal telomerik DNA’larını kaybeder (18). Telomer boylarındaki bu kısalma moleküler olarak yaşlanma ve kromozom instabilitesinden sorumlu tutulmaktadır (19).



Şekil 1. Telomer yapısı.

(The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 5 Ekim 2009; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

Fizyoloji veya Tıp adına Nobel Komitesi Telif Hakkı 2009; Çizim: Annika Röhl

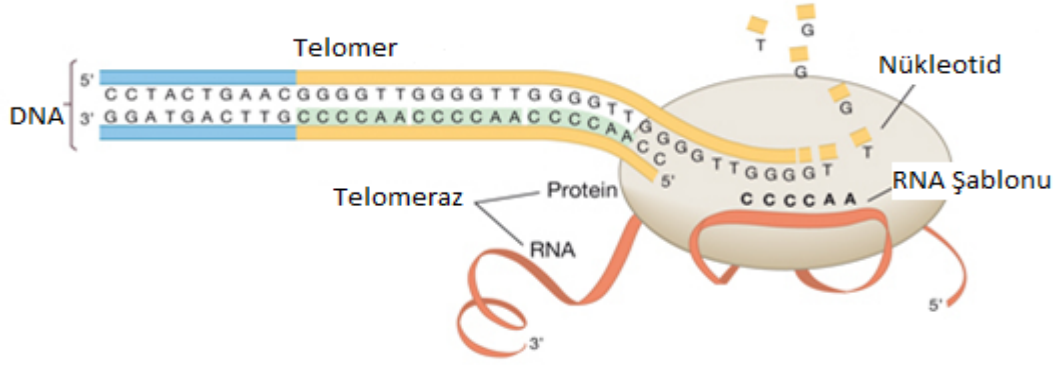
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf) (23)

Telomerik DNA'nın uçlarına telomer tekrar dizileri (5'-TTAGGG-3') ekleyen özelleşmiş bir DNA polimeraz olan telomeraz (Şekil 2), immortalize olmayan hücrelerde neredeyse hiç bulunmamaktadır, fakat insan kanser hücrelerinin de dahil olduğu, immortalize olan hücrelerin büyük çoğunluğunda (% 90) fonksiyonel olarak belirgin seviyelerde eksprese edilmektedir (16, 20).

Telomeraz, telomerik DNA'yı uzatarak, yokluğunda meydana gelebilecek ilerleyen telomer yıkımına karşı koyabilir. Hem kendiliğinden immortalize olan hücrelerdeki hem de bu enzimi eksprese etmek için genetik olarak modifiye olmuş hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin varlığı, hem senesens, hem de kriz/apoptoz indüksiyonuna karşı bir direnç ile bağlantılıdır (16). Diğer yandan, telomeraz aktivitesinin baskılanması telomer kısalmasına ve bu proliferatif engellerden birinin ya da diğerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Proliferasyonun iki engeli (senesens

ve kriz/apoptoz), pre-neoplastik ve neoplastik hücre klonlarının aşırı büyümesine engel olmak için hücrelerde bulunan kritik anti-kanser savunmaları olarak rasyonalize edilmiştir. Bu görüşe göre, birçok başlangıç neoplazisi, replikatif bölünme yeteneklerini yitirmekte ve bu engellerden biri ya da diğeri tarafından durdurulmaktadır. Tümör oluşturmaya ilerleyen nadir varyant hücrelerin immortalizasyonu, bu hücrelerin telomerik DNA'larını senesens ya da apoptozu tetiklemeyecek uzunluklarda tutabilme yeteneklerinden dolayı olduğu ileri sürülmektedir. Bu hücreler bunu, yaygın olarak telomeraz ekspresyonunu artırarak ya da daha az sıklıkla, alternatif rekombinasyon temelli telomer onarım mekanizması aracılığı ile sağlarlar. Bundan dolayı, telomer kısalması, normal hücrelerin sınırlı replikatif potansiyelini belirleyen ve böylece kanser hücreleri tarafından alt edilmesi gereken bir zamanlayıcı cihaz gibi görülmektedir (16).

Yapılan çalışmalar, telomerlerin sınırsız proliferasyon yeteneğinin olduğunu göstermektedir (20, 21). Ardışık hekzanükleotit tekrarlarından oluşan telomerler, kültürde büyüyen immortalize olmayan hücrelerde gittikçe kısalmakta ve sonuçta kromozomal DNA'yı uç uca füzyonlardan koruma yeteneğini yitirmektedir. Bu füzyonlar, ayrıştıklarında karışık bir karyotip ile sonuçlanarak hücre canlılığını tehdit eden, stabil olmayan disentrik kromozomları oluşturmaktadır. Bu nedenle, hücredeki telomerik DNA uzunluğu, telomerler aşınarak ve beraberinde koruyucu fonksiyonlarını kaybederek krize girişi tetiklemeden önce, kaç tane ardışık hücre neslinin oluşabileceğini belirlemektedir (15, 22).



Şekil 2. Telomeraz enzimi ve telomer.

(The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 5 Ekim 2009; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

Fizyoloji veya Tıp adına Nobel Komitesi Telif Hakkı 2009; Çizim: Annika Röhl

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf) (23)

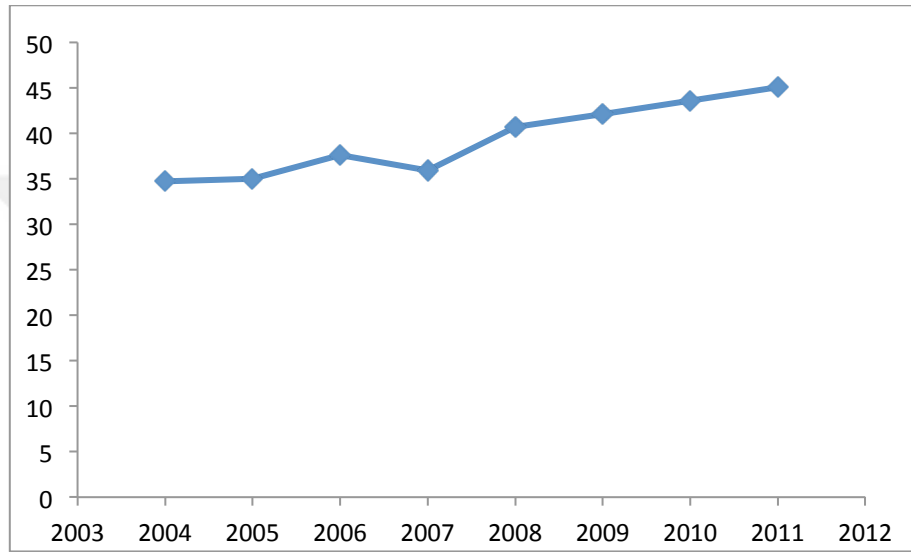
## 2.2. Meme Kanseri

### 2.2.1. Meme Kanserinin Türkiye ve Dünya'daki Durumu

Meme kanseri günümüzde kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin en yaygın nedenidir. Türkiye’de 1999 yılında 8.879 olarak kaydedilen meme kanserli kadın sayısı, 2003 yılında 12.772’ye yükselmiştir. 2011 yılı verilerine göre ise 100.000 kadından yaklaşık olarak 45.1’i meme kanseri hastasıdır. Ayrıca ülkemizde tüm kanserlerin % 24.1’ini meme kanserlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (Grafik 1) (24).

ABD meme kanseri istatistiklerine göre; 2015 yılında, ABD’de meme kanseri öyküsü olan 2,8 milyondan fazla kadın bulunmaktadır. Yine aynı istatistik verilerine göre 2015 yılında Amerika’da 231,840 invaziv, 60,290 non-invaziv yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş ve 40,290 kadının da meme kanseri yüzünden hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Ölüm oranının bu denli yüksek olmasının bir sebebi hastalığın geç evrelerinde teşhis edilmesidir (25). Tedavi uygulandıktan sonra ilk 2-3 yıl

içerisinde tekrarlama riski en yüksektir, devam eden yıllar içinde risk azalır fakat hiçbir zaman sıfıra düşmez. Nükseden meme kanserlerinin % 10-20’lik kısmı rejional şekilde izole, % 60-70’lik kısmı ise anatomik bir veya birden fazla bölgeye metastaze durumdadır (26, 27). Meme kanserinde başlıca prognostik faktörler, yaş, tümör büyüklüğü, aksillar lenf düğümlerinin durumu, tümörün histolojik tipi, patolojik sınıfı ve hormon-reseptör pozitifliği (28).



Grafik 1. Yıllara Göre Kadınlarda Görülen Meme Kanseri İnsidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu).

(Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü/Sağlık Bakanlığı (3;31), 2013; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir. Berrak BORA BAŞARA, Cemil GÜLER, Gökalp Kadri YENTÜR, Birsen BİRGE, Erman PULGAT, Burcu MAMAK EKİNCİ.

©Türkiye Halk Sağlığı Kurumu) (29)

### 2.2.3. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanserinin memede lokalize olduğu durumlarda mastektomi standart tedavi olarak kabul edilmektedir. Bazı durumlarda ise memeyi koruyarak uygulanan kısmi cerrahi müdahaleler ile beraber radyoterapi protokolleri uygulanabilmektedir.

Metastatik meme kanseri ise tam tedavi edilebilir olmadığından dolayı, uygulanan terapilerin temel hedefleri hastaların yaşam kalitelerinin yüksek tutulması, tümörle ilişkili semptomların azaltılması ve hastaların sosyal yaşamlarını mümkün olduğunda normal şekilde sürdürmesinin sağlanmasıdır.. Metastatik meme kanserine sahip hastaların yaşam uzunluğunu artıracak yeni terapilerin geliştirilmesi son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan önemli bir sağlık sorunudur (30).

Günümüzde metastatik meme kanserini tedavi etmek için kullanılan yöntemler arasında endokrin terapisi, kemoterapi, monoklonal antikör terapisi, tirozin kinaz inhibitörleri, bifosfonatlar, radyasyon terapisi gibi yöntemler bulunmaktadır (30). Bunlardan endokrin terapisi metastatik meme kanseri hastalarında, östrojen hormon reseptör durumu pozitif olan hastalar için kullanılmaktadır (31). Kemoterapi ise endokrin tedaviden hiçbir yanıt alınmadığı zaman, hastalık ilerlediği durumlarda veya hormon reseptör durumu negatif olduğu durumlarda uygulanmaktadır. Uygulanan tedavi yöntemleri, hasta için olan faydaları istenmeyen yan etkilerinden daha baskın olana kadar sürdürülmelidir (30).

#### **2.2.4. Meme Kanseri Alternatif Tedavisinde Mantarların Rolü**

Geleneksel olarak tarih boyunca hastalıkların tedavisinde alternatif olarak bitkilerden yararlanılmıştır. Çin ve Japonya gibi Asya ülkelerinde yüzlerce yıldır mantarlar yoğun olarak doğadan toplanmakta ve kültüre edilmektedirler (Şekil 3).

Tıpta tedavi edici ve tedaviye destek amaçlı olarak mantarların kullanımı uzun yıllardır sürmektedir. Özellikle son yıllarda artan kanser vakalarının tedavisinde alternatif terapilerin geliştirilmesine yönelik olarak tıbbi mantarlara gösterilen ilgi artmakta, mantarlar ve mantar ekstraktlarının çeşitli kanser türleri üzerine olan etkilerini araştıran bilimsel araştırmalar yapılmaktadır (32).



Şekil 3. Mantar yetiştiriciliği yapılan ‘Fungi Perfecti’ adında merkezde bulunan *Hericium erinaceus* yetiştirme odası.

(Kenneth Miller, *How Mushrooms Can Save the World*. Discover Magazine 31 Mayıs 2013; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

<http://discovermagazine.com/2013/julyaug/13-mushrooms-clean-up-oil-spills-nuclear-meltdowns-and-human-health>)

© Stuart Isett Mayıs 2013 ) (33)

Son yıllarda anti-kanser tedaviler ve mantardan elde edilen ürünler üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Yapılan çalışmalarda tıbbi mantarın meme kanseri üzerinde tedavi edici etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi ise, içerdikleri polisakkaridler, polisakkarid/protein kompleksler ve meyve gövdesinden izole edilen enzimler, miselyum ve kültür suyu olan biyoaktif polimerlerdir. Birçok basidiyomiset grubu mantar, meyve organlarında, misel kültürlerinde, kültür sularında biyolojik olarak aktif polisakkaritler içermektedirler. Bu polisakkaritler değişik kimyasal yapılarda olup, birçoğu  $\beta$ -glukan gruplarına aittir. Bunların glukan temel zincirlerinde  $\beta$ -(1-3) dallanmaları bulunmakta ve ek olarak antitümör etkileri için  $\beta$ -(1-6) yan dalları içermektedirler. Mantar polisakkaritleri kanser hücrelerine

direk olarak saldırmamakta, farklı immün yanıtları aktive ederek antitümör etkilerini göstermektedirler (26).

Çalışmalarda *Ganoderma lucidum* türünün yüksek derecede invaziv meme kanser hücrelerinde önemli ölçüde NF-kB aktivitesini engelleyici etkisi bulunmuştur. NF-kB (nükleer faktör kappa B)'nin inflamasyon, hücre sağ kalımı, transformasyon ve onkogenezdaki öneminin yanı sıra meme kanseri etiyojijisinde de önemi bulunmaktadır (34).

Diğer bir çalışmada *Ganoderma lucidum*'un meme kanser hücrelerinin (MDA-MB-231) proliferasyonunu Akt/NF-kB (Protein kinaz B/ Nükleer Faktör kappa B) sinyal yolağını engelleyerek inhibe ettiğı gösterilmiştir (25). *Ganoderma lucidum* biyolojik etkisini NF-kB'nin ekspresyonundaki azalma sonucunda, NF-kB tarafından regüle edilen siklin D1'in azalması ve bunun sonucunda da cdk4'ün inhibe edilmesi ile hücre döngüsünü G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazlarında durdurarak göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, *Ganoderma lucidum*'un Akt/NF-kB sinyal yolağı üzerindeki etkisi sonucu MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediğı ve meme kanseri üzerindeki potansiyel terapi yöntemlerinden biri olabileceğini ortaya konmuştur (35).

Diğer bir mantar türü olan *Coriolus versicolor* ise meme kanser hücrelerinde p53 (tümör protein 53) ve Bcl-2 (B-hücreli lenfoma)'ye bağılı ya da bağımsız mekanizmalar ile hücre çoğalmasını inhibe edici; lösemi hücrelerinde ise NF-kB transkripsiyon faktörünü engelleyerek ve COX-2 (siklooksijenaz-2) ekspresyonunu azaltarak apoptozu indükleyici bir yanıt göstermiştir (36, 37).

### 2.3. *Hericium erinaceus*

#### 2.3.1. *Hericium erinaceus* ' un Temel Özellikleri

*Hericium erinaceus*'un sağlık için olan faydaları ve kullanım alanları çok eski tarihlere dayanmaktadır (25).

Aslan yelesi mantarı (Lion's Mane Mushroom) veya Kirpi mantarı (Hedgehog Mushroom) olarak da isimlendirilen *Hericium erinaceus* gelenesal Çin tıbbında uzun yıllardır kullanılan yenilebilir bir mantar türüdür (38).

*Hericium erinaceus*, meşe, kayın, ceviz gibi çürümüş geniş yapraklı ağaçlar üzerinde doğal olarak yetişir (Şekil 4). *H. erinaceus*'u kültür ortamında polipropilen torbalar içerisine tarımsal atıklar yerleştirilerek yetiştirmek mümkündür. Basidiyomiset grubu bir mantar olan *Hericium erinaceus* fizyolojik etki gösteren bileşenler bakımından zengin bir mantardır. Özellikle  $\beta$ -glukan polisakkaritleri, mantarın antikanser, immünomodülatör, hipolipidemik, antioksidan ve nöroprotektif aktivitelerinden sorumludur (39). Etki mekanizması tam olarak keşfedilmemiş olsa da *Hericium erinaceus*'un anti-kanser özelliklerinin, büyük ölçüde içerdiği çeşitli kimyasal bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (40).



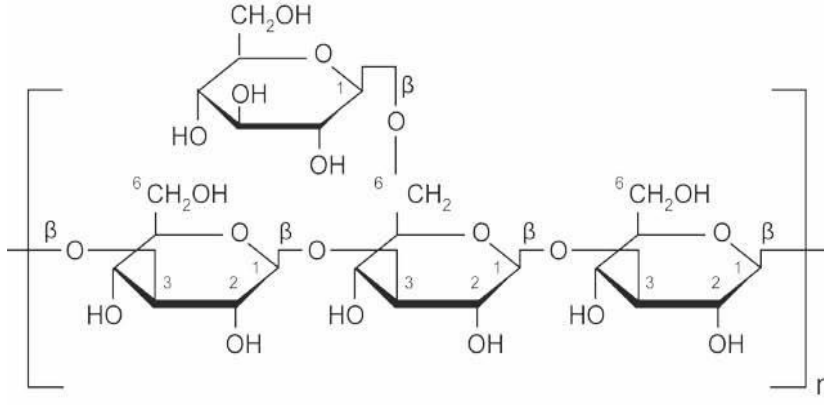
Şekil 4. Kayın gövdesi üzerinde yetişkin *Hericium erinaceus*.

(Plant Details- *Hericium erinaceus*. Discover Magazine 8 Kasım 2013; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

[http://www.ncwildflower.org/plant\\_galleries/details/Hericium-erinaceus/](http://www.ncwildflower.org/plant_galleries/details/Hericium-erinaceus/)

© Tom Harville Kasım 2008)(41)

Her 100 gr kurutulmuş *Hericium erinaceus*' da 22.3g protein, 3.5 g yağ, 64.8 g karbohidrat ve 4.3 g su bulunduğu çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (1). *Hericium erinaceus*'un polisakkarit bileşenlerinin ise  $\beta$ -1,3(4)- ve  $\alpha$ -1,4(6)-glikozidik bağları ile bağlı fukoz, galaktoz, glukoz ve mannoz'dan oluştuğu bildirilmiştir (42). Bunun yanısıra farklı çalışmalarda, içeriğinde bulunan çözünebilir şekerlerin arabitol, glukoz, myo-inozitol ve trehaloz olduğu belirlenmiştir. Amilaz, herinaz, lakkaz, heriserin, izoherisenon, ferulik asit,  $\beta$ -D-glukan (Şekil 5), tripsin benzeri proteinazlar, polisakkaritler gibi birçok bileşen de *Hericium erinaceus*'da bulunmaktadır. *Hericium erinaceus* proteinler, mineraller ve vitaminler bakımından zengin bir kaynağa sahiptir (43-51).

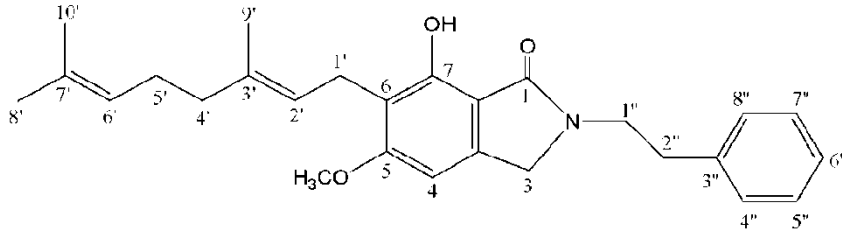


Şekil 5. Fungal  $\beta$ -glukan triple heliks yapısının temel moleküler yapısı.

(Norwegian Public Limited Liability Company (AS) Web sitesi- Immunomedic, 2011; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir. <http://immunomedic.com/category/about-beta-glucan/>)

### 2.3.2. *Heridium erinaceus* 'un Anti-Kanser Özelliği

Kim ve arkadaşları *Heridium erinaceus* ekstraktları ile yaptıkları bir çalışmada tümörlü farelerde *Heridium erinaceus*'un anti-tümör etkisini göstermişlerdir. Bu çalışmada CT-26 kolon kanseri farelerde tümörün büyümesinin *Heridium erinaceus* ekstraktları ile inhibe edilebildiği gözlemlenmiştir (52). Yapılan başka bir çalışmada da *Heridium erinaceus* herisenon bileşenlerinin A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 ve HTC-15 hücre hatlarında önemli ölçüde sitotoksik etki yaptığı bildirilmiştir (2, 45). Ayrıca, *Heridium erinaceus*'un heriserin A ve heriserin (Şekil 6) bileşenlerinin hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (40).



Şekil 6. Heriserin' in kimyasal yapısı.

(Osaka Institute of Technology: Materyal ve Yaşam Kimyası Laboratuvarı, 2011; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

[http://www.oit.ac.jp/chem/cherry/2\\_lab/research/research-kobayashi-new-english.php](http://www.oit.ac.jp/chem/cherry/2_lab/research/research-kobayashi-new-english.php))

Apoptotik hücre ölümünün tipik karakteristiği, kromatin kondensasyonu, membran sızıntısı, hücrenin büzülmesi ve sub-G<sub>1</sub> haplodiploid hücre popülasyonunun artışıdır (53). Akış sitometrisi ile HL-60 hücre hattında yapılan bir araştırmada heriserin A ve heriserin'in apoptoz ve hücre döngüsüne etkisi araştırılmış ve bu bileşenlerin sub-G<sub>1</sub> fraksiyonunda hücrelerin oranını zamana bağlı olarak artırdıkları ve apoptozu indükledikleri gösterilmiştir (40). Bu *Hericium erinaceus* bileşenleri ile indüklenen apoptozun altında yatan mekanizma ise HL-60 hücrelerinde öncelikle Bcl-2 ve Bax (Bcl-2 bağlantılı X proteini) proteinlerinin ekspresyonlarının değişimi ile açıklanmıştır. Bax ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı, Bcl-2 ekspresyonunun ise zamana bağlı olarak düşüş gösterdiği IC<sub>50</sub> dozları (hücre proliferasyonunun % 50'ni inhibe eden konantrasyon) Bax için 3.06 µM, Bcl-2 için ise 5.47 µM olarak hesaplanıp gösterilmiştir. Ayrıca apoptoz ile ilişkili olarak caspase-3 'ün aktif formlarının zamana bağlı bir yükseliş gösterdiği bulunmuştur (2).

Allograft fare modellerinde ve *in vitro* çalışmalarla *Hericium erinaceus*'un anti-metastatik etkinliği geniş kapsamlı olarak araştırılmıştır (54). Bu çalışmalarda *Hericium erinaceus* sıcak su ve etanol ekstraktlarının CT-26 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği, ekstraselüler matriks-degradasyon proteazlarının, metalloproteinazların (MMP) ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün (u-PA)

ekspresyonlarını düşürdüğü, aynı zamanda hücre büyümesini düzenleyen sinyal proteinleri ekstraselüler regüle kinaz'ın (ERK), JNK (Janus N-terminal kinaz), p38 “mitojen activated protein kinaz” (MAPK) ve diğer hücre büyümesi ile ilişkili proteinlerin fosforilasyonlarını baskılandığı gözlemlenmiştir (55).

c-FLIP (cellular FLICE-inhibitör protein); uzun (c-FLIPL), kısa (c-FLIPS) ve c-FLIPR varyantları şeklinde insan hücrelerinde eksprese olmaktadır. c-FLIP, FADD ve/ve ya caspase-8 veya caspase-10 ve TRAIL reseptör 5 (DR5)'e ligant-bağımlı veya bağımsız biçimde ve apoptoz inhibitör kompleksine (AIC) bağlanmaktadır. Bu etkileşim sonuç olarak ölümü indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumunu ve daha sonraki kaspaz kaskadının aktivasyonunu önlemektedir. Birçok tümör tipinde c-FLIP'in up-regüle olduğu ve sitokinler veya çeşitli kemoteropötik ajanlar aracılığı ile susturulması durumunda apoptozun devreye girebildiği gösterilmiş bu da c-FLIP'in kanser terapisinde önemli bir hedef olabileceği düşüncesini doğurmuştur (56). *Hericium erinaceus*'un, insan hepatokarsinom hücrelerinde doksorubisin ile uyarılmış apoptozu, c-FLIP ekspresyonunu azaltıp doksorubisin-ilişkili apoptotik sinyali indükleyerek arttırdığı gösterilmiştir (57).

Apoptoz; hücre büzülmesi, hücre yüzeyinde fosfatidilserin ekspresyonu, kromatin kondensasyonu, DNA fragmentasyonu ve hücresel yapıların apoptotik cisimciklere parçalanması ile karakterize edilen bir takım hücresel olayların gerçekleştiği olaylar bütünüdür (24). Fitokimyasallar, intrinsek (mitokondriyal) ve ekstrinsek (ölüm reseptörleri) yollar aracılığıyla apoptoz uyarılmaktadır (58). İntrinsek yolak, mitokondriyal dış membran geçirgenliği, pro-apoptotik faktörlerin salınımını içerirken; ekstrinsek yolak, apoptotik hücre ölümüne yol açacak proteinleri aktive eden plazma membranı ve ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimi içermektedir (59). *Hericium erinaceus*'un sıcak su ve etanol ekstraktları ile yapılan bir çalışmada, U937 insan lösemi hücrelerinde pro-apoptotik proteinler olan Bax, Bad ve Bid'in anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL(S) ve cIAP'ye göre ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (59).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Kullanılan Materyal**

MCF-7 meme adenokarsinom, adheran, ER(+) PR(+) Her2(+) hücre hattı

##### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler**

Alkol (% 70'lik ve % 96-100'lük etanol çözeltisi)

BCA protein assay kit (İNTRON)

FBS-fetal bovine serum (Lonza/DE14-802E) [-20°C]

RPMI (Lonza/BE12-115F) [+4°C]

Kloroform (İzoamil alkol içermeyen)

Lamel

Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup>suz PBS

Mikro pipet seti (Thermo/10, 100, 1000µL)

Neubauer Lamı

P/S-Penisilin/Streptomisin (Lonza/DE17-602E) [-20°C]

RNaz içermeyen steril pipet uçları (10µL)

RNaz inhibitörü

Steril Cryo tüpler (1,5-2mL)

Steril Flasklar (25, 75cm<sup>2</sup>)

Steril Pipet Uçları (10, 100, 1000µL)

Steril Plaklar (6, 96 kuyucuklu)

Steril Serolojik Pipetler (2, 5, 10, 25mL)

Steril Tüpler (15, 50mL)

Şırınga ve iğne

Taq Polimeraz

Tek kullanımlık eldivenler

TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit

TripsinEDTA (Lonza/BE17-161E) [-20]

WST8 Cell Counting Kit (Sigma/96992)

### **3.1.3 Kullanılan Cihazlar**

İnkübatör (Thermo/Forma Series II) (Thermo/Steri-Cycle)

Laminar Flow Kabin (Thermo/MSC.12) (Thermo/MSC.Advantage)

Mikrosantrifüj (Eppendorf, Minispın)

Mikroskop (Olympus/IX71)

Orbital çalkalayıcı inkübatör (Stuart S1500)

Plak okuyucu spektrofotometre (Thermo Multiskan EX)

Santrifüj (Thermo IEC CL31R Multispeed)

Vorteks (Labnet, VX100)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Tıbbi araştırmalarda kültür ortamında kontrollü şartlar altında çoğaltılan hücreler ile kanser başta olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri deneyleri yürütülmektedir.

#### 3.2.1.1 MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 hücreleri *in vitro* meme kanseri araştırmaları için kullanılmaya uygundur. MCF-7 hücreleri meme epitelinin birçok karakteristik özelliğini içermekte ve östrojen reseptör pozitif (ER(+)) hücre hattı olarak bilinmektedirler (60).

#### 3.2.1.2. Hücre Büyüme Ortamının Hazırlanması

Büyüme ortamları (Besi yerleri) + 4 °C'de birkaç ay saklanabilmektedir. Ortam pH'nın bazik veya asidik yönde değişmesi ortamda yer alan pH indikatörlerinin ortamın rengini değiştirmesi ile ayırt edilebilmektedir. MCF-7 hücreleri için % 10 FBS, % 1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI-1640 besi yeri kullanıldı.

#### 3.2.1.3. Hücre Dondurma Ortamının Hazırlanması

Dondurma ortamı % 45 FBS, % 45 Büyüme Ortamı, % 10 Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak taze hazırlanarak kullanıldı.

#### 3.2.1.4. Hücrelerin Rutin Kontrolü

Hücreler 25 cm<sup>2</sup> ve 75cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, 37 °C, % 5 kısmi CO<sub>2</sub> basıncı altında çoğaltıldı. Flask, cryo tüp ve plakların üzerine, içerisinde bulunan hücre hattının adı, tarihi, pasaj numarası ve gereken diğer bilgiler düzenli olarak yazıldı. Hücreler her gün makroskobik ve mikroskobik olarak kontrol edildi. Gözle yapılan kontrolde kontaminasyon göstergesi olan bulanıklık ve ortamın tükenmesinin sonucu

olan renk değişimi kontrol edildi. Mikroskopik incelemede hücrelerin yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edildi. Yoğunluğu % 80' in üzerinde olan hücreler pasajlandı veya daha sonra kullanılmak üzere donduruldu.

#### **3.2.1.5. Hücre Ortamının Değiştirilmesi**

Flaskın içindeki ortam atık kabına ve ya herhangi bir yere temas ettirilmeden uzaklaştırıldı. 25cm<sup>2</sup> flasklar için taze hazırlanan ortamdan 4 mL, 75cm<sup>2</sup> lik flasklar için 10 mL besi yeri kullanıldı .

#### **3.2.1.6. Hücrelerin Toplanması**

Flask içerisinde bulunan ortam kontaminasyon yaratmayacak bir şekilde uzaklaştırıldı. Önceden 37  C'de ısıtılmış olan tripsin 25cm<sup>2</sup> flask'a 1 mL, 75cm<sup>2</sup> flask'a 3 mL tripsin eklendi. Tripsin eklenmesinden sonra flasklar yaklaşık olarak 5 dakika inkübatörde bekletildi. Inkübasyondan sonra flask yüzeyi hücrelerin kalkıp kalkmadıklarını anlamak için kontrol edildi. Eğer hücreler yüzeyden kalkmamışsa flask yumuşak darbelerle kenarından sallanarak hücrelere zarar vermeyecek şekilde kalkma süreçleri hızlandırıldı. Hücreler flask yüzeyinden kalktıkları zaman flaskın içerisindeki tripsin + hücre süspansiyonu toplanıp steril tüpe aktarıldı. Süspansiyon  zerine eşit miktarda büyüme ortamı ilave edilip tripsinin inhibe edilmesi sağlandı. Steril falkon tüpü 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet yeterli miktarda taze büyüme ortamı veya dondurma ortamı ile süspanse edilip -80  C'de saklandı veya lize edildi.

#### **3.2.1.7. Pasajlama**

Toplanıp süspanse edilen hücreler, sayılarak flasklara ekildi. Ekim sonrasında flaskların içindeki ortam miktarı, 25cm<sup>2</sup> flask için 4 mL, 75cm<sup>2</sup> flask için 10 mL taze büyüme ortamı ile tamamlandı.

### 3.2.1.8. Hücre Sayımı

Toplanıp süspanse edilen hücrelerden yaklaşık 10 µL Neubauer laminin her iki tarafına yüklendi. Örneklerde canlılık değerlendirilmesi yapılacaksa süspansiyon lama yüklenmeden önce 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırıldı, canlılık değerlendirmesi yapılmayacaksa örnekler doğrudan lama yüklendi. Lamin üst ve alt taraflarındaki her biri 16 küçük kareden oluşan 4 kare (toplamda 8 kare) sayıldı. Toplam 16 değer in ortalaması alındı. Mililitre başına düşen hücre sayısı;

$$\text{Mililitredeki hücre sayısı} = \text{Ortalama değer} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

Sayılan hücreler denemelerde kullanılmak amacıyla 96 kuyucuklu plaklara ( $5 \times 10^3$ - $10 \times 10^3$ - $20 \times 10^3$  hücre/kuyucuk), 6 kuyucuklu plaklara ( $40 \times 10^3$ - $50 \times 10^3$  hücre/kuyucuk) ya da  $25 \text{ cm}^2$  flasklara ( $100 \times 10^3$ - $200 \times 10^3$  hücre/kuyucuk) ekildi.

### 3.2.1.9. Hücrelerin Dondurulması

Toplanan hücreler  $75 \text{ cm}^2$  flask için 5 mL dondurma ortamı ile süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyon “cryo” tüplere 1 mL miktarında dağıtıldı. Tüpler  $-20^\circ \text{C}$ ’de 1-2 saat bekletildikten sonra  $-80^\circ \text{C}$ ’de derin dondurucuya kaldırıldı.

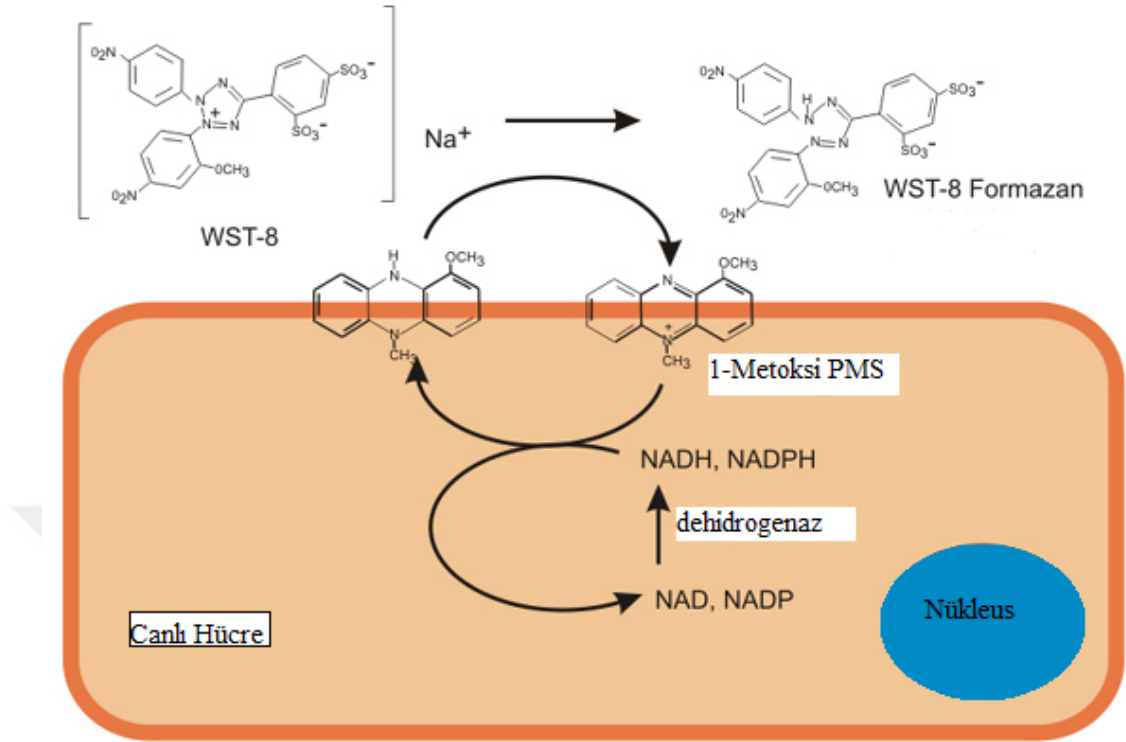
### 3.2.1.10. Hücrelerin Çözülmesi

Derin dondurucudan ( $-80^\circ \text{C}$ ) alınan “cryo” tüp hızlı bir şekilde çözüldü. Çözölmüş süspansiyon tüpe aktarılarak üzerine taze hazırlanan ve oda sıcaklığında bırakılmış büyüme ortamından 4 mL ilave edildi. Tüp, 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 5 mL büyüme ortamında süspanse edilerek  $25 \text{ cm}^2$  flaska ekildi. Flask inkübatöre koyuldu. Hücrelerin her çözölüşü sonrası pasaj numarası bir artırılarak kaydedildi.

### 3.2.2. Sitotoksisite Analizi

Cell Counting Kit (Sigma/96992) (hücre sayım kiti) kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Cell counting kit-8 (CCK-8) solüsyonu içerisinde, WST-8 (2-(2-

metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolyum,monosodyum tuzu)'i barındırmaktadır. CCK-8 solüsyonu hücrelere direkt olarak verilir ve önceden hazırlanmasına gerek yoktur. WST-8 hücresel dehidrogenaz biyoredüksiyonu sonucu hücre kültür ortamında çözünebilen turuncu formazanı oluşturur (Şekil 7). Oluşan formazan miktarı, canlı hücre miktarıyla doğru orantılıdır. CCK-8 solüsyonunun stabilitesi ve düşük sitotoksik etkinliği sebebiyle hücrelerin uzun inkübasyonu (24-48 saat) mümkün olmaktadır. CCK-8, proliferasyon ve sitotoksosite deneylerinde canlı hücre sayısının belirlenmesinde hassas kolorimetrik ölçümü olanaklı kılmaktadır (Grafik 2). Bu kitin ölçüm hassasiyeti diğer tetrazolyum tuzu içeren kitlere (MTT, XTT ya da MTS) kıyasla daha yüksektir.

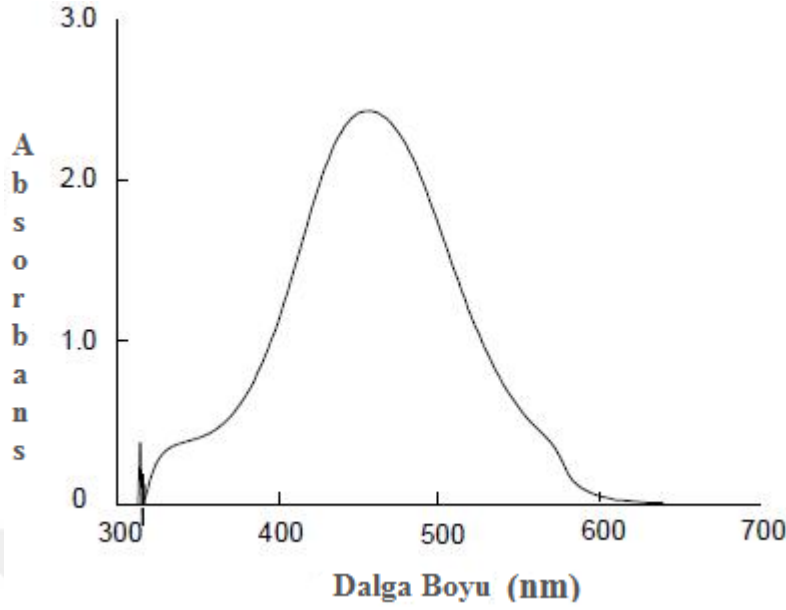


Şekil 7. WST-8 ve WST-8 formazan' ın kimyasal gösterimi.

(Yüksek Soğurma Kullanan Absorbans Temelli Sitotokisite Deneyi, Suda Çözünen Tetrazolyum Tuzu, 3 Mart 2009; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

[http://www.biotech.com/assets/tech\\_resources/An\\_Absorbance-based-Cytotoxicity\\_App%20Note.pdf](http://www.biotech.com/assets/tech_resources/An_Absorbance-based-Cytotoxicity_App%20Note.pdf)

© BioTek Instruments) (61)



Grafik 2. WST-8 formazan' ın absorpsiyon spektrumu.

(Sigma-Aldrich Cell Counting Kit-8 Genel Bilgi, 2011; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>) (62)

#### 3.2.2.1. Hücrelerin toplanması

Flask yüzeyinde % 70-80 yoğunluğa ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandı. 75cm<sup>2</sup> flasklar için 3 mL, 25cm<sup>2</sup> flasklar için ise 1 mL tripsin kullanıldı. Hücreler Neubauer lamına yüklenerek sayıldı. Hücreler 50 µL'de 10.000 hücre olacak şekilde süspanse edildi.

#### 3.2.2.2. Hücrelerin ekilmesi

96 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde 50' şer µL ortam içerisinde ekim yapıldı. Farmakolojik dozlama ile çalışıldı. Buna göre verilecek ilacın ya da ekstraktın konsantrasyonu hesaplandı. Blank (Kör hücresiz ortam)-Kontrol (Sadece hücre içeren ortam)-1nM-10nM-100nM-1µM-10µM-100µM şablonuna uygun olarak 6 tekrarlı ekim yapıldı.

**Kör:** Hüresiz ortam

**Kontrol:** Hücre içeren ortam

Kör ve kontrol dışındaki diğer kuyucuklarda 50µL hücre içeren ortam ve 50µL ilaç / ekstrakt olarak toplam 100 µL yüklendi. Kör kuyucuğuna 100 µL ortam, kontrol kuyucuğuna ise 50 µL hücre içeren ortam ardından 50 µL ortam eklenerek son hacim 100 µL'ye tamamlandı.

### **3.2.2.3. Canlılık tayininin yapılması**

İnkübasyon süresi sonunda (24, 48 ve 72. saatte) her kutucuğa 10µl CCK-8 solüsyonu eklendi. Orbital çalkalayıcılı inkübatörde 37 °C'de 50-60 rpm'de 30 dakika inkübe edildi. Ölçüm 450 nm dalga boyunda Plak okuyucu spektrofotometrede (Thermo Multiskan EX) yapıldı.

Kör kuyucuklarına ait absorbansların ortalaması alınıp bütün kuyucuklardaki absorbans değerlerinden çıkarıldı. Her bir doza ve uygulama yapılmamış (non-treated) hücrelere ait absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Sonuçlar hücrelere uygulanan her bir doz için aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve excel tablosunda grafiği çizildi.

Hücre canlılığı (%) = 100 x (uygulama yapılmış kuyucuklara ait ortalama absorbans / uygulama yapılmamış kuyucuklara ait absorbans)

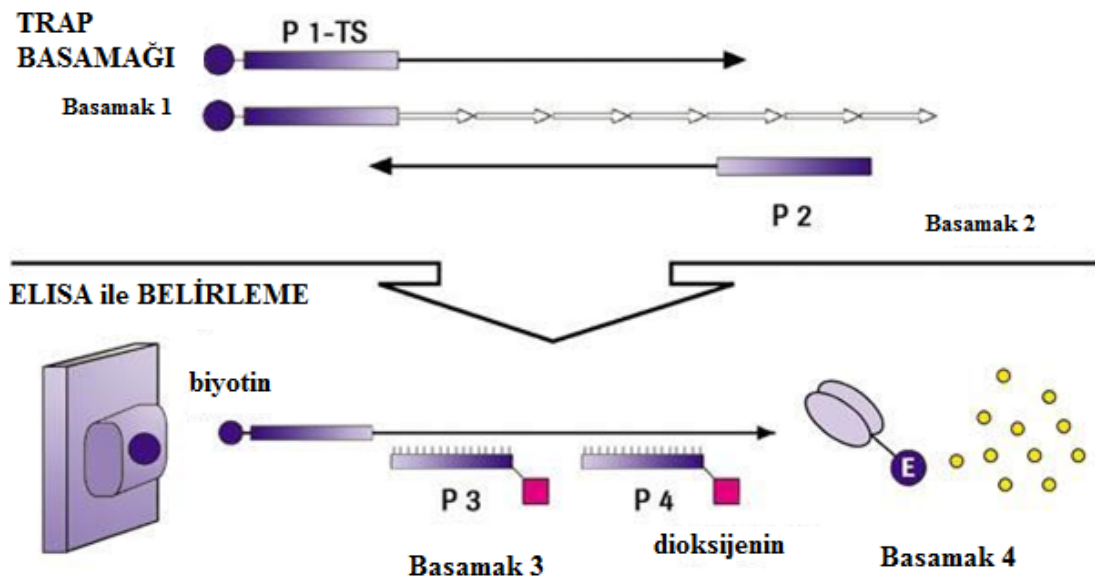
Her bir doz, kör ve uygulama yapılmamış hücre grubu 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Excel grafiklerinde hata çubuklarının değerleri her bir gruba ait kuyucukların (doz uygulanmış, kör ve uygulama yapılmamış) absorbans değerleri belirlendikten sonra bu değerlerin standart sapması alınarak hesaplanmıştır.

### 3.2.3 Telomeraz Aktivite Tayini

Telomeraz aktivite tayini için TeloTAGGG Telomeraz PCR ELISA kiti (Roche Applied Science, Mannheim/Germany) kullanıldı. Bu kit telomeraz kaynaklı uzama ürünlerinin radyoaktif olmayan işaretlenme sonrasında ELISA protokolünün izlenmesi ile yüksek spesifitede bir amplifikasyon sağlamaktadır (Şekil 8).

Kitin uygulaması farklı basamaklardan oluşmaktadır. İlk basamak, telomeraz biyotin-işaretli sentetik P1-TS-primerin 3' ucuna telomerik tekrarların (TTAGGG) eklenmesidir. İkinci basamakta, uzama ürünleri P1-TS ve P2 primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmaktadır.

Alikotlanmış PCR ürünü denatüre edilir ve sonrasında digoxigenin-(DIG)-işaretli telomerik tekrar-spesifik probu ile hibridize edilir. Oluşan ürünün biyotin işaretli primer ile streptavidin-kaplı mikroplak'a immobilizasyonu gerçekleştirilir. Belirleyici prob ve hibridizasyon kondüsyonları en yüksek spesifite ve sensitiviteyi sağlayacak şekilde optimize edilmiştir. İmmobilize PCR ürünleri daha sonra peroksidaz bağlı bir antikor ile (anti-DIG-POD) ile belirlenir. Son olarak da, peroksidaz tarafından metabolize edilen Tetrametilbenzidin'in (TMB) renkli reaksiyon ürünü oluşur.



Şekil 8. TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA kitinin genel çalışma prensibi.

(Roche Applied Science, 2010; 29 Haziran 2015 tarihinde erişilmiştir.

<https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/44383c77-93ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>) (63)

### **3.2.3.1. Hücre Ekstraktının Hazırlanması**

Hücreler sayılarak hücre ekstraktları hazırlandı. Bunun için, hücreler 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde aktarıldı. Aktarılan hücreler 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından örnekler PBS ile yıkandı, santrifüj aşaması aynı şekilde tekrarlandı. Tekrarlanan santrifüj basamağı sonrasında PBS dikkatlice uzaklaştırıldı. PBS' in uzaklaştırılmasından sonra örnekler 200 µL "lysis reagent" (solüsyon 1) eklenerek örnekler süspanse edildi. Örnek süspanسیونları buz üzerinde 30 dakika süreyle inkübe edildi. Sonrasında örnekler 16 000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneklerden 175 µL süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarıldı. Kalan ekstrakt buz üzerinde alikotlandı ve şokla donduruldu. Deneyin yapılacağı güne kadar - 80 °C'de saklandı.

### 3.2.3.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

| Şişe numarası | Kapak rengi    | İçeriği                                      |
|---------------|----------------|----------------------------------------------|
| 1             | Siyah kapak    | Lizis reaktifi                               |
| 2             | Sarı kapak     | Reaksiyon karışımı                           |
| 3             | 3Menekşe kapak | Denatürasyon reaktifi                        |
| 4             | Beyaz kapak    | Hibridizasyon tamponu                        |
| 5             | Yeşil kapak    | Yıkama tamponu                               |
| 6             | Kırmızı kapak  | Anti-DIG-POD<br>(antidioksijenin-peroksidaz) |
| 7             | Kırmızı kapak  | Konjuge dilüsyon tamponu                     |
| 8             | Siyah kapak    | TMB substrat solüsyonu                       |
| 9             | Mavi kapak     | Reaksiyon durdurucu reaktif                  |
| 10            | Renksiz        | Pozitif kontrol hücre ekstraktı              |

Tablo 1. TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kiti içerisinde yer alan solüsyonlar.

Test edilen her örnek ve her kontrol için 25 µL reaksiyon karışımı (solüsyon 2) PCR amplifikasyonu için uygun olan tüplere aktarıldı.

Tablo 2’de açıklanan şekilde örnek, negatif ve pozitif kontrol reaksiyon karışımları hazırlandı. Bu işlemler esnasında tüm pipetlemeler buz üzerinde gerçekleştirildi.

|                     |                                                                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Örnekler            | Her tüpe 1-3 µL hücre ekstraktı eklendi. (1-50 µg total proteine karşılık gelecek şekilde $1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$ hücre)                |
| Negatif Kontrol     | 1-3 µL ısı ile muamele edilmiş hücre ekstraktı eklendi. (1-50 µg total proteine karşılık gelecek şekilde $1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$ hücre) |
| Pozitif Kontrol     | 1-3 µL yeniden hazırlanmış solüsyon eklendi ( $1 \times 10^3$ hücreye karşılık gelecek şekilde).                                                |
| <b>TOPLAM HACİM</b> | <b>Son hacim 50.0 µL olacak şekilde steril su eklendi.</b>                                                                                      |

Tablo 2. Reaksiyon karışımının hazırlanması.

**Negatif kontrolün hazırlanması:** 10 µL hücre ekstraktı (pozitif kontrol) ya da NT (muamele yapılmamış) hücreler 85 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

#### 3.2.3.3. PCR Amplifikasyonu

Tüpler termal döngüleyiciye yerleştirildi ve primer uzama basamağı için 25 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Telomeraz inaktivasyonu için 94 °C’de 5 dakika, amplifikasyon basamağı için ise 94 °C’de 30 saniye, 50 °C’de 30 saniye ve 72 °C’ de 90 saniye 3 basamaklı 30 döngü gerçekleştirildi. Protokolde belirtilen 72 °C’de 10 dakikalık inkübasyondan sonra tüpler termal döngüleyici cihazında ELISA öncesi 4 °C’de bekletildi.

#### 3.2.3.4. ELISA

Analiz için 20 µL denatürasyon solüsyonu (solüsyon 3) reaksiyon tüplerine eklendi. Ardından 5 µL amplifikasyon ürünü ilave edilerek 25 °C’de 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 225 µL hibridizasyon tamponu (solüsyon 4) eklendi ve örnekler vortekslendi. Karışımdan ELISA plağında her kuyucuğa 100 µL koyularak kuyucuklar kendinden yapışkanlı folyo ile kapatıldı. Plak 37 °C 300 rpm’de 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hibridizasyon tamponu kuyucuklardan tamamen uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklar 3 kez 250 µL Yıkama tamponu (Washing Buffer) (solüsyon 5) ile her defasında en az 30 saniye süre ile hafifçe çalkalanarak yıkandı. Yıkama sonunda yıkama tamponu uzaklaştırıldı.

Yıkama işlemi sonrasında her kuyucuğa 100 µL Anti-DIG-POD solüsyonu (solüsyon 11) eklendi. Kuyucuklar folyo ile kapatılarak ve örnekler 15- 25 °C 300 rpm’de 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Anti-DIG-POD solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. Örnekler, 250 µL yıkama tamponu ile (solüsyon 5) ile 5 kez her defasında en az 30 saniye yıkandı ve yıkama sonunda yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Analiz için her kuyucuğa 100 µL daha önceden oda sıcaklığında çözündürülmüş TMB substrat solüsyonu (solüsyon 8) eklendi. Plak folyo ile kapatılarak örnekler 15-25 °C ve 300 rpm’de 20 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 µL “Stop” Solüsyonu (solüsyon 9) her kuyucuğa eklendi enzim reaksiyonu durduruldu ve analiz öncesi reaksiyon ürününün renginin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.

Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra 30 dakika içerisinde mikropalak okuyuculu bir spektrofotometre (Thermo Multiskan EX) kullanılarak örneklerin absorbansı 450 nm ve 690 nm dalga boylarında ölçüldü. Örneklerin absorbans farkları aşağıdaki formülle belirlendi:

$$\text{Absorbans } (\Delta A) = A_{450} - A_{690}$$

Her bir ekstrakt konsantrasyonu ve uygulama yapılmamış (non-treated) hücrelere ait absorbans değerlerinin ortalaması alındı. Sonuçlar hücrelere uygulanan her bir doz için aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve grafikler Microsoft Excel programı kullanılarak çizildi.

**Telomeraz Aktivite Değeri (%) = 100 x (Uygulama yapılmış kuyucuklara ait ortalama absorbans/ Uygulama yapılmamış kuyucuklara ait absorbans)**

Her bir konsantrasyon, kr ve uygulama yapılmamış hücre grubu 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Microsoft Excel grafiklerinde hata çubuklarının değerleri her bir gruba ait kuyucukların (ekstrakt uygulanmış, kr ve ekstrakt verilmemiş) absorbans değerleri belirlendikten sonra bu değerlerin standart sapması alınarak hesaplanmıştır.



## 4. BULGULAR

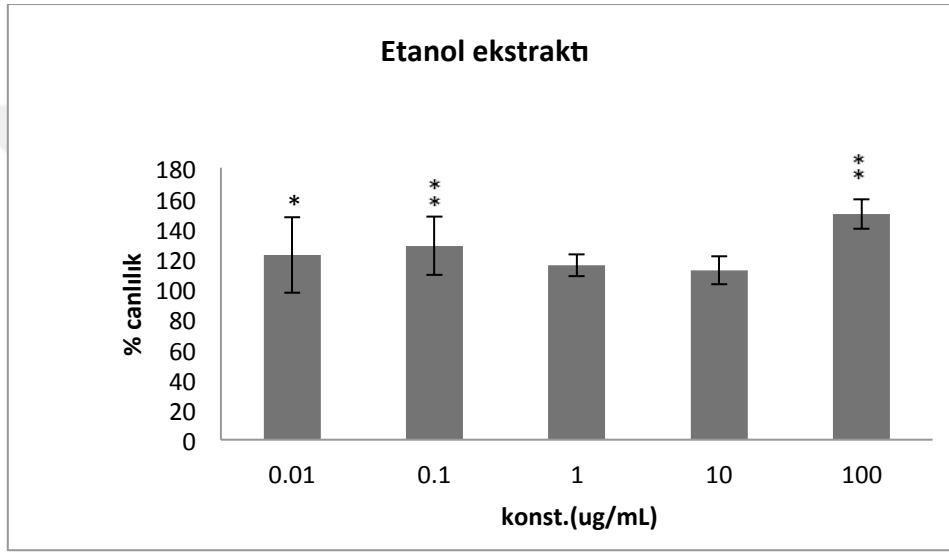
### 4.1. IC<sub>(50)</sub> Değerinin Belirlenmesi

Çalışmada *Hericium erinaceus* mantarından elde edilen ekstraktların hücre canlılığı üzerine olan etkileri WST-8 yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, *Hericium erinaceus* makro-mantarına ait etanol-su, eter, metanol, etilasetat, etanol ve su ekstraktları DMSO'da çözülerek hücrelerin bulunduğu ortama 0-100 µg/mL konsantrasyon aralığında (0; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 10; 100 µg/mL), her biri 5 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. MCF-7 hücreleri 24, 48 ve 72 saat süresince ekstraktlar ile inkübe edilmiştir. Ekstraktların hücre canlılığı üzerine olan etkileri WST-8 yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak ekstraktlara ait canlılık inhibisyon grafikleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak çizilmiştir. Uygulama yapılmamış hücre grubuna göre her bir konsantrasyonun yol açtığı canlılık inhibisyonunun istatistiksel olarak anlamlılığı Graphpad Instat v.3.1 yazılımı kullanılarak Post-Test ile birlikte tek yönlü Anova analizi ile belirlenmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde *Hericium erinaceus* etanol ekstraktının 24, 48 ve 72 saat WST-8 sonuçları değerlendirildiğinde etanol ekstraktının 24 saatte en yüksek konsantrasyonunda % 20 civarında hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalış 48 saat sonunda en yüksek konsantrasyonda % 30'a çıkmıştır. Üçüncü günün sonunda ise hücre canlılığında en yüksek konsantrasyonda % 40 oranında azalma tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde *Hericium erinaceus etanol* ekstraktı uygulaması sonrası inkübasyon süreleri ve karşılık gelen canlılık yüzdeleri değerleri Grafik 3, Grafik 4 ve Grafik 5' te verilmiştir.

Analiz sonucunda etanol ekstraktının 24. saatte en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) % 30, 0.1 µg/mL konsantrasyonunda % 20 oranında canlılığı indüklediği tespit edilmiştir (Grafik 3).

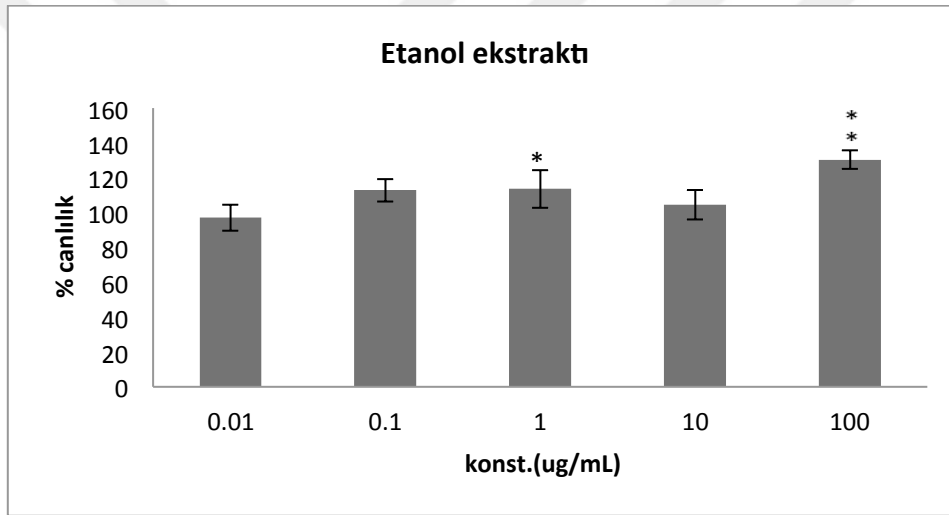
Grafik 3. *Hericium erinaceus* etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.



\*p<0.05, \*\*p<0.01

Etanol ekstraktının 48. saat hücre canlılık grafiğine (Grafik 4) bakıldığında en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı bulunan % 20 civarında bir hücre canlılığı indüksiyonu gözlenmiştir ( $p<0.01$ ). Benzer şekilde 48. saatte 1 µg/mL konsantrasyonda da istatistiksel olarak anlamlı % 10 oranında hücre canlılığı indüksiyonu söz konusudur ( $p<0.05$ ).

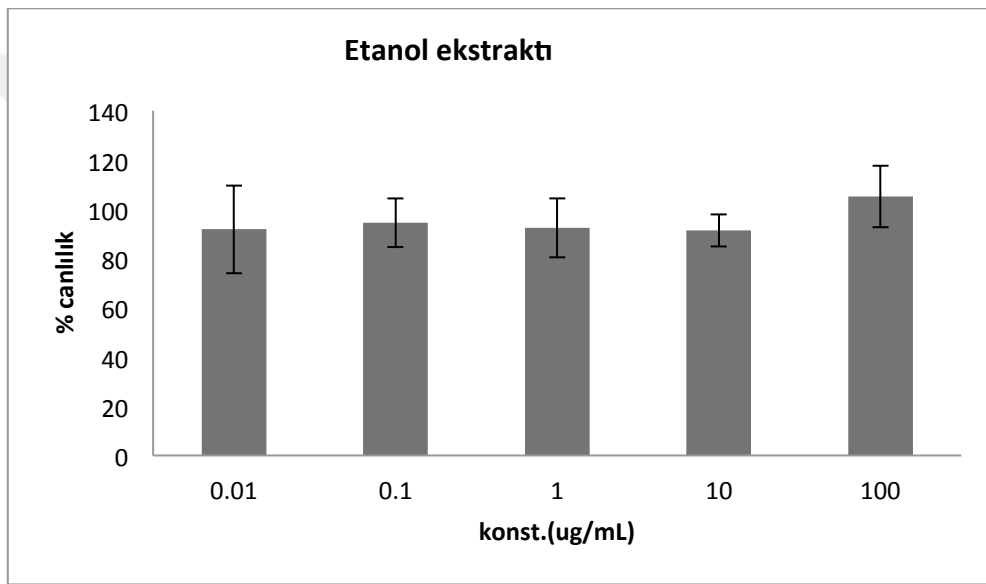
Grafik 4. *Hericium erinaceus* etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

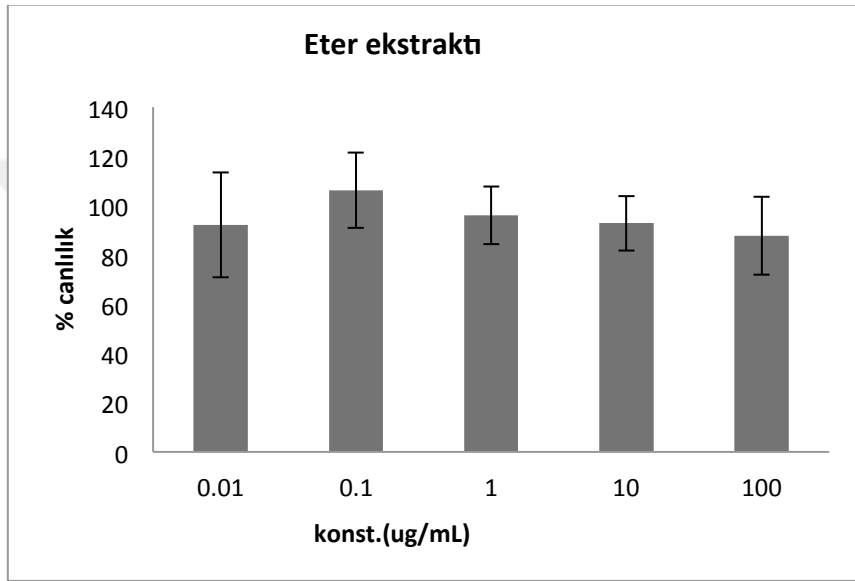
Etanol ekstraktına ait 72. saat hücre canlılık grafiği değerlendirildiğinde (Grafik 5) 0.01- 10 µg/mL konsantrasyon aralığında yaklaşık olarak % 10 civarlarında inhibisyon gözlenmiştir. Ancak bu inhibisyonlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ).

Grafik 5. *Hericium erinaceus* etanol ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



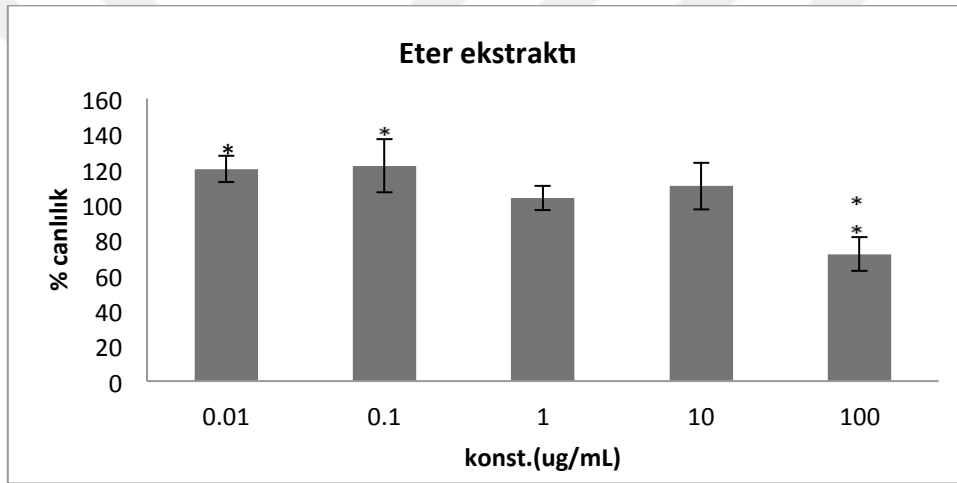
*Hericium erinaceus* eter ekstraktına ait 24. saat hücre canlılık yüzdeleri grafik 6’da verilmiştir. Eter ekstraktı 0.01, 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan inhibisyona yol açmıştır ( $p>0.05$ ).

Grafik 6. *Hericium erinaceus* eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.



Eter ekstraktına ait 48. saat hücre canlılık analiz sonuçları 0.01 µg/mL konsantrasyonunda % 20, 0.1 µg/mL konsantrasyonunda % 21 oranında istatistiksel olarak anlamlı bulunan ( $p<0.05$ ) hücre canlılığı indüksiyonunu göstermektedir. Eter ekstraktının 48. saatte en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) % 31 oranında hücre canlılığını inhibe ettiği saptanmıştır ( $p<0.01$ ) (Grafik 7).

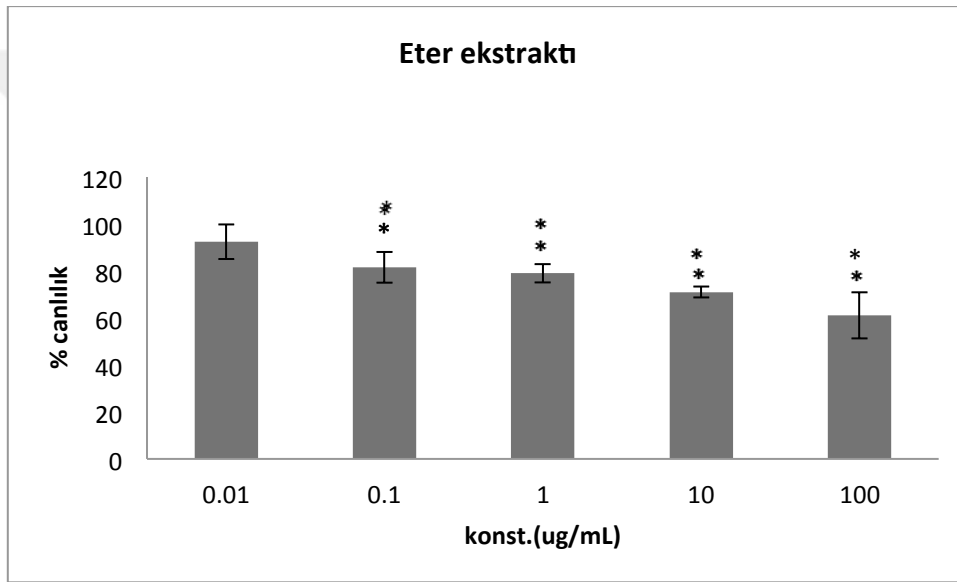
Grafik 7. *Hericium erinaceus* eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

Grafik 8’de MCF-7 hücrelerine uygulanan eter ekstraktının 72. saat hücre % canlılık değerleri verilmiştir. 72. Saatte 0.1, 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla % 19, % 22, % 30, % 39 oranlarında anlamlı hücre canlılığı inhibisyonu tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ).

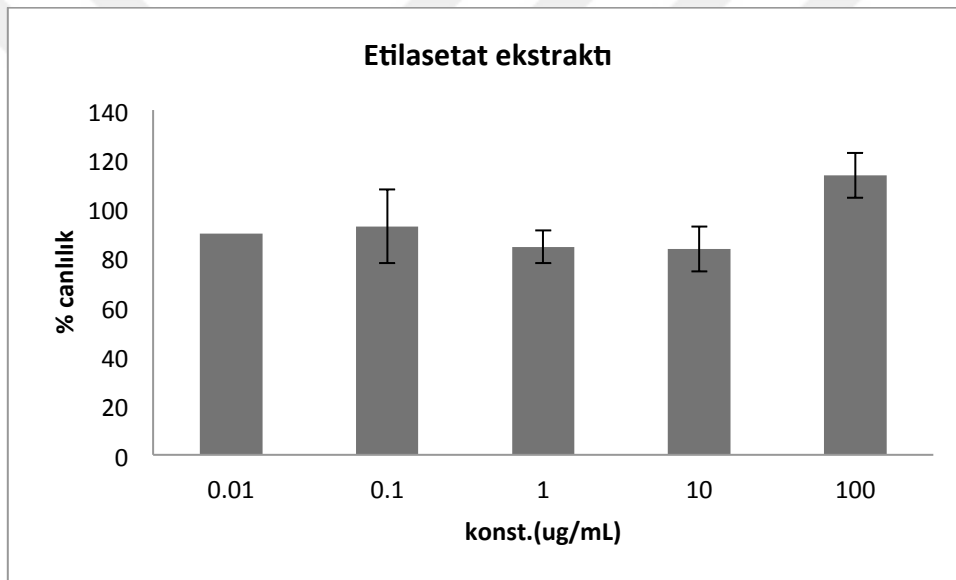
Grafik 8. *Hericium erinaceus* eter ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



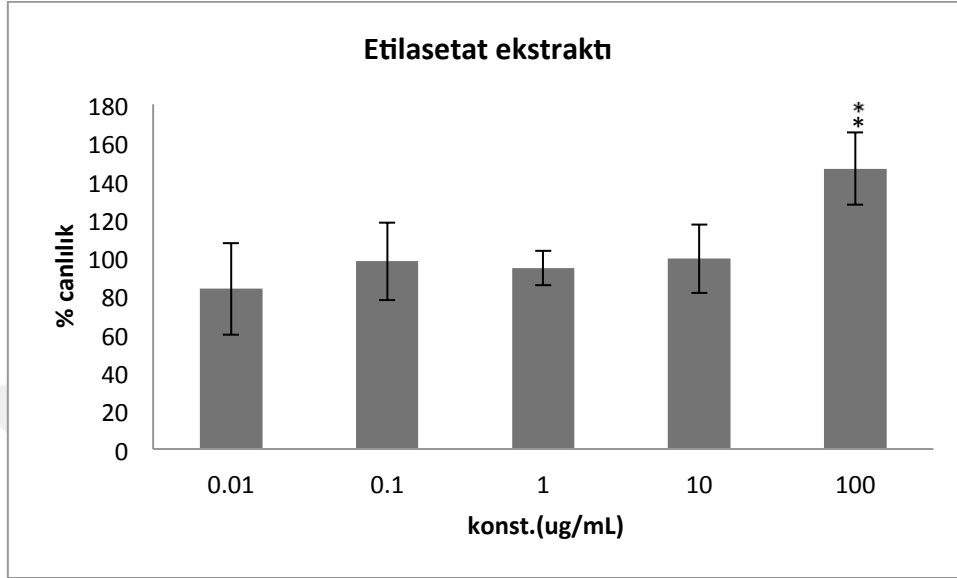
\*\* $p<0.01$

*Hericium erinaceus* etilasetat ekstraktı ile yapılan canlılık inhibisyon değerlendirmesinin sonuçları Grafik 9-11’de verilmiştir. Etil asetat ekstraktının MCF-7 hücrelerinde 24 ve 72. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). En yüksek ekstrakt konsantrasyonunda (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 48. saatte hücre canlılığı % 46 oranında indüklenmiştir ( $p<0.01$ ).

Grafik 9. *Hericium erinaceus* etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.

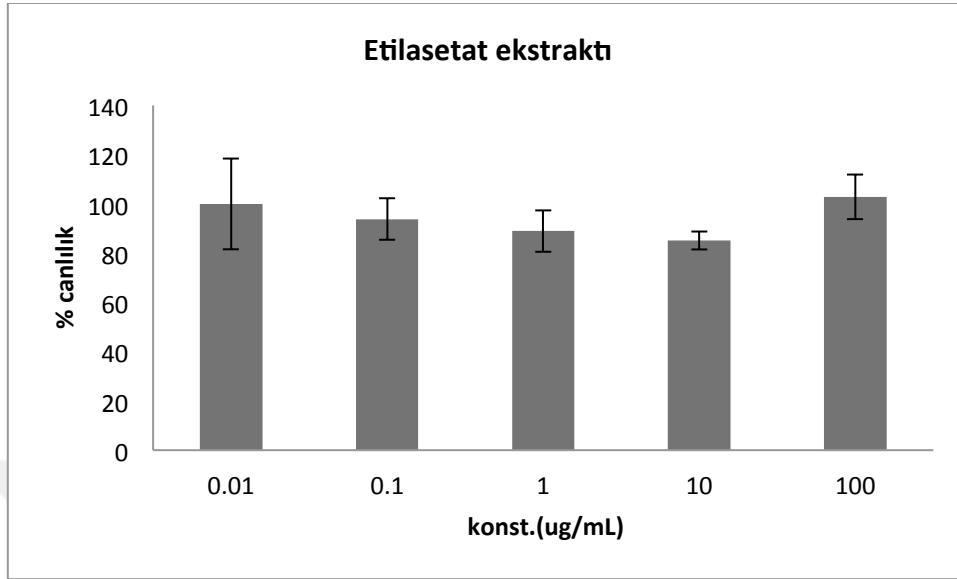


Grafik 10. *Hericium erinaceus* etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



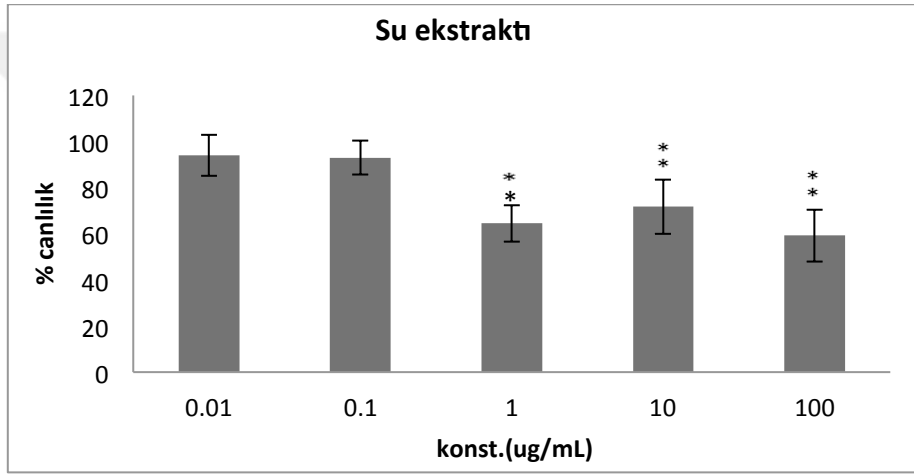
\*\*p<0.01

Grafik 11. *Hericium erinaceus* etilasetat ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



*Hericium erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerine ait 24. saat hücre canlılığı grafiğinde (Grafik 12), 1 µg/mL konsantrasyonda % 36, 10 µg/mL’de % 29 ve uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL’de % 39 oranında anlamlı hücre canlılığı inhibisyonu tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ).

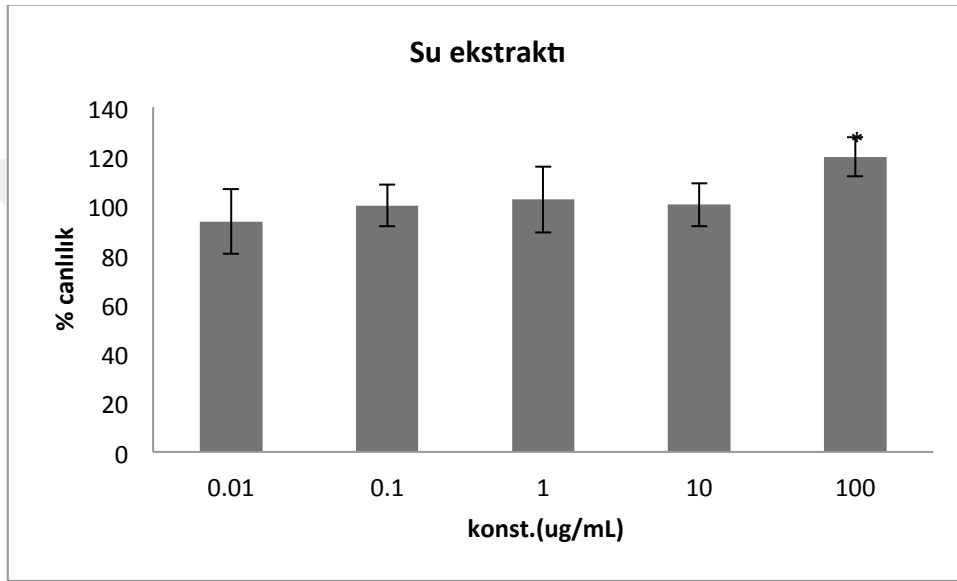
Grafik 12. *Hericium erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.



\*\* $p<0.01$

Bununla beraber su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinin 48. Saat hücre canlılık analizi değerlendirildiğinde 100 µg/mL’de hücre proliferasyonu % 19 artmıştır ( $p<0.05$ ).

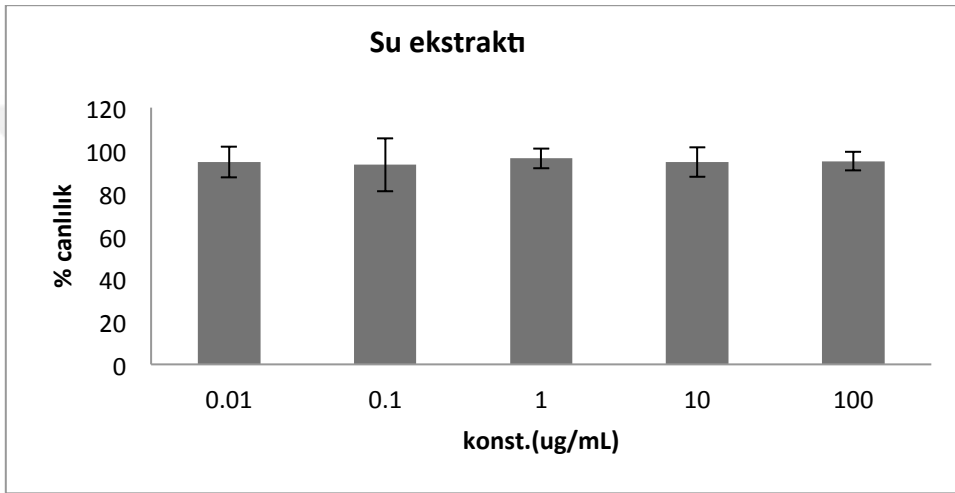
Grafik 13. *Hericium erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



\* $p<0.05$

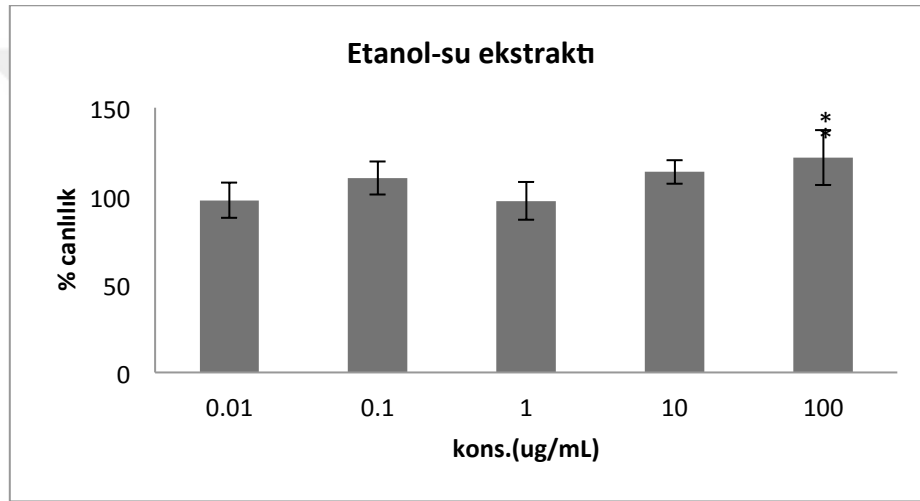
*Hericium erinaceus* su ekstraktının MCF-7 hücrelerinde 72. saat % hücre canlılığı üzerine sitotoksosite veya proliferasyon yönünde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (Grafik 14).

Grafik 14. *Hericium erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



Etanol-su ekstraktının MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri araştırıldığında 24. saatte 0.01- 10 µg/mL konsantrasyon aralığında anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Uygulanan 100 µg/mL etanol-su ekstraktının MCF-7 hücrelerini % 21 oranında proliferate ettiği tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ) (Grafik 15).

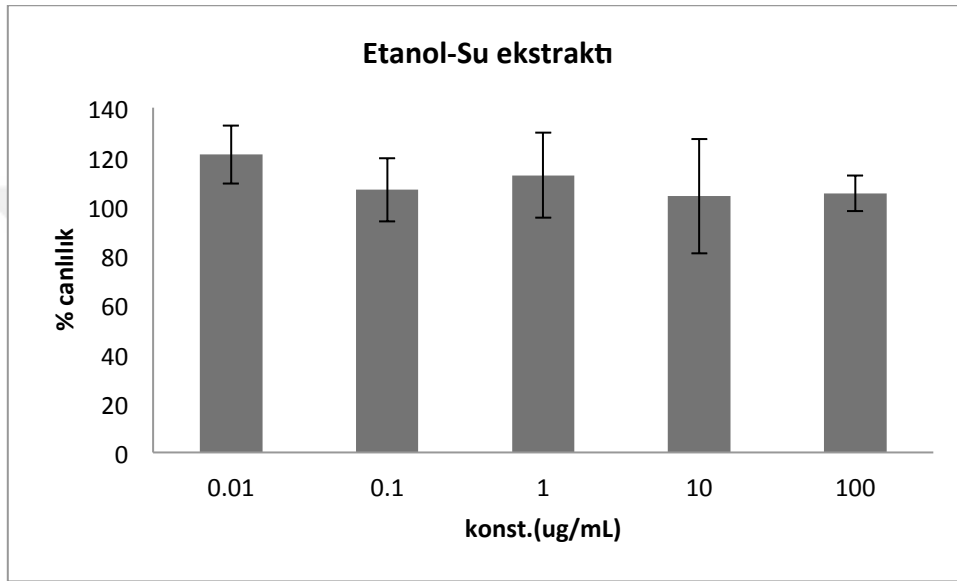
Grafik 15. *Hericium erinaceus* etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.



\*\* $p<0.01$

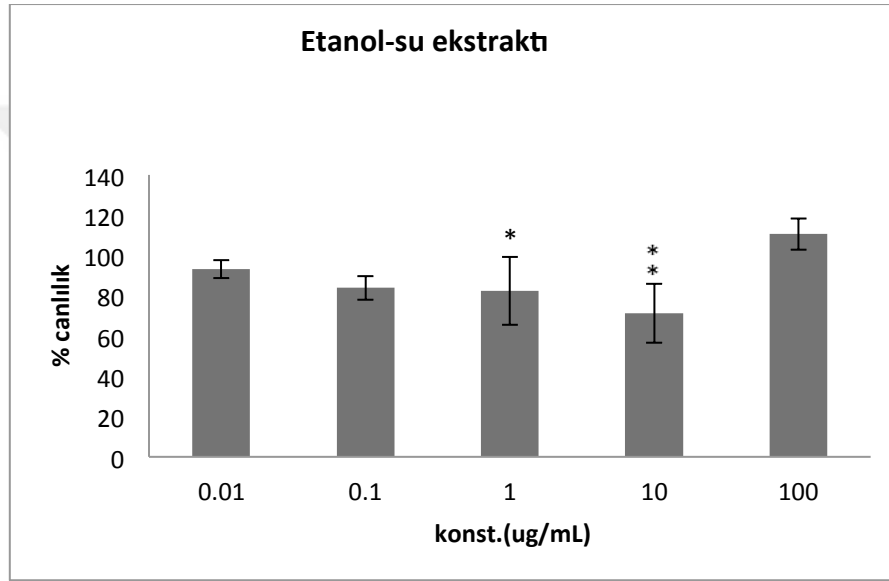
*Hericium erinaceus* etanol-su ekstraktının 48. Saatte hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (Grafik 16).

Grafik 16. *Hericium erinaceus* etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



*Hericium erinaceus* etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat sonunda hücre canlılığı 1 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla % 18 ve % 29 inhibe olmuştur ( $p<0.05$  ve  $p<0.001$ ) (Grafik 17).

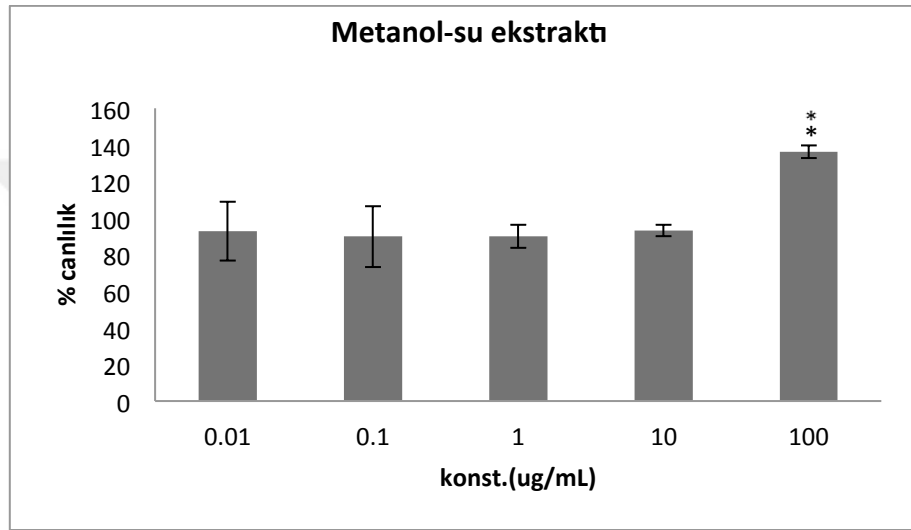
Grafik 17. *Hericium erinaceus* etanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

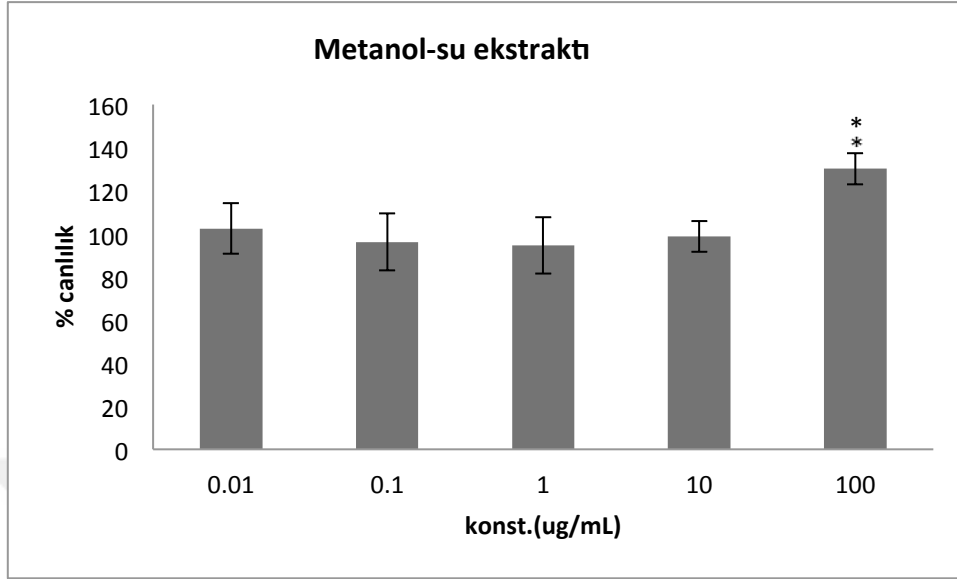
Metanol-su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkileri araştırıldığında 100 µg/ml konsantrasyonda 24. saatte hücre canlılığında % 36 oranında 48. saatte % 30 oranında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ) (Grafik 18 ve 19).

Grafik 18. *Hericium erinaceus* metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24. saat hücre canlılık grafiği.



\*\* $p<0.01$

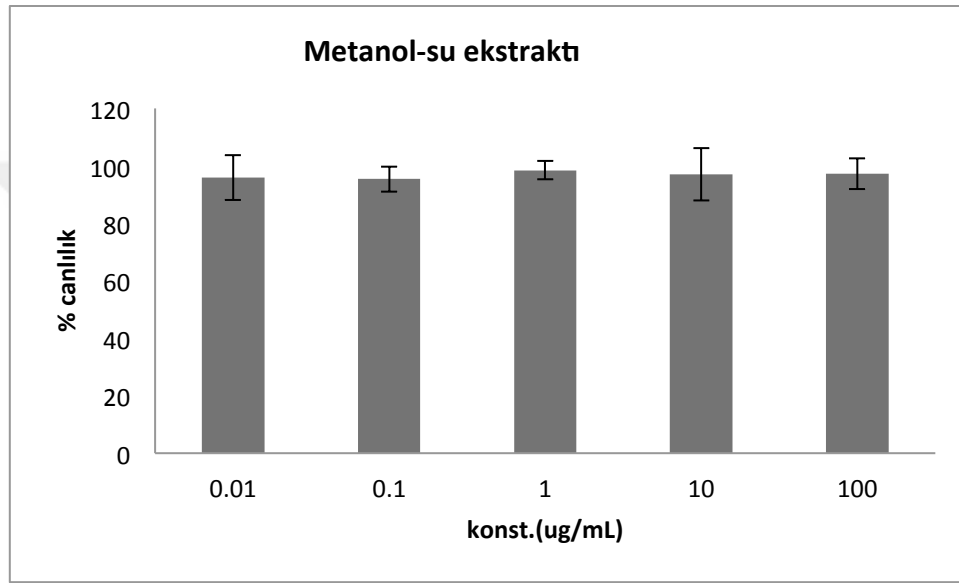
Grafik 19. *Hericium erinaceus* metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat hücre canlılık grafiği.



\*\*p<0.01

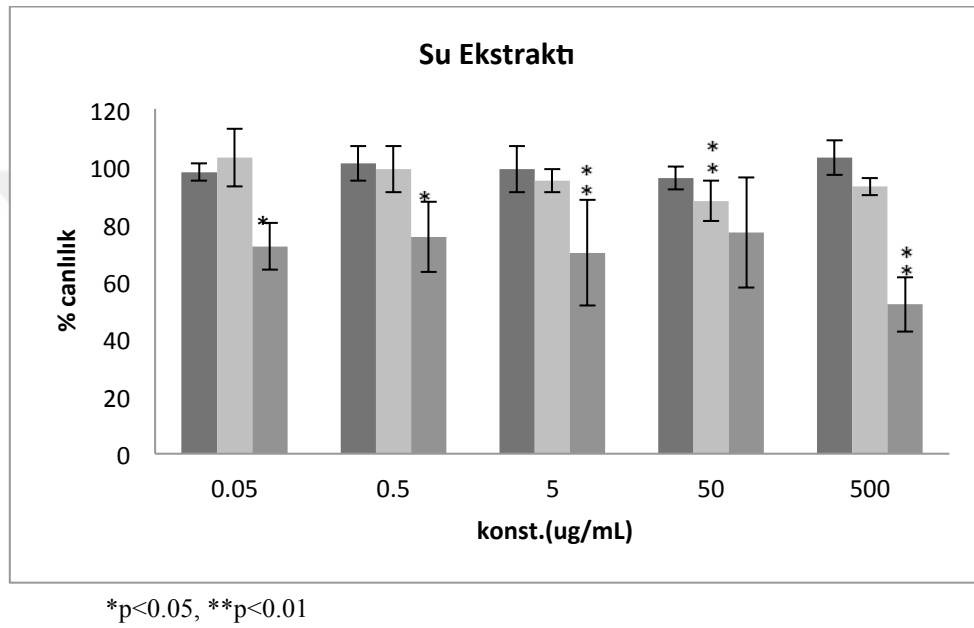
*Hericium erinaceus* metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saatte hücre canlılığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Grafik 20).

Grafik 20. *Hericium erinaceus* metanol-su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saat hücre canlılık grafiği.



Uygulanan *Hericum erinaceus* ekstraktları ile karşılaştırıldığında su ekstraktının MCF-7 hücrelerinde en yüksek oranda hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ) (Grafik 21) .

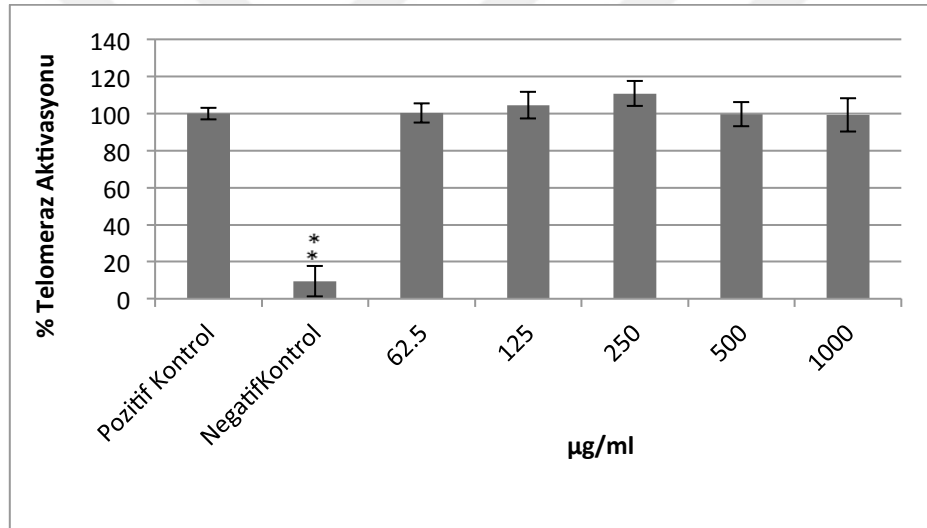
Grafik 21. *Hericum erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 24., 48., ve 72. saatlerde hücre canlılık grafiği.



#### 4.2. Telomeraz aktivite tayini

Telomeraz aktivite yüzde değerleri TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA tayin kiti kullanılarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanan *Hericium erinaceus* su ekstraktının % telomeraz aktivitesi üzerine anlamlı bir etkisi tespit edilmedi (Grafik 22).

Grafik 22. *Hericium erinaceus* su ekstraktı uygulanan MCF-7 hücrelerinde 72. saatte TRAP yöntemi ile elde edilen % telomeraz aktivite değerleri.



\* \*p<0.01

(Telomeraz aktivite tayini için *Hericium erinaceus* su ekstraktı hücrelere IC<sub>(50)</sub> dozunda verilerek 72 saat inkübe edildi. TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA tayin kiti kullanılarak telomeraz aktivite tayini gerçekleştirildi. Sonuçlar UVP dansitometrik analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Pozitif Kontrol: -80 ° C' de muhafaza edilen pozitif kontrol hücreler 20 µL distile suda çözdürüldü, her bir reaksiyon için 1-3 µL kullanıldı. Negatif Kontrol: 10 µL hücre ekstraktı (pozitif kontrol ya da NT (muamele yapılmamış) hücreler) 85 ° C' de 10 dk inkübe edildi).

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri hastalarının yaşam süresini ve kalitesini artırabilecek yeni terapilerin geliştirilmesi üzerinde araştırma yapılan önemli bir konudur (30). Kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde alternatif olarak bitkilerden yararlanılmaktadır. Çin ve Japonya gibi Asya ülkelerinde yüzlerce yıldır mantarlar doğadan toplanmakta ve kültüre edilmektedirler (25). *Hericium erinaceus* (Aslan yelesi veya maymun başı mantarı olarak da isimlendirilmektedir) tedavi edici özellikleri bulunan yenilebilir bir mantar türüdür (59).

Tez çalışmasında *Hericium erinaceus*'un etkilerini araştırmak için MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücreleri meme epitelinin birçok karakteristik özelliğini içeren östrojen reseptör pozitif ER (+) bir hücre hattıdır (60). Çalışmada *Hericium erinaceus* etanol, eter, etilasetat, su, etanol-su, metanol-su ekstraktları kullanılmıştır. Yapılan hücre canlılık tayini deneyleri sonucunda su ekstraktı dışındaki diğer ekstraktların hücre canlılığını inhibe edici özelliklerinin düşük düzeyde olduğu veya hiç olmadığı tespit edilmiştir. *Hericium erinaceus* su ekstraktı ise hücre canlılığını yüksek düzeyde inhibe etmektedir ( $p<0.01$ ). *Hericium erinaceus* su ekstraktının kimyasal çözümlerde çözünen diğer ekstraktlarına göre daha efektif olması, mantarın içerisinde yüksek miktarda suda çözünebilen polisakkaritlerin bulunması ile açıklanabilir (64).

*Hericium erinaceus*'un antikanser ve antimetastatik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (2, 3). Kim ve arkadaşları *Hericium erinaceus* sıcak su ve etanol, asidik ve alkali ekstraktları ile yaptıkları bir çalışmada tümör taşıyan farelerde *Hericium erinaceus*'un antitümör etkisini göstermişlerdir. Söz konusu çalışma ile CT-26 kolon kanseri fare modelinde tümörün büyümesinin *Hericium erinaceus* ekstraktları ile inhibe edilebildiği bildirilmiştir. Çalışmada sıcak su ve etanol ekstraktlarının asidik ve alkali ekstraktlara göre daha yüksek oranda  $\beta$ -glukan içerdiği ve daha efektif oldukları da gösterilmiştir (48). Allograft fare modelleri üzerinde ve birçok *in vitro* çalışmada *Hericium erinaceus*'un anti-metastatik özelliği geniş kapsamlı olarak araştırılmıştır (46). Ayrıca, *Hericium erinaceus* sıcak su ve etanol ekstraktlarının CT-26 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ayrıca *ekstraselüler matriks-degradasyon proteazlarının*,

*metalloproteinazların (MMP) ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün (u-PA) gen ekspresyonlarını azalttığı* belirlenmiştir. Hücre büyümesini düzenleyen sinyal proteinleri *ekstrasellüler regüle kinaz'ın (ERK), JNK, p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK)* ve diğer hücre büyümesi ile ilişkili sinyallerin fosforilasyonlarını baskılandığı bulunmuştur (49). Li ve arkadaşları tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada ise *Hericium erinaceus* etanol ekstraktlarının karaciğer kanseri HepG2 ve Huh-7, kolon kanseri HT-29 ve mide kanseri NCI-87 hücre hatları üzerinde anti-kanser potansiyele sahip bulunduğu bildirilmiştir (3).

Yapılan araştırmalar *Hericium erinaceus* mantarının su ve etanol ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre daha efektif olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde su ekstraktı MCF-7 hücrelerinin canlılığını diğer ekstraktlara göre yüksek bir oranla inhibe etmiştir. Bu veriler, su ekstraktının karakterize edilerek kanser hücreleri üzerine olan etki mekanizmalarının daha ileri araştırmalar ile incelenmesinin önemini göstermektedir. Bu amaçla telomeraz aktivite ölçümleri yapılmıştır. *Hericium erinaceus* su ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde telomeraz aktivitesi üzerine bir etki göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlar, su ekstraktının MCF-7 hücreler üzerinde antiproliferatif etki mekanizmasını telomeraz aktivitesi üzerinden gerçekleştirmediğini göstermektedir. Bu sebeple su ekstraktının MCF-7 hücrelerinde farklı mekanizmalar aracılığı ile hücre canlılığı üzerine etki gösterdiği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında araştırmalar MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılarak yapılmıştır. MCF-7 hücre hattı hücreleri meme epitelinin birçok karakteristik özelliğini içermektedir. Bununla beraber *Hericium erinaceus*'un anti-kanser etki mekanizmalarını aydınlatmak için farklı hücresel karakteristikleri bulunan diğerk meme kanseri hücre hatlarında da hücre canlılığı ve telomeraz aktivite tayini çalışmaları yürütölmesi faydalı olacaktır. Ayrıca, anti-kanser etkinin hangi yolaklar üzerinden gerçekleştirildiğı yeni projeler ile araştırılmalıdır.

Bu çalışmalara ek olarak *Hericium erinaceus*'un kimyasal bileşenleri ayrıntılı şekilde araştırılmalıdır. Mantarın içeriğinde bulunan polisakkaritlerin kimyasal yapıları daha ayrıntılı incelenmek ve elde edilecek olası etken saf maddeler ile yapılacak ileri araştırmalar mantarın anti-kanser mekanizmasını hangi yolaklar üzerinden gerçekleştirdiğini daha kesin bir şekilde gösterecektir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Jiang S, Wang S, Sun Y, Zhang Q. Medicinal properties of *Herichium erinaceus* and its potential to formulate novel mushroom-based pharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;7661-70.
2. Li W, Zhou W, Kim EJ, Shim SH, Kang HK, Kim YH. Isolation and identification of aromatic compounds in Lion's mane mushroom and their anticancer activities. *Food Chemistry*. 2015;336-42.
3. Li G, Yu K, Li F, Xu K, Li J, He S, et al. Anticancer potential of *Herichium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014;521-30.
4. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine*. 1999;1164-70.
5. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2011;319-26.
6. Jia LM, Liu L, Dong Q, Fang JN. Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Herichium erinaceus*. *Carbohydrate Research*. 2004;2667-71.
7. Lai PL, Naidu M, Sabaratnam V, Wong KH, David RP, Kuppusamy UR, et al. Neurotrophic properties of the Lion's mane medicinal mushroom, *Herichium erinaceus* (Higher Basidiomycetes) from Malaysia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2013;539-54.
8. Noh HJ, Yang HH, Kim GS, Lee SE, Lee DY, Choi JH, et al. Chemical constituents of *Herichium erinaceum* associated with the inhibitory activity against cellular senescence in human umbilical vascular endothelial cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015;1-7.
9. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1994; 307-15.
10. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990;866-8.

11. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 1997;25-34.
12. Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *The Journal of Cell Biology*. 1999;589-601.
13. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*. 1992;1921-9.
14. Nakamura TM, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell*. 1998;587-90.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;57-70.
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;646-74.
17. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991 ;569-73.
18. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*. 1992;951-60.
19. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Research*. 1996;218-22.
20. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2005;611-22.
21. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;72-6.
22. Shay JW, Wright WE. Hallmarks of telomeres in ageing research. *The Journal of Pathology*. 2007;114-23.
23. Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider and Jack W. Szostak. How chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase. The Nobel assembly at karolinska institutet. 2009. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.pdf)
24. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*. 2004;592-603.

25. Novaes MR, Valadares F, Reis MC, Goncalves DR, Menezes Mda C. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: evidence-based medicine. *Clinics*. 2011;2133-9.
26. Kamby C, Vejborg I, Kristensen B, Olsen LO, Mouridsen HT. Metastatic pattern in recurrent breast cancer. Special reference to intrathoracic recurrences. *Cancer*. 1988;2226-33.
27. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;1672-94.
28. Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Seminars in Oncology*. 2001 Feb;28(1):53-67.
29. Başara BB , Güler C, Yentür KG., Birge B, Pulgat E, Ekinci MB. Sağlık istatistikleri yılı 2012. Ankara: Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü/Sağlık Bakanlığı; 2013; 31-3.
30. Gerber B, Freund M, Reimer T. Recurrent breast cancer: treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life. *Deutsches Arzteblatt International*. 2010;85-91.
31. Sledge GW, Jr., Hu P, Falkson G, Tormey D, Abeloff M. Comparison of chemotherapy with chemohormonal therapy as first-line therapy for metastatic, hormone-sensitive breast cancer: An eastern cooperative oncology group study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;262-6.
32. Elbatrawy EN, Ghonimy EA, Alassar MM, Wu FS. Medicinal mushroom extracts possess differential antioxidant activity and cytotoxicity to cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015;471-9.
33. Miller K. How mushrooms can save the world. *Discover magazine*; 2013. <http://discovermagazine.com/2013/julyaug/13-mushrooms-clean-up-oil-spills-nuclear-meltdowns-and-human-health>
34. Petrova RD, Mahajna JA, Denchev CM. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. 2005;141-6.

35. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. Ganoderma lucidum suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. *Nutrition and Cancer*. 2004;209-16.
36. Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan H, et al. Differential anti-tumor activity of coriolus versicolor (Yunzhi) extract through p53- and/or Bcl-2-dependent apoptotic pathway in human breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*. 2005;638-44.
37. Jiang J, Sliva D. Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2010;1529-36.
38. Yang BK, Park JB, Song CH. Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Herichium erinaceus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003;1292-8.
39. Valverde ME, Hernandez-Perez T, Paredes-Lopez O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*. 2015; 376387.
40. Khan MA, Tania M, Liu R, Rahman MM. *Herichium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*. 2013;10.
41. Harville T. Plant details- *Herichium erinaceus*. North carolina native plant society; 2013. [http://www.ncwildflower.org/plant\\_galleries/details/Herichium-erinaceus/](http://www.ncwildflower.org/plant_galleries/details/Herichium-erinaceus/)
42. Wu DT, Li WZ, Chen J, Zhong QX, Ju YJ, Zhao J, et al. An evaluation system for characterization of polysaccharides from the fruiting body of *Herichium erinaceus* and identification of its commercial product. *Carbohydrate Polymers*. 2015;201-7.
43. Choi BS, Sapkota K, Choi JH, Shin CH, Kim S, Kim SJ. Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Herichium erinaceum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013;609-22.
44. Kobayashi S, Inoue T, Ando A, Tamanoi H, Ryu I, Masuyama A. Total synthesis and structural revision of hericerin. *The Journal of Organic Chemistry*. 2012;5819-22.

45. Kim KH, Noh HJ, Choi SU, Lee KR. Isohericenone, a new cytotoxic isoindolinone alkaloid from *Herichium erinaceum*. *The Journal of Antibiotics*. 2012;575-7.
46. Xie C-y, Gu Z-x, You X, Liu G, Tan Y, Zhang H. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010;125-8.
47. Dong Q, Jia L-m, Fang J-n. A  $\beta$ -d-glucan isolated from the fruiting bodies of *Herichium erinaceus* and its aqueous conformation. *Carbohydrate Research*. 2006;791-5.
48. Dong Q, Jia LM, Fang JN. A beta-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Herichium erinaceus* and its aqueous conformation. *Carbohydrate Research* 2006;791-5.
49. Dunaevsky YE, Popova VV, Semenova TA, Beliakova GA, Belozersky MA. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. *Biochimie*. 2014;10-20.
50. Li Y, Zhang G, Ng TB, Wang H. A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Herichium erinaceum*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2010; 716515.
51. Han ZH, Ye JM, Wang GF. Evaluation of in vivo antioxidant activity of *Herichium erinaceus* polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;66-71.
52. Kim SP, Kang MY, Kim JH, Nam SH, Friedman M. Composition and mechanism of antitumor effects of *Herichium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;9861-9.
53. Yang Y, Zhu X, Chen Y, Wang X, Chen R. p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 2007;26-33.
54. Kim SP, Nam SH, Friedman M. *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom extracts inhibit metastasis of cancer cells to the lung in CT-26 colon cancer-tansplanted mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;4898-904.

55. Wang M, Gao Y, Xu D, Konishi T, Gao Q. *Herichium erinaceus* (Yamabushitake): a unique resource for developing functional foods and medicines. *Food & Function*. 2014 ;3055-64.
56. Safa AR. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Experimental Oncology*. 2012 ;176-84.
57. Lee JS, Hong EK. *Herichium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*. 2010;144-54.
58. Shu L, Cheung KL, Khor TO, Chen C, Kong AN. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*. 2010;483-502.
59. Kim SP, Kang MY, Choi YH, Kim JH, Nam SH, Friedman M. Mechanism of *Herichium erinaceus* (Yamabushitake) mushroom-induced apoptosis of U937 human monocytic leukemia cells. *Food & Function*. 2011; 348-56.
60. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;249-89.
61. Held P. An absorbance-based cytotoxicity assay using high absorptivity, water-soluble tetrazolium salts. BioTek instruments. 2009. [http://www.biotek.com/assets/tech\\_resources/An\\_Absorbance-based-Cytotoxicity\\_AppNote.pdf](http://www.biotek.com/assets/tech_resources/An_Absorbance-based-Cytotoxicity_AppNote.pdf)
62. Sigma-Aldrich. Cell Counting Kit-8 Genel Bilgi, St. Louis;2011. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>
63. Roche applied science. TeloTAGGG telomerase ELIS PCR, Mannheim; 2010. <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/44383c77-93ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>
64. Wang JC, Hu SH, Lee WL, Tsai LY. Antimutagenicity of extracts of *Herichium erinaceus*. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2001;230-8.

## ÖZGEÇMİŞ

|                            |                                               |
|----------------------------|-----------------------------------------------|
| Ad / Soyad                 | Duygu GENÇALP                                 |
| Adres                      | Zafer Caddesi 9/9 35100 Bornova/İZMİR/TÜRKİYE |
| Telefon                    | 0232 390 36 99                                |
| e-posta                    | gencalpduygu@gmail.com                        |
| Uyruk                      | Türk                                          |
| Doğum tarihi               | 17.06.1991                                    |
| Cinsiyet                   | Bayan                                         |
| <b>Eğitim ve Öğretim</b>   |                                               |
| Tarihler                   | Giriş 2009                                    |
| Kazanılan yeterliliğin adı | Biyolog                                       |
| Kapsam                     | Biyoloji                                      |
| Kurum                      | Ankara Üniversitesi, yükseköğretim kurumu     |
| Düzey                      | Lisans programı (4 yıl)                       |
| Tarihler                   | Giriş 2014                                    |
| Kazanılan yeterliliğin adı | Tıbbi Biyokimya Yüksek lisans öğrencisi       |
| Kapsam                     | Tıbbi Biyokimya                               |
| Kurum                      | Ege Üniversitesi, yükseköğretim kurumu        |
| Düzey                      | Yüksek lisans programı (2 yıl)                |

## Stajlar

|                   |                                      |
|-------------------|--------------------------------------|
| Tarihler          | 01.08.2010-25.08.2010                |
| Meslek veya konum | Biyoloji lisans öğrencisi            |
| Ana faaliyetler   | Gönüllü stajyerlik                   |
| Adresi            | Yöntem Laboratuvarı- Yaşam Hastanesi |
| Magosa/KKTC       |                                      |

|                             |                                                |
|-----------------------------|------------------------------------------------|
| Tarihler                    | 05.06.2013-07.07.2013                          |
| Meslek veya konum           | Biyoloji lisans öğrencisi                      |
| Ana faaliyetler             | Gönüllü stajyerlik                             |
| Adresi                      | Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi |
| Merkez Laboratuvarı, Ankara |                                                |