

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2016-YL-008**

***LEPISTA NUDA*'DAN ELDE EDİLEN
EKSTRAKTLARIN SİTOTOKSİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Esin Hafize DEĞİRMENCİ

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Ali ÖZMEN**

AYDIN-2016

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esin Hafize DEĞİRMENCİ tarafından hazırlanan *Lepista nuda*'dan elde edilen ekstraktların sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi başlıklı tez, 20.01.2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. Ali ÖZMEN	ADÜ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Özlem AKAN	ADÜ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hakan ALLI	MSKÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

....../....../2016

Esin Hafize DEĞİRMENCİ

ÖZET

LEPISTA NUDA'DAN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Esin Hafize DEĞİRMENCİ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali ÖZMEN

2016, 37 sayfa

Makrofunguslar yüzyıllardan beri besin ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadırlar. Makrofunguslar arasında, iki bin yıldan daha uzun zamandır bilinmekte olan *Ganoderma lucidum* (Reishi, Ling Zhi) Çin’de ölümsüzlük mantarı olarak anılmaktadır. Çok sayıda çalışma bu mantarın kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. *Ganoderma* özütleri veya elde edilen bileşikler hücre döngüsünü durdurmakta veya apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Diğer taraftan tez kapsamında çalışılacak olan *Lepista nuda* ile ilgili biyolojik aktivite çalışmalarının literatürde yer aldığı görülmüştür. Diğer taraftan aynı genusa ait başka türlerden ve *Lepista nuda*’nın da dahil olduğu Tricholomatacea familyası üyelerinden aktif bileşiklerin izole edildiği bildirilmiştir.

Tez kapsamında yenilebilir bir mantar türü olan *Lepista nuda*’dan polarite artışına dayalı ekstraksiyonlar yapılmıştır. Elde edilen özütler artan konsantrasyonlarda HL-60 (lösemi) ve MCF-7 (meme kanseri) kanser hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak paklitaksel ve doksorubisin kullanılmıştır.

Her iki hücre hattında da Metanol özütlerinin 40 mg/ml konsantrasyonları etkili bulunmuştur. Özüt, HL-60 hücre hattında hem proliferasyon hem de apoptotik etki bakımından oldukça iyi düzeyde biyolojik aktivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lepista nuda*, HL-60, MCF-7, Proliferasyon, Apoptosis

ABSTRACT

DETERMINING THE CYTOTOXIC ACTIVITIES OF EXTRACTS DERIVED FROM *LEPISTA NUDA*

Esin Hafize DEĞİRMENCİ

Master Thesis, Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ali ÖZMEN

2016, 37 pages

Macrofungi are used as food and for therapy since centuries. Among macrofungi, *Ganoderma lucidum* (Reishi, Ling Zhi) known more than two thousand years and called as mushroom of immortality in China. Numerous researches show that this mushroom is effective on cancer cells. *Ganoderma* extracts or isolated compounds cause cell cycle arrest or apoptotic cell death. On the other hand it was observed that there are papers in the literature on biological activities of *Lepista nuda* which will be studied in scope of this thesis. It was reported that active substances were isolated from other species of the same genus and from members from Tricholomataceae family also include *Lepista nuda*.

In scope of this thesis extractions depended on polarity increase was made from edible mushroom *Lepista nuda*. Obtained extracts was applied to HL-60 (leukemia) and MCF-7 (breast cancer) cancer cell lines. As positive control paclitaxel and doxorubicin was used.

40 mg/ml concentration of methanol extract was found effective on both cell lines. The extract has showed fairly good level of biologic activity in HL-60 cell line with regarded both proliferation and apoptotic effect.

Key Words: *Lepista nuda*, HL-60, MCF-7, Proliferation, Apoptosis

ÖNSÖZ

Hem tez çalışmam hem de yaptığım diğer bütün işlerim ve çalışmalarım bana yol gösteren, zaman ayıran, yanımda olduğunu hissettiren ve her zaman herşeyi başaracağıma inanmamı sağlayan çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Ali ÖZMEN'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamda materyel ararken bilgisi, sabrı, içtenliği ve tüm samimiyetiyle bana yardımcı olan çok değerli babam Hasan DEĞİRMENCİ, değerli aile dostumuz Mustafa DAĞ ve eşi Şehnaz DAĞ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her anında yanımda olan sevgisini, fedakârlığını, emeğini, inancını benden eksik etmeyen, hertürlü maddi manevi destekleri ile hep yanımda olduğunu hissettiren her ne olursa olsun arkamda olan benim başarıyı kendi başarısı, hüznümü kendi hüznü bilen canım babam Hasan DEĞİRMENCİ ve canım annem Münevver DEĞİRMENCİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yalnız olmadığımı hissettiren yaptığım her işte kendi başarıları gibi sevinip mutlu olan tecrübe ve deneyimleri ile hayatı daha çabuk kavramamı sağlayan ve küçük yaşlarda büyüüp olgunlaşmamı sağlayan benimle birlikte sevinip üzülen, hertürlü desteklerini benden hiç eksik etmeyen annem ve babamın bana hediye ettiği en değerli iki varlığım, biricik ablalarım Bahar DEĞİRMENCİ ve Banu DEĞİRMENCİ'ye çok teşekkür ederim.

Esin Hafize DEĞİRMENCİ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mantarların Genel Özellikleri	1
1.2. Mantarların Kimyasal Bileşimi	2
1.3. Mantarların Kullanım Alanları.....	3
1.4. Yenilebilir ve Zehirli Mantarlar	4
1.5. Mantarların Tıbbi Özellikleri	5
1.6. Kanseri ve Mantarlar	6
1.7. <i>Lepista</i> Çalışma Örnekleri.....	7
1.8. <i>Lepista nuda</i> 'nın Kimyasal İçeriği.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Mantarın Toplanması	14
3.2. Mantarlardan Ekstraktların Elde Edilmesi	14
3.2.1. Kimyasallar	14
3.2.2. Mantarların Ekstraksiyonu ve Çözücülerin Uzaklaştırılması.....	14
3.2.2.1. Petrol Eteri Ekstraktı	15
3.2.2.2. Etil Asetat Ekstraktı	15

3.2.2.3. Diklormetan Ekstraktı	15
3.2.2.4. Metanol Ekstraktı	15
3.2.3. Elde Edilen Ekstraktların Çözünmesi.....	16
3.3. Hücre Kültürü.....	17
3.3.1. Hücrelerin ve Kültür Ortamlarının Temini.....	17
3.3.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekstrakt Uygulamaları.....	17
3.3.3. Canlı Hücre Sayımı	18
3.4. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi	19
3.5. İstatistiki Değerlendirme	20
4. BULGULAR	21
4.1. Bölünmeyi Engelleyici Aktivite Bulguları	21
4.2. Apoptosis Yöntemine İlişkin Bulgular	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

LDL	: Low-density lipoprotein
HDL	: High-density lipoprotein
NF-kB	: Nuclear Factor kappa B, transkripsiyon faktörü
AP-1	: Activator protein-1, transkripsiyon faktörü
MIC	: Minimum inhibitory concentration
BHA	: Butylated hydroxyanisole
BHT	: Butylated hydroxytoluene
L1210	: Mouse lymphocytic leukemia cells
3LL	: Lewis lung carcinoma
K-562	: Chronic myelogenous leukemia
U-251	: Glioblastoma cell line
DU145	: Human prostate cancer cell line
MCF-7	: Human breast adenocarcinoma cell line
Hep-G2	: Liver hepatocellular carcinoma
KATO III	: Human gastric carcinoma
AGS	: Human Caucasian gastric adenocarcinoma
NIH/3T3	: Mouse embryonic fibroblast cell line
HEK-293	: Human embryonic kidney
MDA-MB231	: Breast Adenocarcinoma
HT-29	: human colorectal adenocarcinoma cell line
HL-60	: Human promyelocytic leukemia cells
ATCC	: American Type Culture Collection
IC50	: %50 inhibe edici konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

rpm	: dakikadaki dönüş sayısı
PBS	: Phosphate-buffered saline
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
HO/PI	: Hoechst / Propidium iodide
P.E.	: Petrol eteri
E.A.	: Etil asetat
DIKL.	: Diklormetan
MET.	: Metanol
CD95L	: Hücre yüzey reseptörü (ölüm reseptörü) ligandı
TRIAL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
TNF- α	: Tumor necrosis factor alpha
ROS	: Reactive oxygen species
DNA	: deoxyribonucleic acid,
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor 1
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2, hücre ölümü düzenleyici protein
Bcl-xL	: B-cell lymphoma-extra large, mitokondride transmembran protein
Mcl-1	: Myeloid Cell Leukemia 1, hücre ölümü ve yaşamı arasında düzenleme yapan protein
XIAP	: X-linked inhibitor of apoptosis protein, Apoptosis inhibitörü
Bax	: BCL2-Associated X Protein
Bid	: BH-3 interacting domain
Bak	: BCL-2 antagonist or killer
Smac	: Second mitochondria derived activator of caspase
G2/M	: Hücre döngüsü kontrol noktası

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. HO/PI Boyama	20
Şekil 4.1. <i>Lepista nuda</i> HL-60 uygulaması	22
Şekil 4.2. <i>Lepista nuda</i> MCF-7 uygulaması	23
Şekil 4.3. <i>Lepista nuda</i> HL-60 ve MCF-7 apoptosis uygulaması	24
Şekil 4.4. <i>Lepista nuda</i> metanol özütü apoptosis uygulaması	25

1. GİRİŞ

Tarihsel süreç içinde mantarlar incelenecek olursa iki farklı coğrafya dikkatleri çekmektedir. Avrupa açısından bakılacak olursa; 1700’lü yıllarda Fransız köylüler at arabası yollarının kenarlarında, beyaz şapkalı mantar olarak da bilinen kültür mantarının (*Agaricus bisporus*) bol miktarda çıktığını tespit etmişlerdir. Yol kenarında bulunan ve mantarın üzerinde çıktığı at gübresi ve saman karışımı köylülerin dikkatini çekmiştir. Bu karışımı alıp ahırlarında kendi yaptıkları saman ve at dışkısı karışımına ilave eden köylüler, aynı mantarın bu karışım üzerinde de çıktığını belirlemişlerdir (Wood ve Goodenough, 1977; Smith vd., 1995). Bu tespitten günümüze kadar birçok bilim dalı tarafından, *Agaricus bisporus* üzerinde sayısız araştırmalar yapılmıştır. Bu gün dünyada en fazla üretilen ve tüketilen mantar türü olarak bilinmektedir. Moleküler biyolojik çalışmaların popüler olduğu 2000’li yılların başında makrofunguslar ile yapılan birçok çalışmada temel organizma olarak bu mantar türünün kullanıldığı açıkça görülmektedir (Sonnenberg, 2000; Stop ve Moolbroek, 1999).

Orta Asya’da ise 2000 yıldan daha uzun zamandır bilinmekte olan *Ganoderma lucidum* (Reishi, Ling Zhi) Çin’de ölümsüzlük mantarı olarak anılmaktadır. Japon ve Çin kültüründe önemli bir yere sahip olan bu mantarın pek çok ismi bulunmaktadır. Japonlar Reishi ya da Mannentake, Çinliler ve Koreliler Ling Zhi veya Ling Chi (Ölümsüzlük Mantarı) şeklinde adlandırmaktadırlar. *Ganoderma lucidum*, *Basidiomycetes* sınıfında, *Aphyllphorales* ordosunun, *Polyporaceae* (*Ganodermataceae*) familyasına ait bir türdür. Latince’de “*lucidus*” parlak ya da göz alıcı anlamındadır. Son yıllarda sadece Çin ve Japonya da değil Kuzey Amerika ve Dünyanın diğer bölgelerinde de tıbbi yararlarının kavranması nedeniyle, *Ganoderma lucidum*’un mantar meyvesi (basidiocarp) yetiştirilmektedir (Uysal, 2006).

1.1. Mantarların Genel Özellikleri

Fungi aleminde yer alan Makrofunguslar; *Basidiomycetes* ve *Ascomycetes* sınıflarından oluşmaktadır. Klorofil içermezler. Hem eşeyli hem de eşeysiz olarak sporla üreme gösterirler. Doğadaki en büyük işlevleri organik maddeleri parçalayarak karbon ve azot döngüsüne katkıda bulunmaktır (Üstün, 2011).

Makrofunguslar hif adı verilen ipliksi hücreleri aracılığı ile bulundukları substrat üzerinde vejetatif gelişimlerini sürdüren canlılardır. Hiflerin oluşturduğu ağısı yapıya misel denir ve misellerin birbirleriyle yaptığı anastomozlar sonucunda çoklu misel kümeleri oluşur. Generatif safha üreme birimlerinin de içinde bulunduğu makroskobik yapılar (fruktifikasyon yapısı veya sporokarp) ile karakterize edilir. Bu yapılar türlerin teşhisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Morfolojik olarak farklılık arz eden fruktifikasyon yapıları bulundukları sınıflar içinde farklı isimlendirilirler; Ascomycetes için askokarp veya Basidiomycetes için basidiokarp gibi örnekler verilebilir (Alexopoulos vd., 1996; Jennings ve Lysek, 1999).

1.2. Mantarların Kimyasal Bileşimi

Makrofunguslar insan sağlığı açısından önemli vitamin ve mineral maddeleri içerirler. % 92 oranında su içeren taze mantarın geri kalan kuru ağırlığının % 8 kısmı protein, yağ, karbonhidrat, vitaminler, kalsiyum, fosfor, potasyum, demir, bakır, lif ve külden meydana gelmiştir (Matilla vd., 2002).

Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdır. İnsan beslenmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermektedirler, buna rağmen triptofan seviyeleri kısmen düşüktür. Ayrıca mantarlar sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, brom, mangan, çinko, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit ve folik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindirler (Boztok, 1990; Kolcuoğlu, 2005).

Mantarlar, birçok et ve süten daha az ancak birçok sebzededen daha çok protein içeren, kolayca sindirilebilir bir protein kaynağıdır. Protein miktarı (kuru ağırlık) %10-40 arasında değişebilir. Mantarlar esansiyel tüm aminoasitleri içerir ancak metiyonin, sistin ve sülfür aminoasitlerini az miktarda bulundururlar (Smith vd., 2002).

Mantarlar özellikle tiyamin (B1), riboflavin (B2), niyasin, biyotin ve askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminlerin kaynağıdır. Şapkalı mantar türleri, B1 (tiyamin), B2 (riboflavin), B3 (pantotenik asit), B5 (nikotinik asit), B7 (biyotin) ve C (askorbik asit) vitamini yönünden zengin besinlerdir. Ayrıca bu mantarlar folik asit bakımından da zengin olduğundan kansızlık tedavisinde kullanılabilir. Bazı

türler fark edilebilir miktarda β -karoten ve ergosterol içerir (Bunlar ultraviyole ışınlarına maruz kaldıklarında aktif D vitaminine dönüşürler). Mantarlardaki ham yağlar, yağ asitleri mono-, di- ve tri- gliseritler, steroller, sterol esterleri ve fosfolipidler dâhil tüm ana lipid bileşenlerini içerir. Yağ seviyeleri genelde düşük olup, kuru mantarın yaklaşık % 2-8'ini oluşturur. Hiç şüphesiz yenen mantarların tazeyken ve işlendikten sonraki halleri birçok insan için, özellikle de vejetaryenler için önemli bir besin kaynağıdır (Smith vd., 2002).

Karbonhidratlar kuru ağırlığın yarısını meydana getirir. Karbonhidratlar; glukagon, mono-disakkaritler, şeker alkoller, glikojen ve kitin olup, temelde hücre duvarının bileşenini oluştururlar (Matilla vd., 2002).

1.3. Mantarların Kullanım Alanları

Makrofunguslar yüzyıllardan beri besin ve tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar. Mantar proteininin sindirilebilme değeri %72–83 arasındadır. İnsan beslenmesi için gerekli esansiyel aminoasitlerden başka tüm aminoasitleri içermektedir. Ayrıca mantarda çok az yağ bulunmasına rağmen esansiyel yağlar da dâhil tüm yağ asidi çeşitlerini içerir. Mükemmel bir folik asit kaynağıdır. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyet kullanılmaktadır (Kalac, 2009).

Avrupa ülkelerinde doğada yetişen çok sayıda mantar türü lezzetli bir yiyecek olarak tüketilmektedir. Ancak bunların besin değerleri ile ilgili tam bir bilgi mevcut değildir. Kuru madde miktarı kg'da yaklaşık 100 g'dır. Bu yapıda en çok polisakkaritler ve proteinler bulunurken yağ miktarı oldukça düşüktür. Tipik karbonhidratlar kitin, glikojen, mannitol ve trehaloz (mikoz)'dur. Esansiyel aminoasit oranı beslenme açısından uygundur. Diğer taraftan mantarlar düşük enerjiye sahiptirler, sindirilmesi güç lifler içerirler ve spesifik beta glukanları vardır. Antioksidan özelliğe ve değişik lezzetlere sahiptirler. Bu özellikleri bakımından birçok mantar türü hem araştırmacıların, hem de tüketicilerin ilgisini çekmektedirler (Kalac, 2009).

Günümüzde modern tekniklerin kullanımı ile makrofunguslardan biyokimyasal metodlar ile değişik enzimlerin açığa çıkarılması ve saflaştırılması çalışmaları yapılabilmektedir (Pelaez vd., 1995; Silva vd., 2005; Saha vd., 2008). Özellikle

mantarlar tarafından üretilen lakkaz, ligninaz, mangan peroksidaz gibi birçok enzimin açığa çıkarılması endüstriyel mikrobiyoloji ve çevre alanındaki yeni çalışmaların önünü açmıştır (Beg vd, 2001; Hou vd., 2004; Boer vd., 2004).

Yenilebilir ve zehirli mantarların tarımda kullanımı açısından insektisit ve böcek beslenme engelleyici özelliği araştırılmıştır. Bunun için model böcek olarak *Drosophila melanogaster* kullanılmıştır. 175 farklı mantardan elde edilen gövde tozları böceğe karşı test edilmiştir. Bunlardan 79 adetinin böcek gelişimini inhibe ettiği ve bu mantarlardan yeni bileşikler izole edilebileceği bildirilmiştir (Mier vd., 1996).

Gıda güvenliği açısından antimikrobiyal ajanların gıdalara eklenmesi önemlidir. Günümüzde gıdaların içerisinde yer alan antimikrobiyal ajanların çoğu sentetik kimyasallardır. Araştırmacılar bunların yerini alabilecek doğal antimikrobiyal bileşikler üzerinde çalışmaya devam etmektedirler. Bu bakımdan *Lepista nuda* antibakteriyel aktiviteye sahip biyolojik olarak aktif bileşikler içeren yenilebilir bir mantardır (Bo, 2012).

Günümüzde makrofunguslar ile birçok bilim dalı değişik araştırmalar yapmaktadır. Başta ziraat olmak üzere biyoloji, gıda, eczacılık, çevre ve tıp bilim dallarında makrofunguslar ile çalışmalar yapılmakta ve yeni çalışmalar planlanmaktadır.

1.4. Yenilebilir ve Zehirli Mantarlar

Fungal âlem içinde, makrofunguslar kendi içlerinde aşağıda gösterildiği şekilde sınıflandırılabilir. Temelde 3 ana sınıf içinde toplanan makrofungusların yaklaşık içerdikleri tür sayıları da yanlarına yazılmıştır. (Watling, 2003; Chang, 1993; Laessoe, 2002)

A- Yenilebilir Mantarlar 5020 adet

B- Yenilemeyen Mantarlar 2150 adet

C- Zehirli Mantarlar 1010 adet

Makrofunguslar doğada kendiliğinden yetişenler ve kültüre alınanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Doğada kendiliğinden yetişenler zehirli, yenen ve yenmez mantarlar olarak ayırt edilir. Zehirli mantarlar muskarin, amanitin, falloidin, fallosidin, fallidin, viridin, virosin gibi toksik maddeleri taşırlar. Bu toksinler mide, barsak, safra, akciğer ve sinir sistemine zarar verirler (Seeger ve Stijve, 1980).

1.5. Mantarların Tıbbi Özellikleri

Uzak Doğu kültüründe yemek ve ilaç olarak kullanılan makrofunguslar üzerine yapılan çalışmalar günümüzde artarak devam etmektedir. Makrofungusların taşıdığı oldukları tıbbi özellikler üzerine yapılan çalışmalarda etkiler çok çeşitlidir. Kan basıncının kontrolü, antitümör özelliği, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, antimikrobial etki, kolesterol seviyesinin kontrolü, antibiyotik etkisi, antioksidant özelliği, kalp ritminin düzenlenmesi, antiülserik etkisi, lipid metabolizması üzerine etkileri, antidiabetik etkisi, anti-hiv aktivitesi, antiobesitik aktivite, karaciğer-böbrekler üzerinde koruyucu etkisi, antiviral etki, antiaeging etki, seksüel hipofonksiyon tedavisi ve kan hücrelerinin üretimine etkisi gibi etkiler bu kapsamda sayılabilir. Mantarlar besin değerleri ve tıbbi özelliklerinden dolayı insanlar tarafından yaygın olarak tüketilmektedir. Bu mantarlar antioksidan ve antimikrobiyal özellik göstermektedirler. Ayrıca antikanser ve vücut savunma sistemi açısından zengin kaynaklar teşkil etmektedirler. Bu bakımdan mantarlardan elde edilen yeni kimyasallar gelecekte çok daha önemli olacaklardır (Ganeshpurkar vd., 2010).

Antimikrobiyal bileşikler için doğal kaynaklar sürekli araştırılmaktadır. Bunların içerisinde mantarların yeni antimikrobiyaller için güzel bir kaynak oluşturma potansiyeli vardır. Mantarlar seskiterpenler, terpenler, steroidler, antrakınonlar, benzoik asit türevleri ve kinolinler gibi sekonder metabolitlerin yanı sıra oksalik asit gibi primer metabolitleri de içermektedirler. Bunların dışında peptitler ve proteinler bulunmaktadır. Literatür verileri mantar özütlerinin özellikle gram-pozitif bakterileri karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmektedir (Alves vd., 2012).

Antioksidan aktiviteye sahip doğal ürünler Reaktif Oksijen Türlerine karşı savunma mekanizmasını arttırırlar. Bu açıdan beslenmede antioksidanların

tüketilmesi oksidatif hasarı azaltmaktadır. Bu bakımdan mantarlar da önem arz etmektedir. Birçok mantar türü araştırmacılar tarafından antioksidan içerik bakımından ele alınmıştır ve bu kapsamda antioksidan bileşikler tanımlanmıştır. Bunlar fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidlerdir. Doğada yetişen mantarlar insan sağlığını desteklemek açısından beslenmede kullanılmalıdır (Ferreira vd., 2009).

Mantarlar insanlar için besin olmanın yanı sıra son zamanlarda insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı faydalı besin grubuna girmişlerdir. Bu nedenle gıda sanayisi hem kültüre edilen hem de doğada yetişen mantarlarla ilgilenmeye başlamışlardır. Mantarlar özellikle batıda etkili olan ve ölüm oranı yüksek olan kalp damar hastalıkları açısından da önemli bulunmuşlardır. Bazı araştırmalar mantarla beslenme sonucunda çeşitli metabolik belirteçler düzeyinde kalp damar hastalıkları riskinin azaldığını göstermiştir. Bu metabolik belirteçler LDL, HDL, kolesterol, açlık triaçilgliserol miktarı, homosistein, kan basıncı ve oksidatif hasarlardır (Guillamon vd., 2010).

121 mantar türünün yaralanma durumunda sekonder metabolit değişimi araştırılmıştır. Yara dokuları ve normal dokuların analizleri ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Ayrıca antifungal, antibakteriyel ve nematosisit etkileri denenmiştir. Yaralanma sonucu 55 türde belirgin sekonder metabolit değişimi gözlenmiştir ve bunlardan 26 adedi yüksek seviyede biyolojik aktivite göstermişlerdir (Stadler ve Sterner, 1998).

1.6. Kanser ve Mantarlar (*Ganoderma lucidum*)

Breene (1990), tüm mantarlar arasında birkaç türün ya da ekstraktlarının antitümör aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Bu türler: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Collybia confluens*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *G. Lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pholiota nameko*, *Pleutorus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Tremella fuciformis*, *Tricholoma matsutake* ve *Volvariella volvacea*.

Literatür incelendiğinde göre bugüne kadar kanser ile bağlantılı en etkili olarak bilinen mantar türü *Ganoderma lucidum*'dur.

Bu yenilebilir mantar insanların vücut direncinin korumakta ve uzun ömürlü olmalarına katkıda bulunmaktadır. Bunun dışında; alerji, artrit (eklem iltihabı), bronşit, gastrik ülser, hiperglisemi, hipertansiyon, kronik hepatit, uykusuzluk, nefrit, sinir zayıflığı, inflamasyon ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Misellerinden, gövdelerinden veya sporlarından çeşitli biyolojik aktivitelere sahip farklı bileşikler izole edilmiştir ve bunlardan bazıları çeşitli tıbbi özellikler ile bağdaştırılmıştır (Sliva, 2003).

Ganoderma eski zamanlardan bu yana Çin’de kanser kemoterapisinde kullanılmıştır. *Ganoderma lucidum* aktif transkripsiyon faktörü olan **NF-KB** ve **AP-1**’i inhibe etmektedir. Diğer taraftan meme ve prostat kanserlerinde invaziv hücrelerin tutunmasını ve hareketini baskılamaktadır. Bu da tümör baskılayıcı ve yayılmasını engelleyici özelliğini ortaya koymaktadır. *Ganoderma lucidum*’un antikanser aktivitesi kanser hücresi çalışmaları ile açıkça ortaya çıkarılmıştır. Bu bakımdan meme ve prostat kanserinde gıda takviyesi ve alternatif tedavilerde kullanım potansiyeline sahiptir (Sliva, 2003).

1.7. *Lepista* Çalışma Örnekleri

Lepista nuda’nın biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirlenmiş ve çalışmada kullanılan mantarların beslenme açısından değerli oldukları belirtilmiştir (Barros vd., 2008).

Lepista nuda suşlarına ait kültür filtratları bitki patojeni fungus ve bakterilere karşı çeşitli seviyelerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Chen ve Huang, 2009).

Bo (2012)’nin yapmış olduğu bir çalışmada *Lepista nuda* antibakteriyel aktiviteye sahip biyolojik olarak aktif bileşikler içeren yenilebilir bir mantardır. Bu çalışma kapsamında bu mantarın özütü çeşitli gıda patojenleri üzerinde MIC testi ile denenmiştir. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda patojenlerin gelişmesi önemli düzeyde inhibe olmuştur.

Bir başka çalışmada içlerinde *Lepista nuda*’nın da bulunduğu mantarlardan elde edilen metanol özütleri antioksidan özellikleri bakımından araştırılmışlardır. Standart antioksidan bileşikler BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) ve a-tocopherol ile etkileri karşılaştırılmıştır. Mantar özütlerinin

100 mg/ml konsantrasyonlarının gösterdikleri etki standart bileşiklerin 400 mg/ml'de gösterdikleri etkidenden daha yüksek bulunmuştur (Elmastaş vd., 2007).

Mercan vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *Lepista nuda*'dan elde edilen etanol özütleri antioksidan kapasiteleri ve antimikrobiyal aktiviteleri bakımından araştırılmıştır. *L.nuda* etanol özütünün linoleik asit inhibisyon değeri 160µg/ml konsantrasyonda %84.3 (BHA: %98.9, tokoferol: %99.2) bulunmuştur. Bunun dışında *Micrococcus flavus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir ancak *Candida albicans*'a karşı etkili bulunmamıştır.

Tricholomatales ordo'sundan içlerinde *Lepista* cinsine ait mantarların da bulunduğu 22 adet mantardan metanol özütleri hazırlanmıştır. Bunlar fare kanser hücre hatları (L1210 ve 3LL) üzerinde sitotoksik aktivite bakımından araştırılmıştır. En az bir fare hücre hattının bölünmesini engelleyen 8 adet özüt 4 adet insan kanser hücre hattına karşı (K-562, U251, DU145, MCF7) denenmiştir. 20 mg/ml konsantrasyonlarında en azından bir hücre hattında hücrelerin yaklaşık %50'sini öldürmüşlerdir (IC₅₀). Bunların içerisinde *Lepista inversa*, pozitif kontrol olarak kullanılan *Taxus baccata* kabuk ekstraktının (Taxol) etkisi ile aynı veya daha iyi düzeyde kullanılan 4 hücre hattında da etkili bulunmuştur (Bezivin vd., 2002).

Lee vd. (2005) tarafından *Lepista nuda* mantarına ait özüt insan kanser hücreleri (HepG2, KATO III, AGS) üzerinde denenmiştir. Bu çalışmada çeşitli yollarla elde edilen özüte ait fraksiyonlar kanser hücre hatlarının her üçünün de bölünmelerini inhibe etmiştir. Etki düzeyi 0,5 ve 1 mg/ml aralığında %71,4 ile %91,8 gibi kuvvetli olmuştur.

Avusturalya da içlerinde *Lepista nuda*'nın da bulunduğu 15 adet mantardan elde edilen etanol, soğuk ve sıcak su özütleri sitotoksik aktivite bakımından normal fare fibroblast hücreleri (NIH/3T3), sağlıklı insan böbrek epiteli hücreleri (HEK-293) ve 4 adet kanser hücre hattı (AGS, MDA-MB-231, MCF7, HT-29) üzerinde MTT yöntemi ile denenmiştir. Bu çalışmada *Lepista nuda*'nın bazı özütleri 1 veya 2 kanser hücre hattına karşı iyi düzeyde etkili bulunmuştur (Beattie vd., 2011).

Lepista nuda'dan izole edilen yeni bir Metalloproteaz; hepatoma (HEP-G2) ve lösemi (L1210) kanser hücre hatlarında denenmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 4.99 µM ve 3.67 µM olarak bulunmuştur (Wu vd., 2011).

1.8. *Lepista nuda*'nın Kimyasal İçeriği

Portekiz'de doğal olarak yetişen mantarların kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu mantarların arasında *Lepista nuda* 'da bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre araştırılan mantarlar çok kullanışlı bitki kimyasalları içermektedirler. Bunlar fenolikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenodilerdir (Barros vd., 2008).

Portekiz'de yapılan bir araştırmada doğada yetişen 16 farklı mantar türünün fenolik asit içerikleri araştırılmıştır (Barros vd., 2009).

Yapılan bir çalışmada farklı ortamlardan toplanan *Lepista nuda* mantarlarının ve farklı ortamlarda çoğaltılan misellerinin kimyasal içerik değişimleri ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Makrofunguslardan endüstriyel ölçekli biyolojik olarak aktif bileşiklerin elde edilmesi aşamasında farklı kültür ortamlarındaki kimyasal değişimler önem taşımaktadır. Bu bakımdan yapılmış olan bir çalışma kapsamında farklı kültür ortamlarında çoğaltılan misellerde ve farklı habitatlardan toplanan mantarlarda kimyasal içerik bakımından değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteleri de ortaya konulmuştur (Pinto vd., 2013).

6 adet doğada yetişen mantar türünün uçucu fraksiyonlarındaki sekonder metabolitler araştırılmıştır. Bunların içerisinde *Lepista nuda* da yer almaktadır. Belirlenen 46 adet uçucu bileşik 5 kimyasal kategoride sınıflandırılmıştır: alkoller, aldehitler, ketonlar, seskiterpen benzeri bileşikler ve terpenler (Malheiro vd., 2013).

Tez konusu kapsamında çalışılmış olan ***Lepista nuda***, mantarından elde edilen özütler iki kanser hücre hattı (HL-60, MCF-7) üzerinde denenmiştir. Her iki hücre hattında da bölünmeyi engelleyici aktivite ve apoptozis bulguları elde edilmiştir. Bu nedenle bu mantar türünün biyolojik aktivite gösterecek bileşikler içerebileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın amacı; yenilebilir bir mantar olan *Lepista nuda* isimli mantarın, ticari olarak üretilmekte olan ve kapsül veya çay gibi ürünler şeklinde satışı yapılan *Ganoderma lucidum* mantarına karşı en azından bu çalışma kapsamında kanserler üzerindeki etkinliği ile alternatif olarak ortaya çıkartılmasıdır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Breene (1990), tüm mantarlar arasında birkaç türün ya da ekstraktlarının antitümör aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Bu türler: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Collybia confluens*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *G. Lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pholiota nameko*, *Pleutorus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Tremella fuciformis*, *Tricholoma matsutake* ve *Volvariella volvacea*.

Ganoderma lucidum isimli mantar insanların vücut direncinin korumakta ve uzun ömürlü olmalarına katkıda bulunmaktadır. Bunun dışında; alerji, artrit (eklem iltihabı), bronşit, gastrik ülser, hiperglisemi, hipertansiyon, kronik hepatit, uykusuzluk, nefrit, sinir zayıflığı, inflamasyon ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Misellerinden, gövdelerinden veya sporlarından çeşitli biyolojik aktivitelere sahip farklı bileşikler izole edilmiş ve bunlardan bazıları çeşitli tıbbi özellikler ile bağdaştırılmıştır (Sliva, 2003).

Ganoderma eski zamanlardan bu yana Çin’de kanser kemoterapisinde kullanılmıştır. *Ganoderma lucidum* aktif transkripsiyon faktörü olan **NF-KB** ve **AP-1**’i inhibe etmektedir. Diğer taraftan meme ve prostat kanserlerinde invazif hücrelerin tutunmasını ve hareketini baskılamaktadır. Bu da tümör baskılayıcı ve yayılmasını engelleyici özelliğini ortaya koymaktadır. *Ganoderma lucidum*’un antikanser aktivitesi kanser hücresi çalışmaları ile açıkça ortaya çıkarılmıştır. Bu bakımdan meme ve prostat kanserinde gıda takviyesi ve alternatif tedavilerde kullanım potansiyeline sahiptir (Sliva, 2003).

Lepista nuda’nın biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirlenmiş ve çalışmada kullanılan mantarların beslenme açısından değerli oldukları belirtilmiştir (Barros vd., 2008).

Clitocybe nuda (*Lepista nuda*) suşlarına ait kültür filtratları bitki patojeni fungus ve bakterilere karşı çeşitli seviyelerde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Chen ve Huang, 2009).

Clitocybe nuda antibakteriyel aktiviteye sahip biyolojik olarak aktif bileşikler içeren yenilebilir bir mantardır. Bu çalışma kapsamında bu mantarın özütü çeşitli

gıda patojenleri üzerinde MIC testi ile denenmiştir. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda patojenlerin gelişmesi önemli düzeyde inhibe olmuştur (Bo, 2012).

İçlerinde *Lepista nuda*'nın da bulunduğu mantarlardan elde edilen metanol özütleri antioksidan özellikleri bakımından araştırılmışlardır. Standart antioksidan bileşikler BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) ve α -tocopherol ile etkileri karşılaştırılmıştır. Mantar özütlerinin 100 mg/ml konsantrasyonlarının gösterdikleri etki standart bileşiklerin 400 mg/ml'de gösterdikleri etkiden daha yüksek bulunmuştur (Elmastaş vd., 2007).

Lepista nuda'dan elde edilen etanol özütleri antioksidan kapasiteleri ve antimikrobiyal aktiviteleri bakımından araştırılmıştır. *L.nuda* etanol özütünün linoleik asit inhibisyon değeri 160 μ g/ml konsantrasyonda % 84.3 (BHA: % 98.9, tokoferol: %99.2) bulunmuştur. Bunun dışında *Micrococcus flavus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir ancak *Candida albicans*'a karşı etkili bulunmamıştır (Mercan vd., 2006).

Tricholomatales ordo'sundan içlerinde *Lepista* cinsine ait mantarların da bulunduğu 22 adet mantardan metanol özütleri hazırlanmıştır. Bunlar fare kanser hücre hatları (L1210 ve 3LL) üzerinde sitotoksik aktivite bakımından araştırılmıştır. En az bir fare hücre hattının bölünmesini engelleyen 8 adet özüt 4 adet insan kanser hücre hattına karşı (K-562, U251, DU145, MCF7) denenmiştir. 20 mg/ml konsantrasyonlarında en azından bir hücre hattında hücrelerin yaklaşık %50'sini öldürmüşlerdir (IC₅₀). Bunların içerisinde *Lepista inversa*, pozitif kontrol olarak kullanılan *Taxus baccata* kabuk ekstraktının (Taxol) etkisi ile aynı veya daha iyi düzeyde kullanılan 4 hücre hattında da etkili bulunmuştur (Bezivin vd., 2002).

Lepista nuda mantarına ait özüt insan kanser hücreleri (HepG2, KATO III, AGS) üzerinde denenmiştir. Bu çalışmada çeşitli yollarla elde edilen özüte ait fraksiyonlar kanser hücre hatlarının her üçünün de bölünmelerini inhibe etmiştir.

Etki düzeyi 0,5 ve 1 mg/ml aralığında %71,4 ile %91,8 gibi kuvvetli olmuştur (Lee vd., 2005).

Avusturalya da içlerinde *Lepista nuda*'nın da bulunduğu 15 adet mantardan elde edilen etanol, soğuk ve sıcak su özütleri sitotoksik aktivite bakımından normal fare fibroblast hücreleri (NIH/3T3), sağlıklı insan böbrek epiteli hücreleri (HEK-293) ve 4 adet kanser hücre hattı (AGS, MDA-MB-231, MCF7, HT-29) üzerinde MTT yöntemi ile denenmiştir. Bu çalışmada *Lepista nuda*'nın bazı özütleri 1 veya 2 kanser hücre hattına karşı iyi düzeyde etkili bulunmuştur (Beattie vd., 2011).

Lepista nuda'dan izole edilen yeni bir Metalloproteaz; hepatoma (HEP-G2) ve lösemi (L1210) kanser hücre hatlarında denenmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 4.99 µM ve 3.67 µM olarak bulunmuştur (Wu vd., 2011).

Portekiz'de yabani olarak yetişen mantarların kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu mantarların arasında *Lepista nuda*'da bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre araştırılan mantarlar çok kullanışlı bitki kimyasalları içermektedirler. Bunlar fenolikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidlerdir (Barros vd., 2008).

Portekiz'de yapılan bir araştırmada doğada yetişen 16 farklı mantar türünün fenolik asit içerikleri araştırılmıştır (Barros vd., 2009).

Yapılan bir çalışmada farklı ortamlardan toplanan *Lepista nuda* mantarlarının ve farklı ortamlarda çoğaltılan misellerinin kimyasal içerik değişimleri ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Makrofunguslardan endüstriyel ölçekli biyolojik olarak aktif bileşiklerin elde edilmesi aşamasında farklı kültür ortamlarındaki kimyasal değişimler önem taşımaktadır. Bu bakımdan yapılmış olan bir çalışma kapsamında farklı kültür ortamlarında çoğaltılan misellerde ve farklı habitatlardan toplanan mantarlarda kimyasal içerik bakımından değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteleri de ortaya konulmuştur (Pinto vd., 2013).

6 adet doğada yetişen mantar türünün uçucu fraksiyonlarındaki sekonder metabolitler araştırılmıştır. Bunların içerisinde *Lepista nuda* da yer almaktadır. Belirlenen 46 adet uçucu bileşik 5 kimyasal kategoride sınıflandırılmıştır: alkoller, aldehitler, ketonlar, seskiterpen benzeri bileşikler ve terpenler (Malheiro vd., 2013).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Lepista nuda, Tricholomataceae familyasında yer almaktadır. Yenilebilir bir mantardır. Şapkası, menekşe veya leylak rengine olabilir. Spor baskısı açık pembe renklidir. Halk arasında; Karaman civarında Mor mantar, Bolu bölgesinde ise Mavi cincile olarak adlandırılmaktadır.

3.1. Mantarın Toplanması

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen mantar; 1) Edirne-Keşan, Yerlisu köyü; çam ormanı-açık alan, 2) Edirne-Keşan, Karatepe mevki; çam ormanı arasından Kasım ayında, ayrıca Konya Bozkır Harmanpınar köyü yayla altından, 1300 m rakımdan Mayıs ayında toplanmıştır. Toplanan mantar örnekleri Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan Allı tarafından tayin edilmiştir. Örnekler çeşme suyu ile yıkanarak paketlenmiş ve denemeler yapıncaya kadar -80°C 'de saklanmıştır. Ayrıca herbaryum örnekleri de hazırlanmış, numara verilerek etiketlenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü AYDN kodlu herbaryumunda saklanmaktadır

3.2. Mantarlardan Ekstraktların Elde Edilmesi

3.2.1. Kimyasallar

Ekstraksiyon için Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol kullanılmıştır

3.2.2. Mantarların Ekstraksiyonu ve Çözücülerin Uzaklaştırılması

-80°C 'de dondurulmuş olan materyal liyofilizatör yardımı ile kurutulmuştur. Mantarların liyofilizasyon öncesi yaş ağırlıkları ve liyofilizasyon sonrası kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra soksalet, çalkalayıcı ve evaporatör kullanılarak; Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Ekstraksiyon için kullanılmış olan bu çözücüler polarite özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

3.2.2.1. Petrol Eteri Ekstraktı

Kaynama noktası: 30-40 °C

Dielektrik sabitesi: 2-2.2

Kurutulmuş örneğin ekstraksiyonu soksalet cihazında 10 ml/g olacak şekilde Petrol eteri ile yıkanarak yapılmıştır. Ekstraksiyona örnek haznesindeki eter renksiz oluncaya kadar devam edilmiştir. Örnekleri güneş ışığının etkisinden korumak için, soksalet alüminyum folyo ile kaplanmış. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra eter, evaporatör ile 40 °C'de uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.2. Etil Asetat Ekstraktı

Kaynama noktası: 76,5-77,5 °C

Dielektrik sabitesi: 6

Formül: $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$

Soksalet kartuşunda kalan mantar kalıntısı kurutularak 10 ml/g olacak şekilde etil asetat ile karanlıkta muamele edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi ağzı kapaklı erlenlerde, oda sıcaklığında ve çalkalanarak yapılmıştır. Mantar kalıntısı, ekstreler renksizleşinceye kadar tekrar tekrar etil asetat ile muamele edilmiş ve elde edilen ekstreler, filtre kâğıdından süzülerek birleştirilmiştir. Etil asetat, evaporatörde 75 °C'de buharlaşmaktadır.

3.2.2.3. Diklormetan Ekstraktı

Kaynama noktası: 39.8-40 °C

Dielektrik sabitesi: 9.1

Formül: CH_2Cl_2

Kurutulmuş örneğin ekstraksiyonu; 10 ml/g çözücü olacak şekilde soksalet yardımı ile yapılmıştır ve çözücü evaporatörde 40 °C'de uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.4. Metanol Ekstraktı

Kaynama noktası: 64.7 °C

Dielektrik sabitesi: 32.6

Formül: CH_3OH

Diklormetan ekstraksiyonundan çıkan mantar kalıntısı kurutularak 10 ml/g olacak şekilde metanol ile karanlıkta muamele edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi ağzı kapaklı erlenlerde, oda sıcaklığında ve çalkalanarak yapılmıştır. Mantar kalıntısı ekstreler renksizleşinceye kadar tekrar tekrar metanol ile muamele edilmiş ve elde edilen ekstreler, filtre kâğıdından süzülerek birleştirilmiştir. Metanol, evaporatörde 65 °C’de uzaklaşmaktadır.

Elde edilen ekstraktlar tartımları yapılarak kapaklı tüplerin içerisine alınmış ve aktivite kaybına engel olmak amacıyla -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.3. Elde Edilen Ekstraktların Çözünmesi

Mantar ekstraktları sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere %100 etanol içerisinde çözdürülmüştür. Bu aşamadaki çalışmalar; -80 °C’den çıkarılan ekstraktların aktivitelerinin kaybolmasını engellemek amacıyla buz üzerinde yapılmıştır. Ekstraktların üzerine bir defada 500 µl olmak üzere etanol ilavesi yapılmış ve her ilaveden sonra sonikatör yardımı ile ekstraktlar çözdürülmüştür. Ekstraktları çözmek için kullanılabilecek olan maksimum etanol miktarı HL-60 hücreleri ile bir ön deneme yapılarak belirlenmiştir. Bu ön denemeye ilişkin sonuçlara göre esas denemede kullanılacak alkol konsantrasyonunun maksimum %0,12 - %0,46 değerleri arasında kalması gerektiği belirlenmiştir. Daha yüksek miktarlarda alkol kullanıldığında hücrelerin normal çoğalmaları etkilenmektedir.

Kullanılan çözücü miktarlarına bağlı olarak elde edilen çözünmüş mantar ekstraktlarının yoğunluğu, kuru ağırlık göz önünde bulundurularak g/ml cinsinden stok değer olarak hesaplanmıştır. Yine mantarların etkileri arasında karşılaştırma sağlayabilmek amacıyla kullanılan çözücü miktarlarının eşit olmasına dikkat edilmiş veya stok çözeltiler eşit değerlerde hazırlanmıştır.

Sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere çözünmüş ekstraktlar soğutuculu santrifüjde +4 °C’de, 12.000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Buradan elde edilen süpernatantlar başka bir tüpe aktarılarak geriye kalan pelletler de -80 °C’de saklanmıştır. Sitotoksik değerlendirmede süpernatantlar kullanılmıştır.

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. Hücrelerin ve Kültür Ortamlarının Temini

HL-60 ve MCF-7 hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection; ATCC)'den alınmıştır ve GIBCO (Invitrogen Co.)'nun standart hücre kültürü ortamlarında büyütülmüştür. Kültür ortamına yapılan ilaveler de (Fetal Calf Serum, L-Glutamin, Streptomisin-Pensilin, Non essential aminoasitler) GIBCO'dan alınmıştır. Apoptotik etkiyi belirlemek için Hoechst 33258 ve Propidium Iodide SIGMA (Sigma-Aldrich Co.)'dan alınmıştır.

3.3.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekstrakt Uygulamaları

Dondurulmuş olarak bulunan hücre hatları, denemelerde kullanılmak üzere 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dakikada yavaşça çalkalanarak hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Tüp içeriği 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 3-4 ml ılık ortam ilave edilmiş ve 800 rpm' de oda sıcaklığında 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet yeni ılık kültür ortamında resüspanse edilip hücreler kültür şişelerine aktarılmıştır. Bu hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ve %96 nem içeren atmosferde çoğalmaktadır.

Hücreler ml'de 10.000-100.000 hücre aralığında kültür şişesinde çoğaltılmış ve mantar ekstraktları artan konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat olmak üzere uygulanmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarındaki canlı hücreler MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Sarı renkli MTT canlı hücrelerin mitokondrisinde mor renge dönüşmektedir. Daha sonra renklenmiş olan bu çözeltinin ölçümü spektrofotometre ile 500-600 nm dalga boyu aralığında ölçülebilmektedir. Renk dönüşümü ancak mitokondriyal redüktaz enzimleri aktif olduğunda gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle renk dönüşümü direkt olarak canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilebilmektedir.

MTT boyama solusyonu PBS (5 mg/ml) içerisinde hazırlanmıştır. Oluşan formazan kristallerini çözmek için DMSO kullanılmıştır. Hücrelerle ilgi denemeler well-plate içerisinde yapılmıştır. Denemenin sonunda 100 µl ye 20 µl olmak üzere hazırlanmış MTT boyasından ilave edilmiştir. 3,5-4 saat CO₂'li etüvde inkübasyon sonrası medium uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkamadan direkt 150 µl MTT çözücü

solusyondan ilave edilmiştir. Alüminyum folyo ile sarılıp 15 dk. çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 590 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür.

Bütün mantar özütü denemeleri 3 tekrarlı yapılmıştır. Steril kültür şişeleri ve well plate üzerine numara, uygulama grubu, kullanılan çözücü, hücre hattı tipi ve tarih bilgileri yazılmıştır. Her deneme için iki adet kontrol grubu kullanılmıştır. Bir kontrol grubu sadece ortamı ve kullanılan hücreyi içermektedir. Diğer kontrol grubu ise ilave olarak ekstraktın uygulama esnasında içerisinde çözündüğü çözücünün (Etanol) maksimum konsantrasyonunu içermektedir. Ekstraktın içerisinde çözündüğü çözücünün miktarı göz önünde bulundurularak stok çözeltinin yoğunluğu g/ml olarak hesaplanmıştır. Mantar ekstraktlarının uygulama konsantrasyonları 10 mg/ml, 20 mg/ml ve 40 mg/ml olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonu elde etmek üzere stok çözeltiilerden alınacak miktarlar kullanılacak hücre kültürü ortamının miktarı da (0,5 ml, 1 ml, 5 ml veya 10 ml) göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Bütün bu hesaplamalar Excel çizelgesine aktarılmıştır.

Bütün çalışmalar steril kabin içerisinde yürütülmüştür ve steril tek kullanımlık pipetler kullanılmıştır. Eldivenler ve steril kabin içerisine sokulacak diğer malzemeler %70'lik alkol ile steril edilmiştir.

Kültür şişesi hazırlarken öncelikle kullanılacak olan hücre hattının hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Hazırlanacak olan kültürün miktarı da göz önünde bulundurularak son konsantrasyon ml'de 10.000-100.000 hücre olacak şekilde ayarlanıp bu hesaplamalara göre stok şişeden gerekli miktar alınıp yeni kültür şişesine eklenmiştir. İlgili ekstraktlar ve kontrol grubu kimyasalları bu aşamada eklenmiştir.

3.3.3. Canlı Hücre Sayımı

Her bir uygulama grubunda canlı hücre verileri 72 saatlik sürelerde MTT yöntemi ile elde edilmiştir ve çizelgeye aktarılmıştır. Elde edilen verilerden proliferasyon hesabı şu şekilde yapılmıştır.

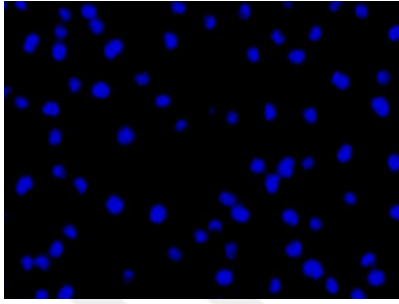
$$(\text{Canlı hücreler})\% =$$

$$(\text{Uygulama yapılmış örneğe ait OD değeri} / \text{Kontrole ait OD değeri}) \times 100$$

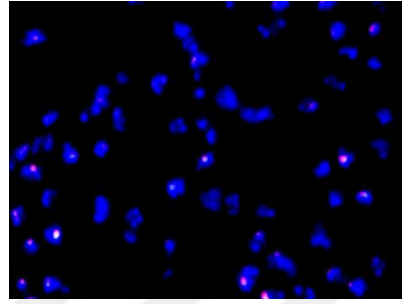
3.4. Apoptozis ve Nekrozis Yöntemi

Apoptotik ve nekrotik etkiyi belirlemek için; hücreler kültür şişelerinde düşük yoğunlukta çoğaltılmıştır ve bölünmeyi engelleyici aktivite verilerine göre etkili bulunan seçilmiş mantar ekstraktlarının etkili konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücreler HO/PI (Hoechst 33258 / Propidium Iodide) yöntemiyle boyanarak apoptotik ve nekrotik etki gösteren ekstraktlar belirlenmiştir (Grusch, vd, 2002, Huettenbrenner, vd.,2003).

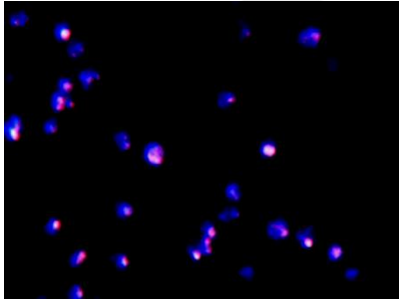
Hoechst 33258 / Propidium Iodide (HO/PI) boyama ile hücre ölümünün tespiti yöntemin avantajı canlı, apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt etmeye olanak sağlamasıdır. Bu amaçla, hücreler 10.000-100.000/ml yoğunluk aralığında şişelere aktarılır. Daha sonra ekstraktlar etkili konsantrasyonlarda 48 sürede hücre kültürü ortamına uygulanır. HO/PI boya karışımı 200 µl/200 µl (1:1) olmak üzere karıştırılır ve üzerine 600 µl steril su ilavesi 1000 µl'ye tamamlanır. Pipetleme ile resüspanse edilir ve boya kullanıncaya kadar karanlıkta saklanır. Ekstrakt uygulaması süresi sonunda hücre kültürü ortamından 50 µl alınır ve üzerine 5 µl HO/PI boyası ilave edilir. Boyanın floresan özelliğini ışıktan kaybetmesi nedeni ile boyama işlemi direkt ışık almayacak şekilde steril kabin içerisinde yapılır. Daha sonra 1 saat 37 °C' de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda inkübe edilir. Süre sonunda bir lam üzerine 30'ar µl örnek alınıp damlatılır ve floresan mikroskop altında UV ışığı ve DAPI filtresi ile incelenip mikroskopik fotoğraflar çekilir. Çekilen fotoğraflardan canlı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler sayılarak oranları belirlenir (Grusch *et al.*, 2002, Huettenbrenner *et al.*,2003). Bu hücre tiplerine ait mikroskopik fotoğraflar Şekilde yer almaktadır. Burada yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler normal hücreleri (a), mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler erken apoptotik hücreleri (b), mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler geç apoptotik hücreleri (c) ve pembe renkli tam boyanmış hücreler de nekrotik hücreleri (d) temsil etmektedir.



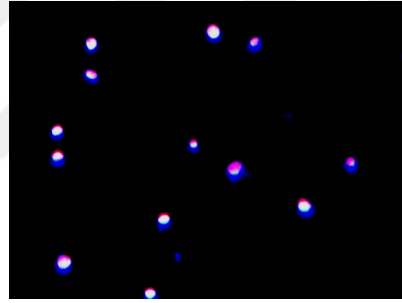
a- normal hücre



b- erken apoptotik



c- geç apoptotik



d- nekrotik hücre

Şekil 3.1. HO/PI Boyama: normal hücre (a), erken apoptotik (b), geç apoptotik (c) ve nekrotik hücre (d) ayrımı [M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

3.5. İstatistiki Değerlendirme

GraphPad 4.0 analiz programı ile kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar hesaplanmıştır. Standart hataları içeren grafikler hazırlanmıştır.

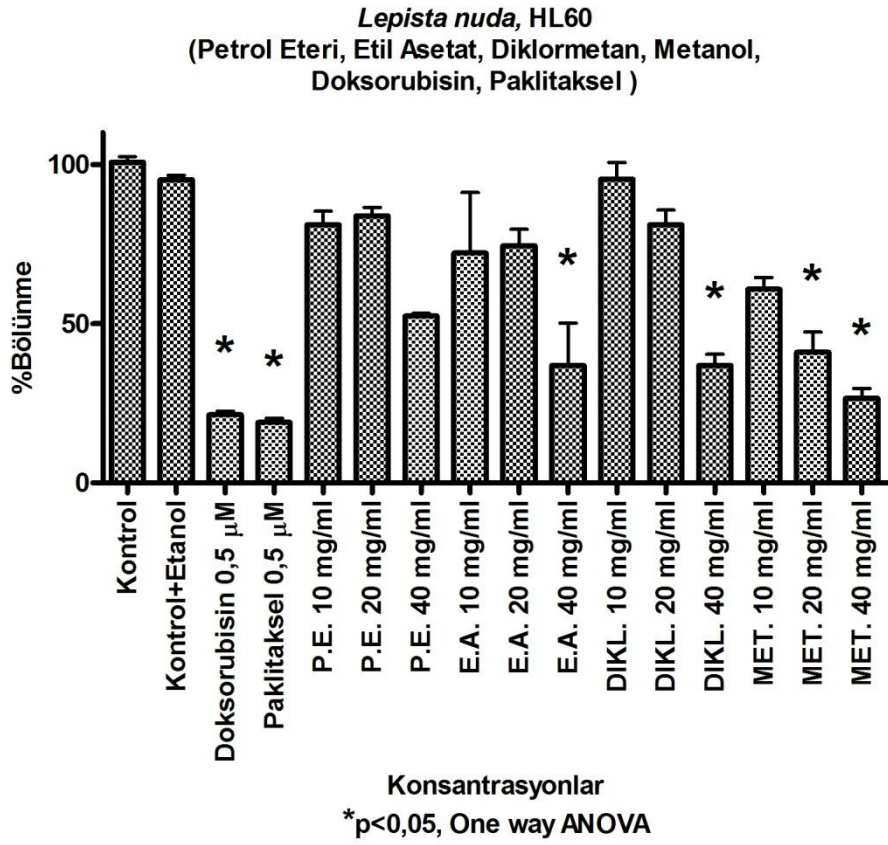
4. BULGULAR

Tez çalışması 3 temel aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar; materyalin toplanması ve ekstraksiyonu, bölünmeyi engelleyici aktivitenin belirlenmesi ve apoptotik etkinin belirlenmesi aşamalarıdır. Bu kapsamda toplanan mantarlardan özütler elde edilmiştir. Devamında, bölünmeyi engelleyici aktiviteler HL-60 insan lösemi hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak belirlenmiş ve en etkili özüt tiplerinin hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonları seçilmiştir. Seçilen özütler ile apoptotik etkiler belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular yukarıda belirtilen sıralamaya göre aşağıda sunulmaktadır.

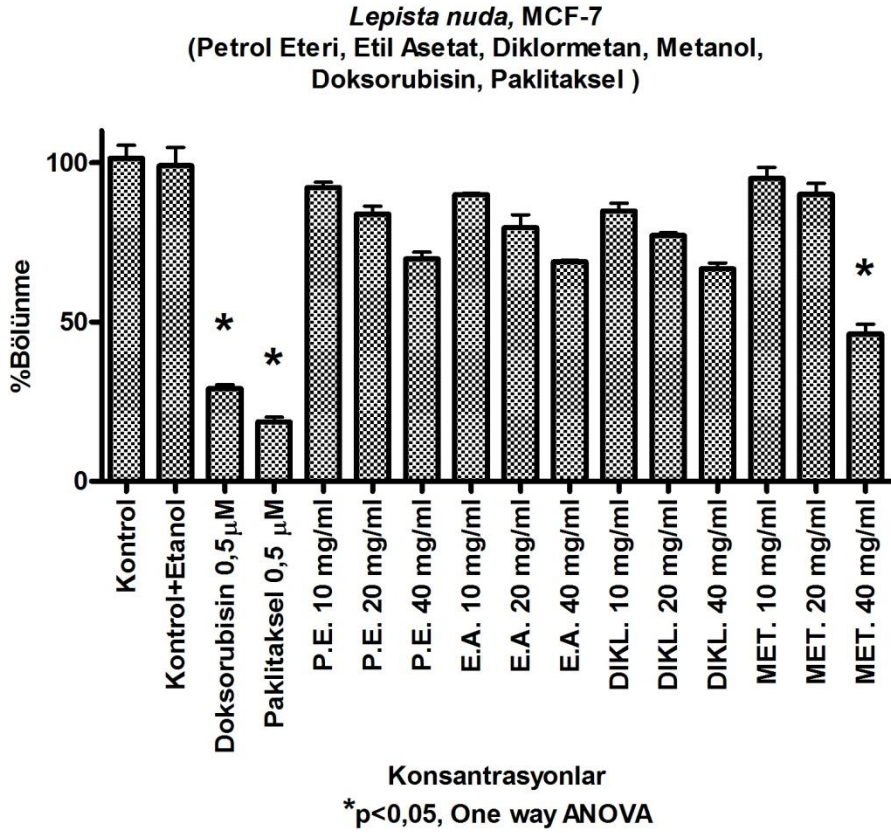
4.1. Bölünmeyi Engelleyici Aktivite Bulguları

HL-60 ve MCF-7 hücreleri yöntemde de belirtildiği gibi ml'de 100.000 ($0,1 \times 10^6$) hücre olacak şekilde kültür şişesinde çoğaltılmıştır ve mantar özütleri artan konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 mg/ml) 72 saat olmak üzere uygulanmıştır. Daha sonra hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (I_pC_{50}) MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Denemeler sonucu elde edilen proliferasyon verileri şekilde grafikler şeklinde sunulmuştur. Bölünmeyi engelleyici aktivitesi ile ilgili bulgular şekillerin altında açıklama olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. *Lepista nuda* HL-60 uygulaması

Lepista nuda mantarına ait özütler artan konsantrasyonlarda HL-60 hücrelerine uygulanmıştır. 10-40 mg/ml aralığında denenmiş olan özütler arasında en etkili olanı metanol özütü olarak bulunmuştur. Metanol özütünün $I_{pC_{50}}$ değeri yaklaşık 15 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



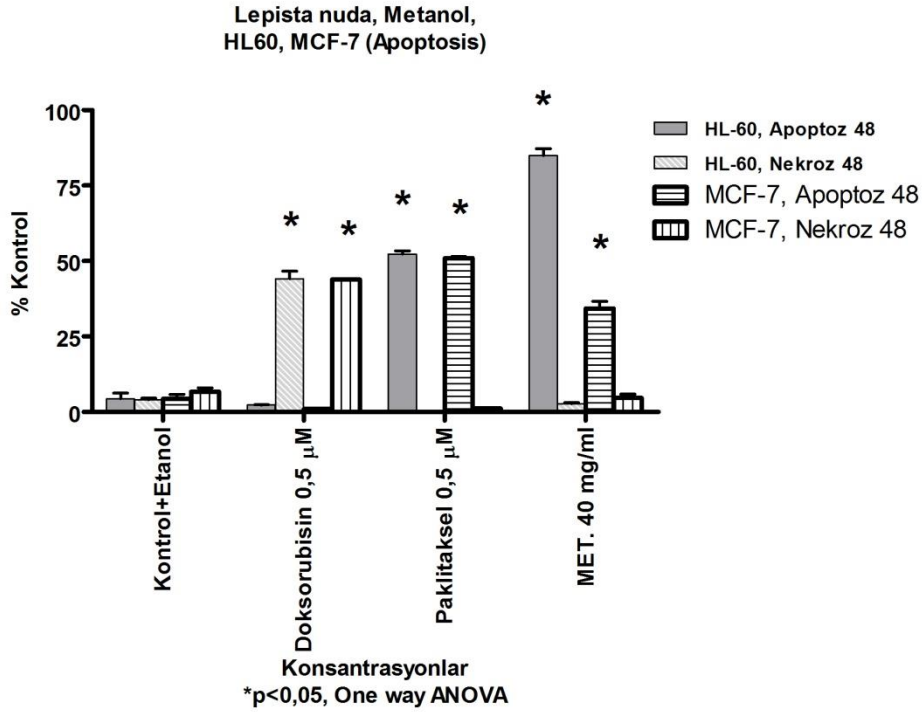
Şekil 4.2. *Lepista nuda* MCF-7 uygulaması

Lepista nuda mantarına ait özütler artan konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. 10-40 mg/ml aralığında denenmiş olan özütler arasında en etkili olanı metanol özütü olarak bulunmuştur. Metanol özütünün $I_{pC_{50}}$ değerinin ~40 mg/ml olduğu görülmektedir.

4.2. Apoptosis Yöntemine İlişkin Bulgular

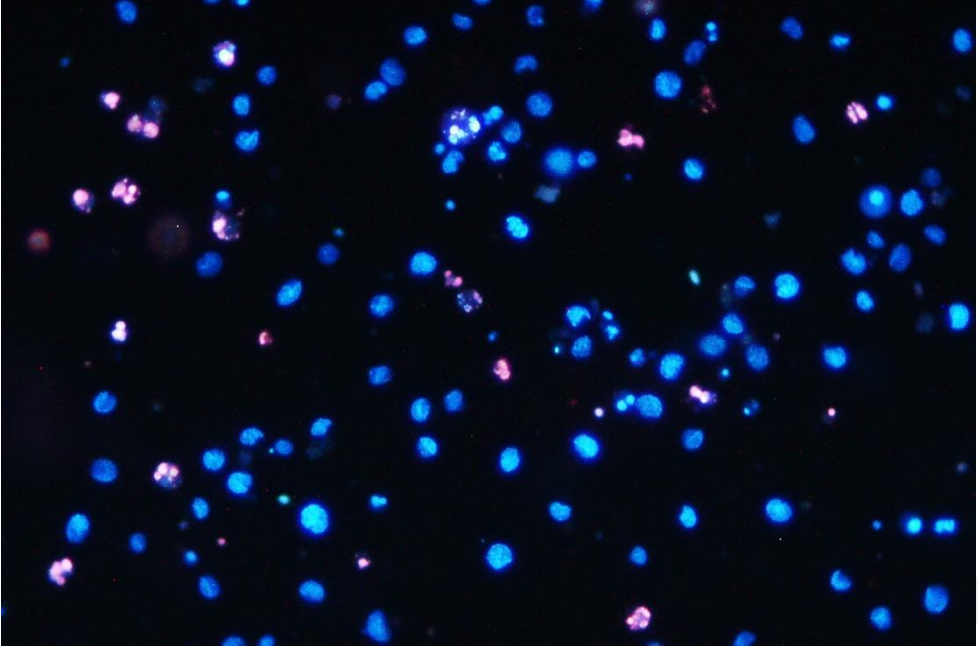
HL-60 ve MCF-7 hücreleri yöntemde de belirtildiği gibi ml'de 100.000 ($0,1 \times 10^6$) hücre olacak şekilde kültür şişesinde çoğaltılmıştır ve mantar özütünün etkili konsantrasyonu (40 mg/ml) 48 saat olmak üzere uygulanmıştır. Daha sonra HO/PI

boyama yöntemi ile apoptos ve nekrosis oranları belirlenmiştir. Yapılan sayımlar ve analizler sonucu elde edilen verileri Şekilde grafikler şeklinde sunulmuştur. Apoptos ile ilgili bulgular Şekillerin altında açıklama olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. *Lepista nuda* HL-60 ve MCF-7 apoptos uygulaması

Lepista nuda mantarına ait özüt etkili konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre nekrosis çok az düzeyde gözlenmiştir. MCF-7 hücre hattındaki uygulamada nekroz oranı daha yüksek çıkmıştır. Buna karşın HL-60 hücre hattında yapılan uygulamada nekroz neredeyse hiç gözlenmemiştir. Her iki hücre hattında da apoptos oranları yüksek seviyede çıkmıştır. HL-60 hücre hattında gözlenen apoptos oranları MCF-7 hücre hattında gözlenenlere göre çok daha yüksek seviyede çıkmıştır.



Şekil 4.4. *Lepista nuda* metanol özütü apoptosis uygulaması

Lepista nuda metanol özütüne ait 40 mg/ml konsantrasyonda yapılan apoptosis uygulamalarından elde edilen apoptosis görüntüsü şekilde yer almaktadır. Bu şekilde mavi ve pembe hücreler ayırt edilmektedir. Mavi hücreler henüz canlılıklarını tam olarak yitirmemişlerdir ve zarlarının seçici geçirgen özelliği devam ettiği için sadece mavi renk ışıma veren Hoechst boyasını içeriye almışlardır. Pembe renk ışıma veren hücrelerde ise artık hücre zarının geçirgenliği bozulmuş ve partikül olarak daha büyük özellikte olan Propidium Iodide boyasını içine almıştır. Yani hücreler canlılıklarını yitirmişlerdir.

Bu şekilde bir diğer belirgin olarak göze çarpan özellik hücrelerin içersinde gözlenen küçük cisimciklerdir. Bunlar apoptotik cisimciklerdir. Hücre programlanmış hücre ölümü mekanizması ile yok edilirken hücre içerisinde paketlenmiş küçük cisimcikler oluşturulmaktadır ve daha sonra bunlar sindirilmektedir. Apoptosisin mikroskobik olarak en belirgin özelliği olan bu cisimcikler ile apoptotik hücreler ayırt edilebilmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser çok basamaklı bir süreçte genetik değişikliklerin biriktirilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda ise normal hücre bölünmesini yöneten homeostasi mekanizması bozulmaktadır. Yani kanser gelişimi için çok sayıda genetik ve epigenetik moleküler olayların oluşması gerekmektedir. Bu bakımdan kanserin bazı bileşikler kullanarak önlenmesi oldukça zor görünmektedir. Bu tip bileşiklerin kanserleşme sürecindeki değişiklikleri durdurması veya geri döndürmesi beklenmektedir. Günümüzde birçok yeni teknik kansere karşı aktif olabilecek yeni bileşiklerin moleküler ve biyokimyasal seviyede taranmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu çaba içerisinde bazı bileşiklerin rastgele araştırılması amaçsız ve boşuna zaman harcamak gibi görünse de bu zamana kadar bu çalışmalar sayesinde çok sayıda yeni anti kanser bileşik bitkilerden ve sucül organizmalardan elde edilmiştir. Bu bakımdan ele alındığında proje kapsamında bir başka canlı grubu olan mantarlardan elde edilen veriler bu amaca katkıda bulunacaktır.

Diğer taraftan hücre döngüsünün ilerlemesinin kontrolü normal hücrelerde önemli bir biyolojik olgudur. Bu kontrol mekanizması transforme olmuş veya neoplastik hücrelerde ya bozulmuştur ya da kural dışı kontrol edilmektedir. Bu bağlamda kontrolsüz büyüme ve bölünmenin çeşitli doğal veya sentetik ajanlarla düzenlenmesi özellikle kanser hücrelerinde kontrolsüz büyüme ve bölünmenin önüne geçilmesi önemli bir hedef olarak araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Tümör oluşumu ve metastazın moleküler temelleri ile ilgili ayrıntılı bilgi birikiminin yanı sıra çeşitli canlı gruplarında doğal olarak bulunan doğal bileşiklerin de bilinmesi kansere yol açan anormal moleküler ve biyokimyasal sinyalleri hedef alacak yeni ilaçların veya etken maddelerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Bu bakımdan proje kapsamında çalışılan canlı grubu mantarlarla ilgili de çalışma ve bilgi birikimi bulunmaktadır. İnsanlar mantarları, mantar özütlerini veya mantarlardan elde edilen çeşitli ürünleri vücut savunma sisteminin ve insan sağlığının desteklenmesi amacıyla gıda takviyesi olarak veya beslenmelerinde kullandıkları görülmüştür. Mantarların antitümör aktivitesinin belirlenmesine yönelik araştırmalar mevcut olmakla birlikte bu çalışmalar mantarlarda bulunma olasılığı yüksek olan biyolojik olarak aktif birçok bileşiğin ortaya çıkarılmasını sağlayacaktır.

Son on yıl boyunca bu tez kapsamında da değerlendirilmiş olan *Lepista* cinsine ait farklı türlerden elde edilen mantar özütlerinin antiproliferatif aktiviteleri gösterilmiştir. Tez kapsamında elde edilen veriler bu çalışmaların ışığında aşağıda ele alınmıştır.

Mantarlar antikanser ve vücut savunma sistemi açısından zengin kaynaklar teşkil etmektedirler. Bu bakımdan mantarlardan elde edilen yeni kimyasallar gelecekte çok daha önemli olacaklardır (Ganeshpurkar vd., 2010). Avusturalya da içlerinde *Lepista nuda*'nın da bulunduğu 15 adet mantardan elde edilen etanol, soğuk ve sıcak su özütleri sitotoksik aktivite bakımından normal fare fibroblast hücreleri (NIH/3T3), sağlıklı insan böbrek epiteli hücreleri (HEK-293) ve 4 adet kanser hücre hattı (AGS, MDA-MB-231, MCF7, HT-29) üzerinde MTT yöntemi ile denenmiştir. Bu çalışmada *Lepista nuda*'nın bazı özütleri 1 veya 2 kanser hücre hattına karşı iyi düzeyde etkili bulunmuştur (Beattie vd., 2011).

Tricholomatales ordo'sundan içlerinde *Lepista* cinsine ait mantarların da bulunduğu 22 adet mantardan metanol özütleri hazırlanmıştır. Bunlar fare kanser hücre hatları (L1210 ve 3LL) üzerinde sitotoksik aktivite bakımından araştırılmıştır. En az bir fare hücre hattının bölünmesini engelleyen 8 adet özüt 4 adet insan kanser hücre hattına karşı (K-562, U251, DU145, MCF7) denenmiştir. 20 mg/ml konsantrasyonlarında en azından bir hücre hattında hücrelerin yaklaşık %50'sini öldürmüşlerdir (IC₅₀). Bunların içerisinde *Lepista inversa*, pozitif kontrol olarak kullanılan *Taxus baccata* kabuk ekstraktının (Taxol) etkisi ile aynı veya daha iyi düzeyde kullanılan 4 hücre hattında da etkili bulunmuştur (Bezivin vd., 2002). Bu çalışmada *Lepista* cinsine ait bir başka türden elde edilen metanol özütü kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında da etkili olan özüt tipi metanol olarak bulunmuştur ve Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir. Buradaki hücre hatları da örtüşmektedir. MCF7 ortak olarak kullanılmışken K-562 tez çalışmasında kullanılan HL-60 gibi bir başka lösemi hücre hattıdır. Tez çalışmasında hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüren konsantrasyon HL-60 için 15 mg/ml ve MCF-7 için 40 mg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.1. ve 4.2.). Diğer taraftan bu çalışmada kanser hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan taxol pozitif kontrol olarak tercih edilmiş ve *Lepista inversa* metanol özütünün daha etkili olduğu bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında ise yine benzer şekilde metanol özütü doksorubisin ve paklitakselden daha etkili bulunmuştur.

Bir başka çalışmada *Lepista nuda* mantarına ait özüt insan kanser hücreleri (HepG2, KATO III, AGS) üzerinde denenmiştir. Bu çalışmada çeşitli yollarla elde edilen özüte ait fraksiyonlar kanser hücre hatlarının her üçünün de bölünmelerini inhibe etmiştir. Etki düzeyi 0,5 ve 1 mg/ml aralığında %71,4 ile %91,8 gibi kuvvetli olmuştur (Lee vd., 2005). Tez çalışması kapsamında denenen konsantrasyonlar ile karşılaştırıldığında çok daha düşük konsantrasyonlarda etkili olmuş gibi görünse de bu çalışmada fraksiyonlama yapıldığı için etken bileşik veya bileşikler yoğunlaştırılmıştır ve etkili konsantrasyon aralığı düşürülmüştür. Bu da hem tez verileri hem de çalışmadan elde edilen bulguların *Lepista nuda* türünde aktif bileşiklerin bulunduğu yönünde bir işaretidir. Bir diğer çalışmada aktif bir etken madde izole edilmiştir ve etkin konsantrasyonun daha da düştüğü gözlenmiştir. *Lepista nuda*'dan izole edilen yeni bir Metalloproteaz; hepatoma (HEP-G2) ve lösemi (L1210) kanser hücre hatlarında denenmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 4.99 µM ve 3.67 µM olarak bulunmuştur (Wu vd., 2011).

Yapılan bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere *Lepista* türleri hücre döngüsünü baskılayabilecek bazı bileşikler içermektedirler ve bu bileşiklerden bazıları da bilinen kemoterapik ajanlar ile yarışabilecek potansiyel antikanser aktiviteye sahiptirler. Etkilerini ise hücre döngüsünün durdurarak ortaya koymaktadırlar. Kontrolsüz veya durdurulamayan hücre döngüsünün kanser ile mücadele direkt hedef olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu mantarların önemli aktif bileşikler içerdikleri görülmektedir.

Apoptozis, çok hücreli bir organizmada embriyonik dönemden yaşlanmaya kadar devam eden süreçte birçok evrede yer alan önemli bir hücre ölüm yolağıdır. Embriyonik dönemde çeşitli yapıların oluşmasında veya DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle enfekte hücrelerin ölümünde temel rol oynar (Vaux ve Korsmeyer, 1999). Diğer bir önemli ölüm tipi olan nekroziste metabolik prosesler çok hızlıdır ve hasar ağırdır; hücre zarının geçirgenliği bozulur, hücre şişer ve zarın patlamasıyla hücre içindeki maddeler dışarı dağılır. Bunun aksine apoptoziste hücre zarının bütünlüğü bozulmaz (Kerr vd., 1980). Apoptotik bir uyarı geldiğinde, hücre çevresinden ayrılarak küçülür, çekirdek içinde kromatin yoğunlaşır ve hücre zarla sarı küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar fagositozla yok edilir.

Apoptozis yolakları iki şekilde aktif hale gelir. Birincisi ölüm reseptörleri vasıtası ile (dışarıdan, ekstrinsik) ve ikincisi mitokondri (dahili yapı, intrinsik) aracılığıyla. Ölüm reseptörlerinin doğal ligandları (CD95L, TRAIL ve TNF- α gibi) ya da agonistik antikorlar (anti-APO-1 gibi) ile çapraz bağlanması, apoptozisi yönlendiren hedef proteinleri kesen kaspaz-8 ve -3 aktivasyonunu indükler (Krammer vd., 2007, Johnstone vd., 2008). ROS, DNA hasarı, Ca^{+2} gibi dahili (içsel) ölüm sinyalleri doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondriyal yolağı aktive eder ve sitokrom c salınarak, Apaf-1 ve kaspaz-9'dan oluşan apoptozom kompleksi oluşur (Orrenius vd., 2003, Roderick ve Cook, 2008, Trachootham vd., 2009). Apoptozomda aktive edilen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktif hale dönüştürür (Riedl ve Salvesen, 2007). Reseptör ve proapoptotik protein Bid'in kaspaz-8 tarafından kesilmesi ile proapoptotik proteinler Bax veya Bid'in ya da her ikisinin birden mitokondri membranında translokasyonu indüklenir (Pecorino, 2005). Mitokondri yolağında apoptozis çoğunlukla Bax, Bak ve Smac gibi proapoptotik yada Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve XIAP gibi antiapoptotik proteinler tarafından kontrol edilir (Galluzzi vd., 2006; Wu vd., 2007).

Apoptozis; malignant veya kanser hücrelerini normal hücrelerden veya onları çevreleyen dokudan zarar vermeden uzaklaştırır. Apoptozisin çalışmasında aksaklık birçok kanser tipinde yaygındır ve tedaviye karşı dirençlidir. Bu nedenle apoptozis yolakları kanser tedavisi için başlıca hedeflerdendir (Reed, 2003).

2006 yılında yapılan bir çalışmada *Lepista inversa* türünden fraksiyonlama çalışmaları ile cliticine izole edilmiştir. Bu madde insan kanser hücre hatlarında (DU145, K-562, MCF7 ve U251) denenmiş ve 185-578 nM konsantrasyon aralığında etkili bulunmuştur. Diğer taraftan farelerde L-1210 tümörüne karşı denenmiştir ve etkinliği ortaya konmuştur. Flow sitometrik analizler sonucunda klitosinin antitümör aktivitesinin apoptosisi uyarmak ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Fortin vd., 2006). Tez çalışması kapsamında kullanılan *Lepista nuda*'nın apoptotik etkinliği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte *Lepista inversa*'da bulunan klitosin etken maddesinin bu etkinliği tez verilerine referans niteliğindedir.

Lepista sordida türünden potansiyel antitümör etkiye sahip bir polisakkarit (LSPc1) elde edilmiştir. Bu maddenin antikanser etkinliği ve etki mekanizması larinks kanseri (Hep-2) hücre hattı üzerinde çalışılmıştır. LSPc1 maddesi 48 saat

içinde hücrelerin G2/M fazında birikmesine yol açarak hücre döngüsünü inhibe etmiştir. Diğer taraftan morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptotik etkiler gözlenmiştir. Apoptotik etkinin mekanizması araştırılmış ve mitokondriyal yolak üzerinden apoptosisin gerçekleştiği belirlenmiştir. Pro-apoptotik Bax oranı anti-apoptotik Bcl-2 karşısında artış göstermiştir ve mitokondri membranından sitokrom-c salınmasına yol açmıştır. Devamında kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktive olarak apoptotik hücre ölüm süreci başlamıştır. Sonuç olarak bu maddenin potansiyel olarak larinks kanserinin tedavisinde kullanılabileceği önerilmiştir (Miao vd., 2013). Tez çalışması kapsamında özellikle HL-60 hücre hattında 48 saatlik uygulama sonucu %75'in üzerinde apoptotik hücrelerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.3.). Kullanılan pozitif kontrollerden doksorubisin hücre ölümüne nekroz aracılığıyla sebep olurken paklitaksel apoptosise yol açmaktadır. HL-60 metanol özütü paklitaksel ile kıyaslandığında çok daha etkili bulunmuştur.

Literatür verileri ile tez çalışmasından elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *Lepista* cinsi mantarlarda anti-kanser özellik gösteren bileşiklerin varlığı aşikârdır. Bunun yanı sıra hücre hatları üzerindeki etkinlikleri de benzerlik göstermektedir. İlgili etken maddeler öncelikle hücre döngüsünü durdururken devamında apoptotik yolağın uyarılmasına yol açmaktadırlar. Morfolojik ve biyokimyasal sonuçlar bunu desteklemektedir. Bu konuda çok fazla çalışma olmamakla birlikte tez kapsamında da elde edilen veriler ışığında *Lepista nuda* mantarında bulunan ve biyolojik aktiviteden sorumlu bileşik veya bileşiklerin birlikte apoptotik hücre ölümünü uyaran etkiye sahip oldukları önerilebilir. Bu etkinlik kanser tedavi yaklaşımlarında hedef alınan moleküler mekanizmalar açısından çok önem arz etmektedir. Günümüz koşullarında halen daha kanserin tedavisi tam olarak yapılamazken ve kemoterapide kullanılan ilaçların yarısından fazlasının bitkisel kökenli olduğu da göz önünde bulundurulduğunda bu tip potansiyele sahip biyolojik kaynakların daha ayrıntılı çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir. Bu tezden elde edilen veriler daha ayrıntılı çalışmalara başlangıç teşkil edecek önemli bulgulardır. Tez kapsamında biyolojik materyal olarak kullanılan *Lepista nuda* isimli mantar kimyasal içerik bakımından çalışılmalı, izolasyon çalışmaları ile etken maddeler elde edilmeli ve saf madde çalışmaları ile etki mekanizmaları aydınlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alexopoulos, C.J., Mimms, C.W., Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. **John Wiley and Sons**, New York, Pp:7-23.
- Alves, M. J., Ferreira, Isabel C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/7827>
- Barros, L., Bruna, A., Venturini, P. B., Leticia, M. E., Isabel, C. F. R. Ferreira. 2008. Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A Comprehensive Study. **J. Agric. Food Chem.**, 56: 3856–3862.
- Barros, L., Montserrat, D., Isabel, C.F.R. Ferreira, Paula, B., Celestino, S.B. 2009. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, 47: 1076–1079.
- Beattie, K.D., Ulrich, R., Grice, I.D., Uddin, S.J., Blake, T.B., Wood, K.A., Steele J., Iu F., May T.W., Tiralongo E. 2011. Ethanolic and aqueous extracts derived from Australian fungi inhibit cancer cell growth in vitro. **Mycologia**, 103(3):458-65.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbial Biotechnology**, 56: 326-338.
- Bézivin, C., Françoise, L, Pierre, S, Maryvonne, A., Joël B. 2002. Cytotoxic Activity of Tricholomatales determined with Murine and Human Cancer Cell Lines. **Pharmaceutical Biology**, 40:03,196–199.
- Bo L. 2012. Antibacterial activities of Clitocybe nuda extract on foodborne pathogens. **A thesis submitted to the Graduate Faculty of Auburn University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science**, Auburn, Alabama.

- Boer, C.G., Obici, L., De Souza, C.G.M., Peralta, R.M. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, 94:107-112.
- Boztok, K. 1990. Mantar Üretimi Tekniği. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, 489-168, İzmir.
- Breene W.1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. **Journal of Food Production**, 53: 883-894.
- Chang, S.T. 1993. Mushroom Biology. **Chinese University Press**, Hong Kong, 95- 108.
- Chen J.T., Huang J.W. 2009. Control of plant diseases with secondary metabolite of *Clitocybe nuda*. **N. Biotechnol**, 26(3-4);193-8.
- Elmastaş, M., Isıldak, O., Türkekul, I., Temur, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20:337–345.
- Ferreira, Isabel C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in Wild Mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, 16(12):1543-1560.
- Fortin H., Tomasi S., Delcros J.G., Bansard J.Y., Boustie J. 2006. In Vivo Antitumor Activity of Clitocine, an Exocyclic Amino Nucleoside Isolated from *Lepista inversa*. **ChemMedChem**, 1 (2): 189-196.
- Galluzzi, L., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. **Oncogene**, 25: 4812–4830.
- Ganeshpurkar, A., Rai, G., Jain, A. P. 2010. Medicinal Mushrooms: Towards a New Horizon. **Pharmacogn Rev.**, 4(8): 127–135.
- Grusch, M., Polgar, D., Gfatter, S., Leuhuber, K., Huettenbrenner, S., Leisser, C., Fuhrmann, G., Kassie, F., Steinkellner, H., Smid, K., Peters, G.J., Jayaram, H.N., Klepal, W., Szekeres, T., Knasmüller, S., Krupitza, G. 2002. Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. **Cell Death and Differentiation**, 9:169-78.

- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Villares, A., Martínez, J.A. 2010. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, 81:715–723.
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, 39(11):1415-1419.
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., Krupitza, G. 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. **Mutation Research**, 543(3):235-49.
- Jennings, D.H., Lysek, G. 1999. Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle. **Bios Scientific Publishers Limited**, Oxford:5-30.
- Johnstone, A.J., Frew, M.J., Smyth, M.J. 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset progression and therapy. **Nat. Rev. Cancer**, 8: 782–798.
- Kalac, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, 113:9–16.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol.**, 68:251-306.
- Kolcuoğlu, Y. 2005. Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepiota mastoidea*'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu. **Yüksek Lisans Tezi**, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Krammer, P.H., Arnold, R., Lavrik, I. 2007. Life and death in peripheral T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, 7: 532–542.
- Laessoe, T., Lincoff, G. 2002. Mushrooms. **Dorling Kindersley Limited**, London: Pp:9-13.
- Lee, Y.S., Han, J.Y., Joo, E.Y., Shin, S.R., Kim, N.W. 2005. Study on the Anti-tumor Effects of Extracts from *Lepista nuda* Mushroom. **Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition**, 34(3):317-322.

- Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Soares, S., César da Silva Ferreira, A., Baptista, P. 2013. Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. **Food Research International**, 54:186–194.
- Matilla, P., Salo-vaananen, P., Könkö, K., Aro, H., Jalava, T. 2002. Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland. **J. S. Agric. Food Chem.**, 50:6419-6422.
- Mercan, N., Duru, M.E., Türkoğlu, A., Gezer, K., Kıvrak, I., Türkoğlu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract from *Lepista nuda* (Bull.) Cooke. **Annals of Microbiology**, 56(4):339-344.
- Miao S., Mao X., Pei R., Miao S., Xiang C., Lv Y., Yang X., Sun J., Jia S., Liu Y. 2013. Antitumor activity of polysaccharides from *Lepista sordida* against laryngocarcinoma in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, 60:235-240.
- Mier, N., Canete, S., Kläbe, A., Chavant, L., Fournier, D. 1996. Insecticidal Properties of Mushroom and Toadstool Carpophores. **Phytochemistry**, 41(5):1293-1299.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 4:552–565.
- Pecorino, L. 2005. Molecular Biology of Cancer: Mechanism, Targets and Therapeutics. **First edition, Oxford University Press.**
- Pelaez, F., Martinez, M.J., Martinez, A.T. 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Resource**, 99:37-42.
- Pinto, S., Barros, L., Sousa, M.J., Ferreira, I.C.F.R. 2013. Chemical characterization and antioxidant properties of *Lepista nuda* fruiting bodies and mycelia obtained by in vitro culture: Effects of collection habitat and culture media. **Food Research International**, 51:496–502.

- Reed, J.J. 2003. Holland-Frei Cancer Medicine; Ch 4, Edited by Donald W Kufe, Raphael E Pollock, Ralph R Weichselbaum, MD, Robert C Bast, Jr, Ted S Gansler, James F Holland and Emil Frei, III, 6th ed., BC Decker Inc ISBN: 1-55009-213-8.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 8(5):405–413.
- Roderick, H.L., Cook S.J. 2008. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. **Nat. Rev. Cancer**. 8(5):361–375.
- Saha, T., Ghosh, D., Mukherjee, S., Bose, S., Mukherjee, M. 2008. Cellobiose dehydrogenase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clypeatus*. **Process Biochemistry**, 43(6):634-641.
- Seeger, R., Stijve, T. 1980. Occurrence of Toxic Amanita Species, In : Faulstich H., Kommerell B, Wieland Th. (eds) Amanita Toxins and Poisoning, New York.
- Silva, C.M., Melo, I.S., Oliveira, P.R. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. **Enzyme Microbial Technology**, 37:324-329.
- Sliva, D. 2003. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Cancer Treatment. **Integrative Cancer Therapies**, 2(4):358-364.
- Smith, J.E., Rowan, N.J., Sullivan, R. 2002. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current usage with special emphasis on cancer treatments. Cancer research UK.
- Smith, J.F., Wood, D.A., Thurston, C.F. 1995. Growth measurement of *Agaricus* mycelium in composted substrates as an indicator of compost selectivity and mushroom productivity. **Mushroom Science**, 14:293-301.
- Sonnenberg, A.S.M. 2000. Genetics and breeding of *Agaricus bisporus*. **Proceedings of the 15th International congress on the science and cultivation of edible fungi**. Maastricht, Netherlands, pp: 25-39.

- Stadler, M., Sterner, O. 1998. Production of Bioactive Secondary Metabolites in the Fruit Bodies of Macrofungi as a Response to Injury. **Phytochemistry**, 38(3):0902-0908.
- Stop, J.M.H., Moolbroek, H. 1999. Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Appl. Microbiology Biotechnology**, 52:474-483.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev. Drug Disc.**, 8; 579–591.
- Uysal, Y. 2006. Tıbbi Mantar *Ganoderma lucidum*'un antikolesterolemik etkisinin araştırılması.
- Üstün, O. 2011. Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri. **Türk Hij Den Biyol Derg**, 68(4): 223-240.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J. 1999. Cell death in development. **Cell**, 96: 245-254.
- Watling, R. 2003. Fungi. **Smithsonian Boks, Cromwell Road**, London, Pp:9-19.
- Wood, D.A, Goodenough, P.W. 1977. Fruiting of *Agaricus bisporus*, changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. **Arch. Microbiol.**, 114:161-165.
- Wu, H., Tschopp, J., Lin S.C. 2007. Smac mimetics and TNFalpha: a dangerous liaison? **Cell**, 131, 655–658.
- Wu, Y.Y., Wang, H.X. Ng, T.B. 2011. A Novel Metalloprotease from the Wild Basidiomycete Mushroom *Lepista nuda*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 21(3):256–262.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esin Hafize DEĞİRMENCİ

Doğum Yeri Ve Tarihi : Biga/ÇANAKKALE, 13.04.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : ADÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji

Yüksek Lisans Öğrenimi : ADÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Makale

İ.Babahan, A.Özmen, N.Orhan, D.Kazar ve **E.H.Değirmenci**. “Synthesis, characterization and *in vitro* anti-neoplastic activity of novel *vic*-dioximes bearing thiosemicarbazone side groups and their homotrimeric complexes” **Bioorganic Chemistry**, Volume 53, April 2014, Pages 92–98

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : esindgrmnc17@gmail.com

Tarih :20/01/2016