

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakognozi Anabilim Dalı**

**TRICHOLOMA ANATOLICUM H. H. DOĞAN & İNTİNİ
MANTARI ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR**

**Hazırlayan
Çağlayan KOCAKAYA**

**Danışman
Prof. Dr. Müberra KOŞAR**

Doktora Tezi

**Mart 2017
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOĞNOZİ ANABİLİM DALI

TRICHOLOMA ANATOLICUM H. H. DOĞAN & INTINI
MANTARI ÜZERİNDE FARMAKOĞNOZİK
ARAŞTIRMALAR

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Ecz. Çağlayan KOÇAKAYA

Danışman
Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDK-2013-4167 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mart 2017
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Çağlayan KOCAKAYA

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“*Tricholoma Anatolicum* H. H. Doğan & Intini Mantarı Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi doktora tez önerisi ve tez yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ecz. Çağlayan KOCAKAYA

Danışman

Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Prof. Dr. Müberra KOŞAR danışmanlığında **Çağlayan KOCAKAYA** tarafından hazırlanan “*Tricholoma Anatolicum* **H. H. Doğan & Intini Mantarı Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakognozi** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../2017

Danışman : Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ
Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. M. Betül YERER AYCAN
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulu'nun.....tarih vesayılı kararı onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Hem ders dönemi hem de tez aşamasında, zaman ve mekan farkı gözetmeden her türlü konuda bilgisiyle beni eğiten, yönlendiren ve bu güne gelmem için fedakarca emek gösteren bilge hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a,

Lisansüstü eğitime adım atmama vesile olan, ders dönemim boyunca bilgi ve emeğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. M. Betül YERER AYCAN' a, örneğimizi teşhis ederek çalışmamıza önemli katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Gökhan HALICI'ya, doktora sürecinde birlikte yapılan ortak çalışmalarda, sonraki süreçte birçok konuda yardımını gördüğüm sevgili arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK'a, proje çalışmamızın kromatografi deneyleri ile ilgili kısmında bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Perihan GÜRBÜZ'e, hücre kültürü çalışmalarında ilgi ve emeğiyle yolumu aydınlatan değerli arkadaşım Yrd. Doç Dr. Eren DEMİRPOLAT'a, istatistiksel analiz çalışmalarının işleyişi konusunda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Aytaç AKÇAY'a, MALDI Kütle Spektrometri çalışmalarını beraber yürüttüğüm İzmir Ege Üni. ARGEFAR ekibine, özellikle Prof. Dr. Ercüment KARASULU ve Dr. Engin BAYRAM'a, karbonhidrat analizlerini birlikte gerçekleştirmiş olduğum Erciyes Üni. TAUM personeli Mehmet ÇADIR'a, laboratuvar çalışmalarında bana destek olan değerli arkadaşlarımlarım Öğr. Gör. Leyla FATULLAYEV ve Arş. Gör. Selen İLGÜN'e, ayrıca antioksidan etkinlik deneylerinde standartlara ait çalışmalarda yardımlarını aldığım sevgili arkadaşlarım Ecz. Gökçen KILIÇ, Ecz. Başak Öktem'e, çalışmamda gece gündüz demeden yanımda olan, ciddi yardımları olan sevgili dostum Kasım BÜYÜKBEZİRCİ'ye, tüm eczacılık fakültesi personeline ve tez süresince işimden ayrıldığı süreçte yokluğumu aratmayan değerli mesai arkadaşlarıma, Bugünlere gelmemde emeği herkesten çok olan değerli annem İkbal KOCAKAYA'ya, babam Durdu KOCAKAYA'ya, desteğiyle her daim beni şevklendiren kardeşim Münevver TAŞKIN'a, sadece bu çalışma için değil hayatımda her alanda ve anlamda yanımda olan, başarımın arkasında bulunan eşim Yaprak KOCAKAYA'ya ve bitanecik oğlum Yusuf Alp KOCAKAYA'ya en kalbi teşekkürlerimle bu çalışmayı atfediyorum...

Çağlayan KOCAKAYA,

Mart 2017, KAYSERİ

**TRICHOLOMA ANATOLICUM H. H. DOĞAN & INTINI MANTARI
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Çağlayan KOCAKAYA

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı
Doktora tezi, Mart 2017
Danışman: Prof. Dr. Müberra Koşar**

ÖZET

Tez çalışması kapsamında *T. anaticum* H.H. Doğan & Intini mantarından farklı yöntemlerle iki polisakkaritçe zengin ekstre, bir etanol ekstresi elde edilmiştir. Elde edilen ekstrere üzerinde; kompozisyon analiz çalışmaları, *in vitro* antioksidan etkinlik tayinleri, kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* antikanser etkinlik çalışmaları yapılmıştır. Polisakkaritçe zengin ekstrerelerden biri ayrıca fraksiyonlandırılmıştır. Elde edilen fraksiyonların sitotoksik etkinliği ölçülmüş ve antikanser etkinliği güçlü bulunan fraksiyonun yapısı; monosakkarit analizi ve spektrometrik çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Ekstrelerin kompozisyonları (toplam fenol, toplam flavonoid, toplam flavonol, toplam şeker, toplam protein) spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirleyebilmek için demir indirgeme güçleri, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etkileri, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS•+) radikalini süpürücü etkileri, spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını engelleyici etkileri ve askorbat-Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunu engelleyici etkileri ölçülmüştür. Tüm ekstrere antioksidan etki gücü açısından zayıf etkili bulunmuştur. Ekstrelerin sitotoksik etkinliği ölçülmüş ve sonuçlara göre ekstrere, MCF-7 (İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi) A-549 (İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücresi), COLO-205 (İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi) hücre hatlarının hiçbirinde, çalışılan hiçbir konsantrasyonda (100, 500, 1000 µg/mL) canlılığı %50'nin altına indiremedikleri, dolayısıyla zayıf sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca denenen iki ekstrenin (polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, etanol ekstresi) HEP-G2 (İnsan Hepatoselüler Karsinoma Epitelyal Hücresi) hücre hattında proliferasyona yol açtıkları

görülmüştür. Zayıf bulunan sitotoksik etkinliği artırmak için polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi iki farklı yöntemle fraksiyonlanmış ve dört fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonların sitotoksik etkinliği ölçülmüş ve Ters Faz RP-18 kolon kromatografisiyle elde edilen fraksiyonlardan diğerine göre apolar olanın etkisinin elde edilen tüm fraksiyonlara göre yüksek olduğu görülmüştür. Etkin fraksiyon, A-549 hücre hattı için 1000 µg/mL'de canlılığı yaklaşık % 88, COLO-205 hücre hattı için 500 µg/mL'de canlılığı yaklaşık % 90 ve MCF-7 hücre hattı için 500 µg/mL'de canlılığı yaklaşık % 88 inhibe ederek güçlü sitotoksik etki göstermiştir. Etkin bulunan fraksiyonun yapısal analizinde; monosakkarit içeriği olarak %99'dan fazla glukoz monomerlerinden oluştuğu ve MALDI-QIT-TOF spektrumlarının karşılaştırılan glukoz standartı ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Türkiye'de yetişen ve ilk tespiti yine ülkemizde yapılan *T. anaticum* mantarının polisakkaritçe zengin ekstraktlarının *in vitro* antikanser etkinliğinin belirlenmesi adına yapılmış ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: *Tricholoma anaticum*, antikanser, polisakkarit, hücre kültürü

**PHARMACOGNOSIC RESEARCHES ON
TRICHOLOMA ANATOLICUM H. H. DOGAN & INTINI MUSHROOM**

Çağlayan KOCAKAYA

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Ph. D. Thesis, March 2017
Supervisor: Prof. Dr. Müberra Koşar**

ABSTRACT

Within the scope of this thesis, two polysaccharide rich extracts obtained by two different methods, and one ethanol extract were obtained from the *T. anatolicum* H. H. Dogan & Intini fungus. On the extracts; composition analysis studies, *in vitro* antioxidant activity assays, *in vitro* anticancer activity studies on cancer cell lines, were carried out. Additionally one of the polysaccharide rich extract was fractionated. The structure of the fraction, which have the most potent anticancer effect on cancer cell lines, was tried to be elucidated by monosaccharide analysis and spectrometric studies.

The compositions of the extracts (total phenol, total, flavonoid, total flavonol, total sugar, total protein) were calculated by spectrophotometric methods. In order to determine the antioxidant activities of the extracts; the iron reducing powers, the scavenging effects of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) radical, the scavenging effects of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzathiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺•) radical, Inhibitory effect of 2-deoxyribose degradation formed by non-specific hydroxyl radical and inhibitory effects of ascorbate-Fe (III) -catalyzed phospholipid peroxidation were measured. All extracts were found to be weakly effective in terms of antioxidant potency. The cytotoxic effects of the extracts were measured. The extracts have weak cytotoxic effects because they can not lower the viability below 50% at any of the working concentrations on MCF-7 (Human Breast Adenocarcinoma Epithelial Cell), A-549 (Human Lung Carcinoma Epithelial Cell), COLO-205 (Human Colorectal Adenocarcinoma Epithelial Cell) cell lines. In addition, two extracts (polysaccharide-rich hot water extract, ethanol extract) led to cell proliferation in HEP-G2 (Human Hepatocellular Carcinoma Epithelial Cell) cell line. To enhance the poor cytotoxic activity, the hot water polysaccharide rich extract was fractionated by two different

methods and four fractions were obtained. The cytotoxic activity of the fractions was measured. The effect of more apolar fraction obtained by reverse phase RP-18 column chromatography was found to be higher than all four fractions. Effective fraction inhibited approximately 88% viability at 1000 µg/mL concentration for the A-549 cell line, approximately 90% viability at 500 µg/mL concentration for the COLO-205 cell line and approximately 88% viability at 500 µg / mL concentration for the MCF-7 cell line. Thus showed stronger anticancer activity compare extracts and other fractions. Structural analysis of this active fraction found that the fraction contained more than 99% glucose monomers as monosaccharide content and that the MALDI-QIT-TOF spectrum was similar to the spectra of the glucan standard. This is the known first study, to determine the *in vitro* anticancer activity of polysaccharide rich extracts of *T. anatolicum* fungus, which is grown in our country and the first detection was also performed in our country.

Key words: *Tricholoma anatolicum*, anticancer, polysaccharide, cell culture

İÇİNDEKİLER

TRICHOLOMA ANATOLICUM H. H. DOĞAN & İNTİNİ MANTARI ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR.....	xiv
TABLolar LİSTESİ.....	xx
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mantarlar	4
2.1.1. Mantar Tanımı	4
2.1.2. Ektomikorizal Yaşam Döngüsü	5
2.1.3. Makromantarların Tıbbi Kullanımı	6
2.2. Botanik Özellikler	7
2.2.1. Tricholomataceae Familyasının Genel Özellikleri	7
2.2.2. Cins Tayin Anahtarı.....	8
2.3. <i>Tricholoma</i> Türlerinin Genel Özellikleri	9
2.4. Dünyada ve Ülkemizde Bulunan <i>Tricholoma</i> Türleri	9

2.5. <i>Tricholoma anatolicum</i> H. H. Dogan & Intini Türü	10
2.5.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un Genel Özellikleri	10
2.5.2. Sistematığı	11
2.5.3. Morfolojik Özellikleri	12
2.5.4. <i>T. anatolicum</i> 'un Habitatı ve Ülkemizde Yayılışı	12
2.6. <i>Tricholoma</i> Türleri Üzerinde Kimyasal Çalışmalar	14
2.7. <i>Tricholoma</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları	20
2.7.1. Antihipertansif Etki	20
2.7.2. Antimikrobiyal Etki	21
2.7.3. Antikanser, İmmünstimülan ve İmmünmodülatör Etkiler	22
2.7.4. Antioksidan Etki	24
2.7.5. Hepatoprotektif Etki	25
2.7.6. Hipoglisemik Etki	25
2.7.7. Toksisite	25
2.7.8. Yaşlanma Karşıtı Etki	25
2.8. <i>Tricholoma anatolicum</i> Üzerinde Kimyasal Çalışmalar ve Biyoaktivite Çalışmaları	26
2.8.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> Üzerinde Kimyasal Çalışmalar	26
2.8.2. <i>Tricholoma anatolicum</i> Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları	29
2.9. Kanser	30
2.9.1. Kanser Tanımı	30
2.9.2. Kanser Nedenleri	31
2.9.3. Normal Hücre Döngüsü	31
2.9.4. Karsinogenez	32
2.9.5. Anjiyojenez ve Metastaz	33
2.9.6. İmmün Denetim, Kanser Hücrelerinin Yok Edilmesi, Apoptozis	34
2.9.7. Dünyadaki ve Ülkemizdeki Kanser Vakaları	36

2.9.8. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	37
2.10. Mantarlardan İzole Edilen Antikanser ve İmmunmodülatör Etkili Maddeler ve Polisakkaritler	38
2.11. Fungal (Mantar Kökenli) Polisakkaritler	39
2.11.1. Fungal Polisakkaritler ve Genel Tanımı	39
2.11.2. Fungal Polisakkaritlerin Antikanser Etki Mekanizması.....	40
2.11.3. Klinikte Kullanılan Fungal Polisakkaritler	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler	44
3.1.1. Deney Materyali.....	44
3.1.2. Kimyasal Maddeler	45
3.1.3. Kullanılan Aletler	45
3.2. Deneysel Çalışma.....	46
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	46
3.2.2. Kompozisyon Analizleri.....	48
3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	50
3.2.4. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su (PS) Ekstresi Üzerinde Fraksiyonlama Çalışmaları	53
3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	58
3.2.6. Etkin Fraksiyon (RP-138) Kompozisyon Analizleri	63
3.3. İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	68
4.1. Ekstrelerin Hazırlanışı, Spektrofotometrik Bileşim Analizleri	68
4.1.1. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	68
4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit, Flavonol, Şeker, Protein Tayini	68
4.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	70
4.2.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi	70

4.2.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayin Edilmesi	71
4.2.3. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS+•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini.....	71
4.2.4. Askorbat-Fe(III) Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu.....	72
4.2.5. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozunması.....	73
4.3. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) Üzerinde Fraksiyonlama Çalışmaları	73
4.3.1. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) ile Glukan Standartının Karşılaştırılması:	74
4.3.2. Tüplere Ait YBSK Kromatogramları, Tüplerin Birleştirilmesi ile Fraksiyonların Tespiti.....	75
4.4. Sitotoksikite Çalışmaları.....	79
4.4.1. Ham Ekstrelerin (PS, PSU, EE) Sitotoksik Etkinliği.....	79
4.4.2. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) Fraksiyonlarının (RP-25, RP-138, JEL-6, JEL-44) Sitotoksik Etkinliği.....	81
4.4.3. Glukan Standartının Sitotoksik Etkinliği	84
4.5. Etkin Fraksiyon (RP-138) Kompozisyon Analizleri.....	85
4.5.1. RP-138 Fraksiyonu Üzerinde Monosakkarit Kompozisyonu Analizi.....	85
4.5.2. RP-138 Fraksiyonunun MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometrisi Kullanılarak Glukan Standartı ile Karşılaştırılması	89
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	97
6.KAYNAKLAR.....	105
ÖZGEÇMİŞ.....	118

KISALTMALAR

(13)-C-NMR	: Karbon-13 İzotopu Nükleer Manyetik Rezonans
°C	: Santigrad Derece
2D-NMR	: İki Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans
A-549	: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücresi
AA	: Askorbik asit
AB	: Avrupa Birliği
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Ag	: Gümüş
AKK	: Açık Kolon Kromatografisi
Al	: Alüminyum
ALA	: α -linoleik asit
As	: Arsenik
AscAE	: Askorbik Asite Eşdeğer
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BCG	: Bacillus Calmette Guèrin (Verem Aşısı)
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
BsAE	: Bovin Serum Albümine Eşdeğer
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
Caco-2	: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Hücresi
CAE	: Kateşine Eşdeğer
CAT	: Katalaz
CD	: Farklılaşma Kümesine Göre İsimlendirilen Hücre Yüzey Molekülleri
Cd	: Kadmiyum
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CE	: Kateşine eşdeğer
CHCA	: α -siyano-4-hidroksi-sinamik asit
Cl	: Klor

Co	: Kobalt
CO₂	: Karbondioksit
COLO-205	: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi
Cr	: Krom
CR3	: Kompleman Reseptör-3
Cu	: Bakır
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
CuSO₄	: Bakır sülfat
D	: Dekstrojir (sağa çeviren)
Da	: Dalton
DEAE	: Dietilaminoetil
DEAE-52	: Dietilaminoetil Selüloz Kolon Dolgu Maddesi (Ticari)
DEAE-53	: Dietilaminoetil Selüloz Kolon Dolgu Maddesi (Ticari)
DGLA	: Di-homo-gamma-linoleik asit
DHA	: Dokosa-hekzaenoik asit
DHB	: 2,5-dihidroksibenzoik asit
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil-sülfoksit
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
dw	: Kuru ağırlık
EDTA	: Etilendiamin-tetraasetik asit
EE	: <i>T. anatolicum</i> Etanol Ekstresi
EPA	: Eikosapentaenoik asit
ERK	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
Fe	: Demir
FeCl₃	: Demir (III) klorür
g	: Gram
GA	: Gallik Asit
GAE	: Gallik Asite Eşdeğer
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

Gr(-)	: Gram Boya Sırasında Kristal Viyole Boyasını Tutmayan Bakterileri Belirtir Kısaltma
Gr(+)	: Gram Boya Sırasında Mavi-Siyah, Mor Renk Alan Bakterileri Belirtir Kısaltma
H	: Hidrojen
h	: Hacim
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
HeLa	: Serviks Kanseri Hücresi
HELFL	: İnsan Embriyogenik Akciğer Fibroblast Hücresi
HEPG-2	: İnsan Hepatoselüler Karsinoma Epitelial Hücresi
HIV-1	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü Tip-1
HL-60	: İnsan Promiyelositik Lösemi Hücresi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HT-29	: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelial Hücresi
IC₅₀	: Yüzde Elli İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IR	: Kızılötesi
JEL-44	: Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 44. Tüp Referansı ile Belirlenen Fraksiyon
JEL-6	: Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 6. Tüp Referansı ile Belirlenen Fraksiyon
K	: Potasyum
kcal	: Kilokalori
kDA	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum hidrojen fosfat
kJ	: Kilojul
KS₂O₄	: Potasyumpersülfat
L	: Levojiir (sola çeviren)
L	: Litre

LA	: Linoleik Asit
LAK	: Lenfokinle Uyarılmış Öldürücü Hücre
M	: Molar
MALDI-QIT-TOF	: Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Kuadripol İyon Tuzaklı- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi
MDA	: Malondialdehit
MeOH	: Metanol
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mmHg	: Milimetre Civa
MMP	: Matriks-Metalloproteinaz
Mn	: Mangan
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MS	: Kütle Spektrometrisi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit
N	: Azot
Na₂CO₃	: Sodyum Karbonat
NaNO₂	: Sodyum Nitrat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-B Transkripsiyon Faktörü
Ni	: Nikel
NK	: Doğal Öldürücüler
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
O	: Oksijen
OBSK	: Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
Ort	: Ortalama
P	: Fosfor

Pb	: Kurşun
PBS	: Fosfat Tamponu
pH	: Çözeltinin Asitlik Veya Bazikliğini Gösterir Parametre (Power Of Hydrogen)
PS	: <i>T. anaticum</i> 'dan Sıcak Su Ekstraksiyonuyla Elde Edilen Polisakkaritçe Zengin Ekstre
PSU	: <i>T. anaticum</i> 'dan Ultrasonik Etkiyle Elde Edilen Polisakkaritçe Zengin Su Ekstresi
RA	: Rosmarinik asit
RAW. 264.7	: Abelson Fare Lösemi Virüsü Transforme Edilmiş Makrofaj Hücre Hattı
RE	: Rutine Eşdeğer
RID	: Refraktif İndeks Dedektör
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RP-138	: Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi ile Elde Edilen 138. Tüp Referansıyl Belirlenen Fraksiyon
RP-25	: Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi ile Elde Edilen 25. Tüp Referansıyl Belirlenen Fraksiyon
rpm	: Bir Dakika İçerisinde Gerçekleştirilen Dönüş
RPMI-1640	: Hücre Kültürü İçin Besi Yeri (Ticari)
Se	: Selenyum
SFK	: Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi
SGOT	: Serum Glutamik Oksaloasetik asit Transaminaz
SGPT	: Serum Glutamik Pirüvik Transaminaz
SMMC-7721	: İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücresi
SOD	: Süperoksit Dismütaz
SS	: Standart Sapma
SW-80	: İnsan Rabdomiyosarkoma Hücresi
TBA	: Tiyobarbitürik asit
t-BHP	: Tert-bütillhidroksiperoksit
TCA	: Trikloroasetik asit
TE	: Troloks Ekvilant

TEAC	: Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite
TFA	: Trifloro asetikasit
TILL	: Tümörü İnfiltrate Eden Lenfosit
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XTT	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-Sülfofenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilit
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
Zn	: Çinko
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	<i>T. terreum</i> ve <i>T. virgatum</i> türlerinin selenyum, kadmiyum, demir, manganez ve çinko düzeyleri	16
Tablo 2.2.	<i>T. equestre</i> için ağır metal bileşimi.....	16
Tablo 2.3.	<i>T. matsutake</i> toplam bileşenler ve mineral içeriği.....	17
Tablo 2.4.	<i>T. matsutake</i> ve yumurta aminoasitleriyle karşılaştırması.....	18
Tablo 2.5.	<i>T. caligatum</i> 'a ait diklorometan, metanol ve su ekstralarının antioksidan gücü ve toplam fenolik madde miktarları	24
Tablo 2.6.	<i>T. anatolicum</i> misel, genç şapka ve olgun şapkalarının nem, kül, protein, ham yağ, toplam karbonhidrat miktarları ve enerji seviyeleri	27
Tablo 2.7.	<i>T. anatolicum</i> misel, genç şapka ve olgun şapkalarının mineral kompozisyonu	27
Tablo 2.8.	<i>T. anatolicum</i> 'a ait yağ asiti kompozisyonu ve <i>T. anatolicum</i> ' a ait yağ asitlerinin yüzde dağılımı	28
Tablo 2.9.	<i>T. anatolicum</i> mineral ve ağır metal bileşimi	29
Tablo 2.10.	Mantarlardan elde edilen antikanser etkili bileşiklere ait ana gruplar	39
Tablo 4.1.	Ekstre verimleri	68
Tablo 4.2.	Toplam Fenol, Toplam Flavonoid, Toplam Flavonol Miktarları.....	69
Tablo 4.3.	Toplam Şeker ve Toplam Protein Miktarları	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>T. anaticum</i> 'a ait fotoğraflar.	11
Şekil 2.2.	Arazide sedir mantarının (<i>T. anaticum</i>) yetkin karpoforu (sap ile şapkadan oluşan kısım) ve toprak yüzeyinden yaklaşık 10-30 cm derinlikte oluşturduğu misel yapısı.....	13
Şekil 2.3.	<i>T. anaticum</i> 'un Türkiye'deki Dağılımı.....	13
Şekil 2.4.	<i>Tricholoma</i> türlerinden izole edilen 3 yeni diterpen.....	14
Şekil 2.5.	1-) Orirubenon-D, 2-) Orirubenon-E, 3-) Orirubenon-F, 4-) Orirubenon-G, 5-) Orirubenon-A, 6-) Orirubenon-B, 7-) Orirubenon-C	15
Şekil 2.6.	Normal Hücrede Bölünme Evreleri.....	32
Şekil 2.7.	Karsinojenez ve Metastaz.....	34
Şekil 2.8.	β -(1→3)-D-glukan, glikozidik bağ ile bağlı.....	40
Şekil 3.1.	Deney materyali olan <i>T. anaticum</i> mantarının fruktifikasyon yapıları.....	44
Şekil 3.2.	Ters Faz RP-18 kolon kromatografisinde kullanılan Buchi C660 fraksiyon ayırıcı ve toplayıcı.....	56
Şekil 3.3.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan aletler.....	58
Şekil 3.4.	MTT'nin canlı hücrelerde mitokondriyal redüksiyonla formazona dönüşümü	61
Şekil 3.5.	Ölçüme hazır bir plak	62
Şekil 3.6.	MALDI plağı ve MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometresi.....	65
Şekil 3.7.	MALDI plağında lazer bombardımanı ile iyonize olan örneğin sistemde ilerleyişi.....	66
Şekil 4.1.	<i>T. anaticum</i> ekstraktları ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri	70
Şekil 4.2.	<i>T. anaticum</i> ekstraktları ve standartların ABTS ⁺ radikalini süpürücü etkileri.....	72
Şekil 4.3.	Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstraktına (PS) ait YBSK kromatogramı.	74
Şekil 4.4.	Glukan standartına ait YBSK kromatogramı.....	74
Şekil 4.5.	Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 6. tüpe ait YBSK kromatogramı..	75
Şekil 4.6.	Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 44. tüpe ait YBSK kromatogramı.	76
Şekil 4.7.	Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi 25. tüpe ait YBSK kromatogramı. .	77

Şekil 4.8.	Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi 138. tüpe ait YBSK kromatogramı.	78
Şekil 4.9.	Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresinin (PS) 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	79
Şekil 4.10	Ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresinin (PSU), 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	80
Şekil 4.11.	Etanol ekstresinin (EE) 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	80
Şekil 4.12.	RP-25 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	81
Şekil 4.13.	RP-138 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	82
Şekil 4.14.	JEL-6 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	82
Şekil 4.15.	JEL-44 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	83
Şekil 4.16.	Glukan standartının 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi.....	84
Şekil 4.17.	Glukoz standartına ait YBSK kromatogramı.....	85
Şekil 4.18.	Fruktoz standartına ait YBSK kromatogramı.	86
Şekil 4.19.	Galaktoz standartına ait YBSK kromatogramı.	86
Şekil 4.20.	Mannoz standartına ait YBSK kromatogramı.	86
Şekil 4.21.	Arabinoz standartına ait YBSK kromatogramı.....	87
Şekil 4.22.	Ksiloz standartına ait YBSK kromatogramı.	87
Şekil 4.23.	Ramnoz standartına ait YBSK kromatogramı.	87
Şekil 4.24.	TFA ile hidroliz edilen RP-138 fraksiyonuna ait YBSK kromatogramı.....	88
Şekil 4.25.	HCl ile hidroliz edilen RP-138 fraksiyonuna ait YBSK kromatogramı.	88
Şekil 4.26.	<i>S. cerevisiae</i> (bira mayası)'dan elde edilen (1-3)-(1-6)- β -glukan.....	89
Şekil 4.27.	RP-138 numunesine ait MS ¹ spektrumu ve parçalanmaları.	90
Şekil 4.28.	Glukan standartına ait MS ¹ spektrumu ve parçalanmaları.	90

Şekil 4.29. RP-138 numunesi ve gluklan standartına MS ¹ spektrumu ve parçalanmaları	91
Şekil 4.30. RP-138 numunesi ve gluklan standartına ait MS ¹ spektrumunun (Şekil 4.29) büyütülmüş hali	92
Şekil 4.31. 1024 m/z iyon pikine sahip bileşiğe ait MS ² spektrumu ve parçalanmaları.	93
Şekil 4.32. RP-138 numunesi ve gluklan standartına uygulanan MS ² spektrumunun (Şekil 4.31) büyütülmüş hali	93
Şekil 4.33. 845 iyon pikine sahip bileşiğe ait MS ² spektrumu ve parçalanmaları.....	94
Şekil 4.34. 889 m/z iyon pikine sahip bileşiğe ait (Şekil 4.31) ait MS ² spektrumu ve parçalanmaları.	95
Şekil 4.35. β -1-3 gluklan türevlerinin pozitif mod MS Fragmentasyonu	96

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar heterotrof, klorofil bulundurmeyen ve ökaryotik canlılardır (1). Mantarların önceleri bitki oldukları düşünülmüş ancak sonrasında yapılan araştırmalar neticesinde ayrı bir alem olduğu tespit edilmiştir (2). Mantarlar alemi kendi içerisinde 4 farklı gruba ayrılmaktadır (3). Çalışmamızda incelenen kısım ise hifleri bölmeli, ileri yapılı olan makromantarlardır (4). Bundan sonra mantar kavramı, yüksek yapılı makromantarları temsil edecektir.

Mantarlar yüzyıllardır besleyici ve lezzetli oldukları için tüketilmektedir (5). Besinsel değerleri içerdikleri yüksek oranda karbonhidrat ve protein, eser elementler, aminoasitler vb. maddeler nedeniyle oldukça yüksektir (6). Besleyiciliklerinin yüksek olması yanı sıra sağlığa olan faydaları ile de öne çıkmaktadırlar. Japonya ve Çin'de bu mantarların tıbbi kullanımı ile ilgili geniş bilgi birikimi dolayısıyla mantarlara karşı yoğun ilgi vardır. Antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, kolesterol düşürücü, immün-stimülan vb. etkiler gösteren birçok mantar türü vardır. Özellikle kansere karşı etkilerini içerdikleri polisakkarit ve polisakkarit-peptit kompleksleri üzerinden gösterdikleri bilinmektedir. Polisakkarit yapıda antikanser etkili birçok bileşik izole edilmiştir (7). Bunlardan bir kısmının klinik kullanımı bulunmaktadır (8).

Kanser dünya genelinde yüksek boyutlarda ölüme yol açan zorlu bir hastalıktır (9). Hastalıktan korunma ve bu hastalıkla mücadele için alternatif bir yol olarak mantarların kansere karşı etkileri araştırılmakta ve mantar türlerinden kanser ilacı elde edilmeye çalışılmaktadır (7).

Çalışmamıza konu olan *Tricholoma anatolicum* H. H. Doğan & Intini mantarı ülkemizde Akdeniz ve Ege bölgelerinin ormanlık bölgelerinde Sedir ağaçları (*Cedrus libani*) altında doğal olarak yetişmektedir. Sedir ağaçları ile ortak bir yaşam kurmaktadır (10). Mantar yetiştiği bölgelerde bulunan halk tarafından bilinçli veya bilinçsiz bir şekilde toplanmaktadır. Toplanan bu mantarlar iç piyasada tüketilmekte veya dış

ülkelere özellikle Japonya'ya ihraç edilmektedir. Teşhisi ilk olarak ülkemizde yapılan bu mantar ekonomik açıdan değerlidir. Japon'ların Matsutake olarak sınıflandırdıkları değerli bir mantar ailesine mensup olan mantarın bu sebeple Japonlardan talep gördüğü düşünülmektedir (11).

Yapılan literatür çalışmasıyla türe ait birkaç kimyasal kompozisyon ve biyoaktivite çalışması haricinde çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Matsutake ailesindeki diğer mantar türlerinin ve *Tricholoma* türüne ait bazı mantarların antikanser etkiler gösterdiği çeşitli çalışmaların bulunması sebebiyle; bu mantar ailesine mensup ve ülkemize ait olan türün, çalışmamızda antikanser etkinliği geniş bir çerçevede ele alınmıştır. Yapılan çalışmayla hem ileride ilaç olabilecek vasıfta maddeler araştırılmış, hem de literatürün bu bağlamdaki eksikliğine katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalar ile mantar örneklerinden, antikanser etkiden sorumlu olduğunu düşündüğümüz polisakkaritçe zengin ekstraler iki farklı yolla elde edilmiş ve saflaştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca mantardan etanol ekstresi de elde edilmiştir. Ekstreler üzerinde toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol, toplam şeker, toplam protein miktarı tayin edilerek kompozisyon analizi yapılmıştır. Ayrıca bu ekstrele ait antioksidan aktiviteler de incelenmiştir. Hazırlanan ekstrelerde *in vitro* aktivite testleri olan; indirgeme gücünün belirlenmesi (Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirgeme), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS⁺•) radikalini süpürücü etki tayini, askorbat-Fe (III)-katalizli fosfolipit peroksidasyonunun inhibisyonu tayini ve spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2-deoksiriboz bozulmasını önleyici etki tayini deneyleri yapılmış sonuçları ölçülerek değerlendirilmiştir.

Elde edilen ilk ham ekstrelerin (iki polisakkaritçe zengin ekstre, bir etanol ekstresi), A-549 (insan akciğer karsinoma epitelyal hücresi), MCF-7 (insan meme adenokarsinoma epitelyal hücresi), COLO-205 (insan kolorektal adenokarsinoma epitelyal hücresi) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkinlikleri, MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit) testi ile ölçülmüştür. Akabinde sitotoksik etkinliği artırmak amacıyla elde edilen polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi (SFK) ve Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi yöntemleri ile fraksiyonlandırılmıştır. Sonuç olarak; Jel Filtrasyon Sephadex LH-20 Kolon

Kromatografisinden JEL-6, JEL44 fraksiyonları, Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisinden RP-25 ve RP-138 fraksiyonları elde edilmiştir.

Bu dört fraksiyona ait sitotoksik etki yine 3 farklı kanser hücre hattı (A-549, MCF-7, COLO-205) üzerinde MTT testi ile ölçülmüştür.

En yüksek sitotoksik etkinliğin gözleendiği fraksiyon olan RP-138'in monosakkarit kompozisyonu belirlenmiştir. Diğer adımda ise etkin fraksiyon RP-138 ve gluklan standartı (Sigma), MALDI-QIT-TOF kütle spektrometrisi ile karşılaştırılarak içerik benzerlikleri spektrumlarla gösterilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarlar

2.1.1. Mantar Tanımı

Mantarlar uzunca bir süre hem bitki hem de hayvan benzeri özellikler gösterdikleri için taksonomik olarak sınıflandırılmamışlardır. Bilimsel araştırmalar sonunda fizyolojik, anatomik ve morfolojik yapılarının bitkilerden ve hayvanlardan oldukça farklı oldukları, ayrı bir alem oldukları fark edilmiştir. Mantarlara ait ilk sistematik çalışmasını 1836 yılında Fries yapmıştır ve hala bu sistem kullanılmaktadır (2).

Mantarlar, çok hücreli ökaryot canlılardır. Mantar hücreleri dallanmış iplikçikler halinde bulunur ve bu yapılara “hif” veya “misel” adı verilir. Hifler birleşerek “miselyum” yapısını oluşturur. Hücre çeperinin ana bileşeni ise kitindir. Kitin ise azot taşıyan bir polisakkaritten oluşur (2). Yenilebilen mantarların kaba olarak 100 gramında 88-90 gram su, 3.8 gram protein, 0.3 gram yağ, 4.9 gram karbonhidrat ve 1.2 gram kül bulunmaktadır (12). Mantar içeriğinde bulunan karbonhidratların önemli kısmı polisakkaritlerdir. Polisakkaritler mantarlarda heksoz, pentoz veya uronik asit polimerleri halinde bulunur (2).

Klorofil bulundurmayan, heterotrof canlılardır. Bir kısmı predatör olsa da mantarlar çoğunlukla saprofit (çürükçül) veya parazitiktirler. Saprofit olanlar sindirim enzimlerini hücre dışına salarlar, hücre dışında sindirilen besinleri “riyozit” veya “haustorium” denilen kök tüylerine benzeyen yapıları sayesinde absorbe edebilirler. Parazitik olanları ise hücre dışı sindirim yapabilir veya ihtiyacı olan besinleri etkileşimde olduğu canlıdan doğrudan absorblayabilirler (2).

Bazı mantarlar insanlarda dahil olmak üzere hayvanlar için parazitiktir ve patojendir. Örneğin insanlarda görülen atlet ayağı hastalığı etkeni *Epidermophyton floccosum* (Harz)

Langeron & Miloch, patojen bir mantardır. Bazıları ise bitkiler için parazittir. Bitkilerde görülen rastık hastalığı buna örnektir (2).

Algler ve bitkilerle kurdukları mutual birliktelikler bulunur. Bunun en güzel örneği mantarların özellikle yüksek yapılı bitki kökleriyle kurdukları mikorizal birlikteliktir. Mantarlar hem eşeyli hem de eşeysiz üreyebilirler. Eşeyli veya eşeysiz üreyen sporlar uygun bir sübstrat buldukları zaman yapışkan bir müsilaj salarak yapıya tutunurlar ve hifler ve ardından miseller oluşur. Mantarlar alemi kendi içerisinde 4 bölüme ayrılır; Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota (3).

Son iki bölüm olan Ascomycota ve Basidiomycota hifleri bölmeli olan mantarları temsil eder. Diğerlerine göre daha büyük ve ileri yapılı organizmalardır ve gerçek mantarlar olarak da anılırlar (4).

Ascomycota bölümü mantarlarda sporlar askus yapısı içerisinde bulunur. Askus tulum veya torbaya benzer bir yapıdır. Basidiomycota bölümünde ise sporlar bazidyum denilen şişkin hif uçlarında ve açıkta oluşur (4). Bu yapılar mantarların teşhisinde önemlidir.

Makrofungusların yenilebilen, yenilemeyen, tıbbi özelliğe sahip veya zehirli olan birçok türü vardır.

2.1.2. Ektomikorizal Yaşam Döngüsü

Mikoriza, Yunanca kökenli mykes (mantar) ve rhiza (kök) kelimelerinden oluşan ve “kök mantarı” manasına gelen bir terimdir. İlk kez orman patolojisti A.B. Frank tarafından mantar ve ağaç ilişkisi için kullanılan bir kavramdır. Ototrof konukçu olan bitki ile heterotrof organizma arasındaki ilişkiyi ifade eder. Ektomikoriza tanımı daha çok yüksek yapılı bitkiler (orman ağaçları, çalılar) ile makromantarlar arasında kurulan ve bitki kökleri ile mantar miselyumu arasında oluşturulan simbiyotik birlikteliği ifade eder (13). Çalışmamıza konu olan “*T. anaticum*” bir ektomikoriza mantarıdır.

Ektomikorizal simbiyoz yaşamda mantar miselyumu, ağacın kök yüzeyini çevreleyerek yoğun bir kılıf veya manto oluşturur. Ağacın kökçüklerinin su ve mineral alma vazifesini misel üstlenir. Miselyumun bir kısmı kök korteks hücrelerinin arasına girer ve hücre dışı alanlarda kök hücrelerine girmeden ağsı bir yapı oluşturur. Bu ağ bitki ile

mantar arasında besin maddesi alışverişini kolaylaştırır. Miselyum aynı zamanda mantodan uzaklaşır ve yüzey alanını büyük ölçüde artırarak besinlerin tükendiği toprak bölgesine kadar yayılım gösterir. Artmış yüzey alanı sayesinde mantar hifleri topraktan su ve mineralleri alarak bitkiye aktarırlar. Bitki ise mantara fotosentez ile karbonhidrat (karbon kaynağı) sağlar (14).

2.1.3. Makromantarların Tıbbi Kullanımı

Mantarlar yüzyıllardır tüm dünya genelinde özellikle Çin ve Japonya’da besin olarak ve içerdikleri bileşikler sebebiyle geleneksel olarak tıbbi amaçlı kullanılmaktadırlar. Antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, kolesterol düşürücü, immün-stimulan vb. etkiler gösteren birçok mantar türü vardır. Dünyada yaklaşık olarak 140.000 mantar türü olduğu varsayılmaktadır. Ancak şimdiye kadar yüzde onu incelenmiştir. Etkilerini içerdikleri biyoaktif bileşenler sayesinde göstermektedirler. Glikolipitler, şikimik asitten türeyen bileşikler, aromatik fenoller, yağ asitleri, poliasetilamin, poliketitler, nükleozitler, seskiterpenler vb. bileşikler örnek verilebilir. Bu bileşenler vücudun hastalık ve enfeksiyon durumunda verdiği biyolojik cevabı etkilerler. Mantarların tüketimi güvenli olduğu ve yan etkileri (toksik olanlar hariç) olmadığı için ilgi çekmektedir. Son yıllarda araştırmacılar için özellikle mantar polisakkaritleri gözde bir konudur (5).

Mantarlar lezzetli olmalarının yanı sıra; içerdikleri proteinler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler, lifler ve bazı esansiyel minerallerle vücudun gereksinim duyduğu içeriklerden dolayı besleyicidirler (6).

Mantarlarda bulunan polisakkaritler ve polisakkarit-peptit kompleksleri immün yanıt ve biyolojik cevap süreçlerini aktive etmektedir. Dahası karsinogenez ve metastazı engelleyerek antitümoral etkinlikler göstermektedir. Antikanser etkinlik çalışmaları 1970’lerde, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer ’den elde edilen “lentinan” isimli bir β -glukan ile başlamıştır. Devam eden yıllarda *Schizophyllum commune* Fr.’den elde edilen “şizofilan” ile yapılan çalışmalarda; şizofilanın hasta hücrelerde makrofajlar aracılı immün yanıtta sebep olarak antitümoral etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla homoglukan, heteroglukan, heteroglukan ve polisakkarit-protein kompleksi birçok bileşik izole edilmiştir (7).

2.2. Botanik Özellikler

2.2.1. Tricholomataceae Familyasının Genel Özellikleri

Familya ismi kökenini yunanca iki kelime olan “trich”: kıl, “loma”: saçak kelimelerinden alır. Bunun sebebi ise (tüm türlerde olmasa dahi) mantarın şapka kenarlarında bulunan fibrile çıkıntılı dokudur (15).

Familya daha önceleri 78 cins içerirken 2014 yılında Sánchez-García ve ark. tarafından yapılan çalışma sonucunda yeniden sınıflandırılmış ve 7 cinse ayrılmıştır; *Leucopaxillus*, *Tricholoma*, *Dennisiomyces*, *Porpoloma*, *Corneriella*, *Albomagister*, *Pseudotricholoma* (16).

2.2.2. Cins Tayin Anahtarı

Tricholomatacea familyasına ait cinslerin tayin anahtarı aşağıdaki gibidir (16).

- 1-) Sporları amiloit değil..... 2
- 1-) Sporları amiloit..... 3
- 2-) Keliosistid ve plevrastid göze çarpan ve himenyum altından doğan uzun bir sap; kanca bağlantıları mevcut *Albomagister*
- 2-) Keliosistid var veya yok; plevrastid nadir bulunur, var ise himenyumdan doğar; kanca bağlantıları nadiren görülür *Tricholoma*
- 3-) Sporlar siğilimsi çıkıntılarla kaplı *Leucopaxillus*
- 3-) Sporlar pürüzsüz..... 4
- 4-) Keliosistid ve plevrastid mevcut..... *Dennisiomyces*
- 4-) Plevrastid yok; keliosistid var veya yok 5
- 5-) Keliosistid var, lamel kenarları steril; Güney Yarımküre'ye yayılmış *Porpoloma*
- 5-) Keliosistid var veya yok; Kuzey Yarımküre'nin ılıman orman ve çayırliklarına veya tropik bölgelere yayılım göstermiş..... 6
- 6-) Bazidyokarplar kesildiğinde veya çürüdüğünde renk değiştirmez; lameller bazen çatallaşmış; keliosistid var ve iyi ayırt edilebilir; tropik bölgelerde yayılım göstermiş *Corneriella*
- 6-) Bazidyokarplar kesildiğinde veya çürüdüğünde kırmızılaşır; lameller çatallaşmış; keliosistid yok veya güçlkle ayırt edilebilir; Kuzey Yarımküre'nin ılıman orman ve çayırliklarında yayılım göstermiş..... *Pseudotricholoma*

2.3. *Tricholoma* Türlerinin Genel Özellikleri

Tricholoma türleriyle ilgili ilk yazılı kaynaklara, eski çağlardan bu yana önem veren Japonya’da ulaşılmıştır. Japon halkı açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Japonlar bu mantara “Matsutake” ismini vermişlerdir. Özellikle yemek kültürlerinde 1000 yılı aşkın bir süredir yer almaktadır. Bu türler lezzetli bir besin olmasının yanında, kültürel ve dinsel anlamda da öneme sahiptir. Tarihi çok eski dönemlere dayanmaktadır. Milattan sonra 759 yıllarında yazıldığı belirlenen bir şiirde *Tricholoma* mantarlarının önemi ve sağlığa olan faydalarından övgüyle bahsedilmektedir. Aynı zamanda asalet ve zenginliğin de birer göstergesi olmuşlardır. Tarihsel dönem boyunca geçtiğimiz yüzyıla kadar *Tricholoma* mantarları verimlilik, üretkenlik ve mutluluğun bir sembolü olarak görülmüştür. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de Japon halkı tarafından büyük değer ve ilgi görmektedir (17).

Tricholoma ismi ilk Elias Magnus Fries’in *Systema mycologicum* (1821-1828) adlı çalışmasıyla literatüre girmiştir. Friedrich Staude’nin çalışmalarıyla 1857 yılından itibaren cins olarak ele alınmıştır (18).

Yapılan çalışmalar ve mantarların ekonomik ve besinsel değerleri göz önüne alındığında *Tricholoma* türleri içerisinde “Matsutake” grubu mantarlar dikkat çekicidir.

Grupta, Uzakdoğu ve İskandinavya’da yetişen *T. matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer, Asya kaynaklı *T. bakamatsutake* Hongo ve *T. fulvocastaneum* Hongo, “Amerika Matsutakesi” olarak adlandırılan ve Kuzey Amerika ve Meksika’da yetişen *T. magnivelare* (Peck) Redhead, Akdeniz bölgesi ülkelerinde yetişen ilk tür tayini de ülkemizde yapılan *T. anatolicum* ve Avrupa ülkeleri ve ülkemizde yetişen *T. caligatum* (Viv.) Ricken bulunmaktadır (19, 20).

2.4. Dünyada ve Ülkemizde Bulunan *Tricholoma* Türleri

“Catalogue of Life” 2016 verilerine göre; dünya genelinde günümüze değin, *Tricholoma* cinsine ait 364 tür tespit edilmiştir (21). Yapılan çalışmalar neticesinde ülkemizde *Tricholoma* cinsine ait 68 tür bulunmuştur. Bulunan türlerden bazıları; Batman ili çayırılık bölgelerinde *T. auratum* Gillet ve *T. ustale* (Fr.) P. Kumm.; Kayseri ili Hacer Ormanı’nda *T. cognatum* (Fr.) Gillet, *T. imbricatum* (Fr.) P. Kumm, *T. nudum* (Bull.) P.

Kumm. ve *T. terreum* (Schaeff.) P. Kumm.; Denizli ilinde *T. arvernense* Bon, *T. myomyces* (Pers.) J.E. Lange, *T. stans* (Fr.) Sacc. ve *T. ustale*; Güneyde Toros dağlarında yeni bir sedir mantarı türü olan *T. anatolicum*, Ege ve Akdeniz bölgesinde Muğla, Aydın ve Antalya gibi illerde ise *T. caligatum* tespit edilmiştir (17, 22, 23). *T. sulphureum* (Bull.) P. Kumm. türü yok olma tehlikesi ile karşı karşıya iken; *T. equestre* (L.) P. Kumm., *T. sejunctum* (Sowerby) Qué. , *T. stans* ve *T. ustaloides* Romagn. ise saldırıya açık durumdadır (23).

2.5. *Tricholoma anatolicum* H. H. Dogan & Intini Türü

2.5.1. *Tricholoma anatolicum*'un Genel Özellikleri

Matsutake grubunda yer alan ve ülkemiz için oldukça önemli olan *T. anatolicum*, lezzetli ve kaliteli bir besin maddesidir. Intini ve ark. tarafından ilk defa 2003 yılında ülkemizde tanımlanan *T. anatolicum* “Anadolu mantarı” manasına gelen “anatolicum” epiteti ile isimlendirilmiştir. Yöresel olarak “sedir mantarı” veya “katran mantarı” isimleriyle de tanınmakta, toplanmakta ve tüketilmektedir. *T. anatolicum* her yıl sonbahar aylarında sınırlı bir sürede yetişmekte, yerel halk tarafından toplanmakta ve *T. matsutake* gibi başta Japonya olmak üzere Asya ülkelerine ihraç edilmektedir. *T. anatolicum*, ülkemizde yetişen *Tricholoma* türleri arasında en değerli türdür. Türün belirli bir toplanma kuralının olmayışı ve aşırı miktarda toplanması; makrofungusun geleceği için tehdit oluşturmaktadır. Ülkemiz için oldukça önemli bir tür olan *T. anatolicum*'un korunması ve bu türün yetiştiği bölgelerdeki yerel halkın bu konuda bilinçlendirilmesi oldukça önemlidir (11). Şekil 2.1’de *T. anatolicum* fruktifikasyonları görülmektedir.



Şekil 2.1. *T. anatolicum*'a ait fotoğraflar (23).

2.5.2. Sistematığı

T. anatolicum' un ayrıntılı sistematığı aşağıda verilmiştir (24).

Alem: Fungi

Bölüm: Basidiomycota

Alt bölüm: Agaricomycotina

Sınıf: Agaricomycetes

Alt sınıf: Agaricomycetidae

Takım: Agaricales

Familya: Tricholomataceae

Cins: *Tricholoma*

Tür: *T. anatolicum* H. H. Doğan & Intini (2003).

2.5.3. Morfolojik Özellikleri

-Makroskobik Özellikleri

“Şapka; 4-20 cm çapında başta yarı küresel, sonrasında konveks ve en sonunda düzleşen bir yapıdadır. Yüzey; pürüzsüz, nemlendiğinde zayıf parlak, kurduğunda parlak ve ipeksi görünüme sahiptir. Beyazımsı, merkeze doğru soluk krem rengindedir. Gençken beyaz-soluk krem, yaşlandıkça açık kahverengiden sarımsı kahverengine doğru değişir. Kenarları; beyazımsı fibrilli içe doğru kıvrık, gençken kortina benzeri bir yapı ile sapa bağlıdır. Lameller; gençken beyaz, beyazımsı, yaşlandıkça açık sarımsı, dar, dişli sapa az bağı ya da serbest, kenarlar düz, sap 4-10 cm uzunluğunda ve 1-3 cm eninde, silindirik, dip kısma doğru incelmektedir. Eti 2-5 cm kalınlıkta, beyaz, çok serttir. Katran diye bilinen Lübnan sedirinin kokusuna benzer biçimde çok farklı bir kokuya sahiptir. Tadı çok hafif ve hoştur” (25).

-Mikroskobik Özellikleri

“Sporları elips şeklinde, yağ damlacıklı, pürüzsüz, renksiz ve $6-7.5 (8.5) \times 4-5 (5.5) \mu\text{m}$ boyutlarındadır” (25).

2.5.4. *T. anatolicum*'un Habitatı ve Ülkemizde Yayılışı

Ektomikorizal bir mantar olan *T. anatolicum*, sadece *Cedrus libani* A. Rich. (Sedir ağaçları) altında bulunur. Genellikle Toros Dağlarında 1300-1700 rakımda rastlanılmıştır. Mikorizal birliktelik kurduğu sedir ağaçları en az 25 yıllıkır. Olgunlaşması Akdeniz iklimi olan bölgelerde Ekim-Kasım aylarında sonlanır (10). Ormanlık arazide yetkin bir sedir mantarı örneği Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. Araziye sedir mantarının (*T. anaticum*) yetkin karpoforu (sap ile şapkadan oluşan kısım) ve toprak yüzeyinden yaklaşık 10-30 cm derinlikte oluşturduğu misel yapısı (22).

T. anaticum sedir ağaçlarının yoğunlukla bulunduğu Akdeniz Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Mantara rastlanılan iller batıdan doğuya doğru Muğla, Antalya, Konya, Karaman, Adana, Osmaniye ve K. Maraş'tır (10). Türkiye'deki dağılımı Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Projemizde kullanılan örneklerimiz Adana Feke ilçesinden toplatılmıştır.



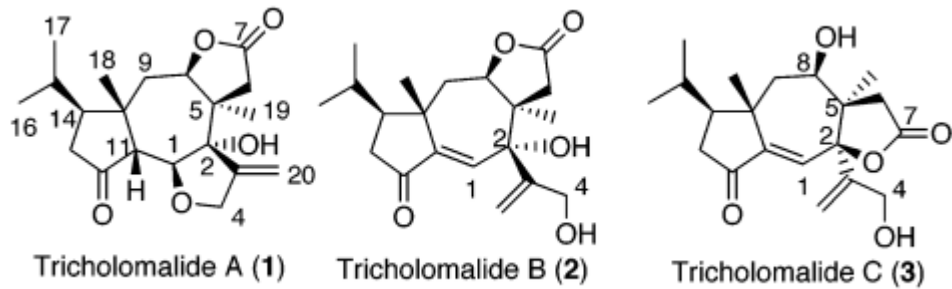
Şekil 2.3. *T. anaticum*'un Türkiye'deki Dağılımı (10).

2.6. *Tricholoma* Türleri Üzerinde Kimyasal Çalışmalar

Tricholoma türleriyle yapılan çalışmalar neticesinde bu türlerin çok sayıda sekonder metabolit içerdiğini özellikle de terpenoit türevleri içerdikleri görülmüştür. Son yıllarda *Tricholoma* türlerinin fitokimyasal çalışmalarında tespit edilen terpenoitler; diterpenler, triterpenler, polioksitlenmiş steroidler, fenolik monoterpeneoitler, dieningeranil siklohekzenonlar ve diğer indol türevleri gibi bileşenler olarak karakterize edilmiştir (25).

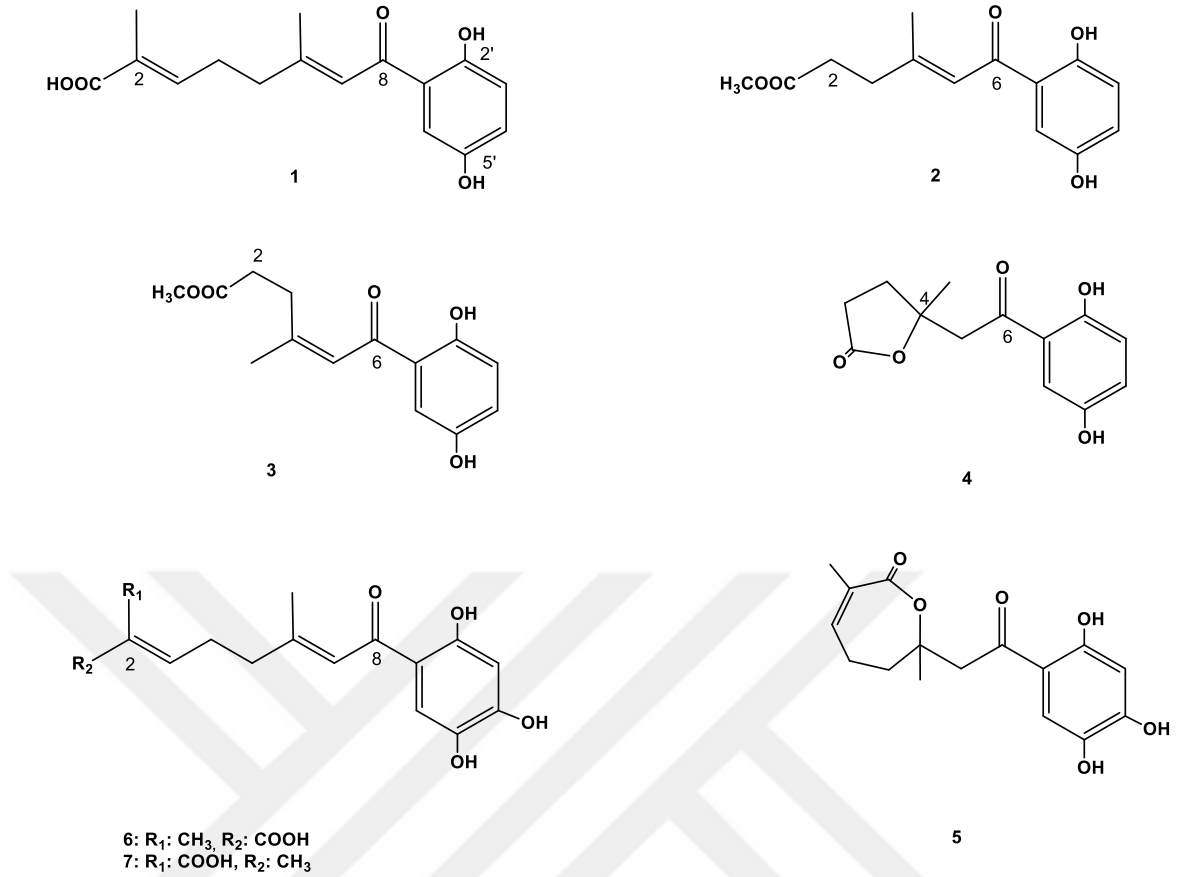
T. terreum'dan 4 yeni meroterpenoit izole edilmiştir. Terreumol A-D olarak isimlendirilmişlerdir. Spektroskopik yöntemler ve X-ışını difraksiyonu sonucu 10 üyeli bir halka yapısına sahip oldukları görülmüştür. Terreumol A, C ve D; 5 kanser hücre hattı üzerinde (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, SW48) sitotoksik etkiler göstermiştir. Mukayese olarak kullanılan cisplatine yaklaşan IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir (26).

Tricholoma türleriyle yapılan bir çalışmada bu mantarlardan 3 yeni diterpen izole edilmiştir. Bu diterpenler rat feokromositoma hücre kültüründe nörotropik etkiler göstermiştir. İzole edilen 3 yeni diterpene ait moleküler yapıları Şekil 2.4'te görülmektedir (27).



Şekil 2.4. *Tricholoma* türlerinden izole edilen 3 yeni diterpen (27).

T. orirubens Quél.'den hyaluronik asit bozunma inhibitör potansiyeli yüksek, yara iyileşmesi, eklem ağrısı tedavisi dahil birçok tedavi sisteminde fayda sağlayabilecek yeni fenon türevleri izole edilmiştir. İzole edilen fenon türevleri Şekil 2.5.'te verilmiştir (28).



Şekil 2.5. 1-) Orirubenon-D, 2-) Orirubenon-E, 3-) Orirubenon-F, 4-) Orirubenon-G, 5-) Orirubenon-A, 6-) Orirubenon-B, 7-) Orirubenon-C (28).

Kuzeybatı İspanya’da yetişen iki yabancı mantar olan *T. portentosum* (Fr.) Quél. ve *T. terreum*’ un kimyasal içerik ve besin değerleri araştırılmıştır. Diyet lifi, her iki türde de birbirine yakın ve yaklaşık kuru materyalin %45’i kadar bulunmuştur. Her iki türün protein içeriği de benzer ve kuru materyalin yaklaşık %16’sı kadardır. Esansiyel aminoasitler *T. portentosum* için toplam aminoasitlerin %61.8’i, *T. terreum* için ise %63.3’ü olarak hesaplanmıştır. Her iki türün protein içerikleri de yumurta akı, kazein ve biftekle kıyaslandığında oldukça fakirdir. Fakat karşılaştırılan bitkisel proteinlerden daha zengindir. Yağ içeriği *T. portentosum* için %5.7 ve *T. terreum* için % 6.6 hesaplanmıştır. Her iki tür için yağ içeriği düşük seviyededir. Her iki tür için, toplam yağ asitlerinin %75’inden fazlası oleik asit ve linoleik asit olarak hesaplanmıştır (29).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Diyarbakır ve Batman yörelerindeki lokasyonlardan toplanan 6 farklı tür mantara ait organik element ve protein içeriği araştırılmıştır. Mantarlara ait organik elementler (C, H, N) Carlo-Erba elementel analiz cihazıyla tespit edilmiş. Azot üzerinden toplam protein içeriği hesaplanmıştır. *T. ustale* örnekleri için protein içeriği %29.7- % 50.5 (% kuru materyal) bulunmuştur. Bu farklılığın materyalin toplandığı bölgeye göre protein içeriğinin değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (30).

Ülkemizde Doğu Karadeniz bölgesinde yetişen, *T. terreum* ve *T. virgatum* (Fr.) P. Kumm. dahil, 16 mantar türüyle ilgili bir çalışmada mantarların içerdikleri eser elementler incelenmiş; *T. terreum* ve *T. virgatum* için bulgular Tablo 2.1'de verilmiştir (31).

Tablo 2.1. *T. terreum* ve *T. virgatum* türlerinin selenyum, kadmiyum, demir, manganez ve çinko düzeyleri ($\mu\text{g/g}$ kuru materyal N=3) Ort \pm SS (31)

	Se	Cd	Fe	Cu	Mn	Zn
<i>T. terreum</i>	1.32 \pm 0.10	2.3 \pm 0.2	963 \pm 74	32.8 \pm 2.5	120 \pm 10	88.3 \pm 6.8
<i>T. virgatum</i>	88.3 \pm 6.8	1.2 \pm 0.1	238 \pm 25	21.4 \pm 2.1	75.2 \pm 6.3	126 \pm 11

Orta Anadolu'da yetişen yenilebilen bazı mantarların ağır metal içerikleri, yapılan bir diğer çalışmayla aydınlatılmıştır (32). Bu çalışmada incelenen türlerden birisi olan *T. equestre* için ağır metal içeriği Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. *T. equestre* için ağır metal bileşimi (mg/kg kuru materyal) , Ort \pm SS (32)

Pb	Cd	Zn	Fe	Mn	Cu	Cr	Ni
1.59 \pm 0.16	1.99 \pm 0.03	173.80 \pm 0.44	632 \pm 1	100.40 \pm 3.70	25.20 \pm 0.34	5.12 \pm 0.04	5.68 \pm 0.19

Portekiz yabani mantarlarının fenolik madde içeriğinin incelendiği bir çalışmada *T. atrosquamosum* Sacc., *T. sulphureum* mantarları da incelenmiş; *T. atrosquamosum* türünde, *p*-kumarik asit ve sinnamik asit; *T. sulphureum* türünde ise *p*-hidroksibenzoik asit ve sinnamik asit tespit edilmiştir (33).

İçerisinde *T. sulphureum*'un da bulunduğu, 18 Portekiz yabani mantarına ait çalışmada mantarların antioksidan güçleri ve Floresans-YBSK ile tokoferol içerikleri analiz edilmiştir. *T. sulphureum*'da ortalama 0.52 µg/g toplam tokoferol bulunmuştur. Bunun 40 µg/g'ı β-tokoferol olarak hesaplanmıştır (34).

T. matsutake'nin kimyasal kompozisyonu ve besinsel değeri ile bir çalışmada mantarın %20.3 ham protein, %29.10 lif, %36.67 karbonhidrat içerdiği gösterilmiştir. Aminoasit içeriği detaylı olarak incelenmiş ve tüm yumurta aminoasitleriyle karşılaştırılmıştır. Mantar ayrıca mineral içeriği açısından da değerlendirilmiş; K, Na, P, Ca, Zn, Fe, Cu, Mn mineralleri tespit edilmiştir. Toplam bileşen ve mineral içeriği, Tablo 2.3'te, karşılaştırmalı aminoasit içeriği Tablo 2.4'te verilmiştir. (35).

Tablo 2.3. *T. matsutake* toplam bileşenler ve mineral içeriği (100 g örnek için, n = 3). (35)

Bileşen	Konsantrasyon (Ort ± SS)
Protein (g)	20.30 ± 0.02
Yağ (g)	5.04 ± 0.01
Kül (g)	8.89 ± 0.05
Lif (g)	29.10 ± 0.09
Karbonhidrat (g)	36.67 ± 0.04
Suda çözünebilen şeker (g)	7.07 ± 0.03
Potasyum (mg)	2352 ± 0.44
Sodyum (mg)	31 ± 0.06
Fosfor (mg)	504 ± 0.11
Kalsiyum (mg)	41 ± 0.04
Çinko (mg)	14 ± 0.07
Demir (mg)	36.9 ± 0.03
Bakır (mg)	8.72 ± 0.06
Mangan (mg)	8.31 ± 0.02

Tablo 2.4. *T. matsutake* ve yumurta aminoasitleriyle karşılaştırması (-^a: Esansiyel aminoasitleri belirtir) (n=3) (35).

Aminoasitler	<i>T. matsutake</i> g/kg (Ort ± SS)	% Mantar aminoasitleri	% Yumurta aminositleri
Treonin^a	0.98 ± 0.002	4.0	5.1
Valin^a	1.59 ± 0.004	6.5	6.9
Metiyonin^a	0.45 ± 0.001	1.8	3.3
Izolösin^a	1.16 ± 0.007	4.6	6.3
Lösin^a	1.87 ± 0.002	7.6	8.8
Feninalanin^a	1.05 ± 0.004	4.2	5.7
Lizin^a	1.47 ± 0.002	6.0	7.0
Tirozin	0.64 ± 0.001	2.6	4.2
Serin	0.66 ± 0.001	2.7	7.6
Glutamik asit	5.49 ± 0.007	22.2	12.7
Glisin	1.42 ± 0.003	5.8	3.3
Alanin	2.36 ± 0.005	9.6	5.9
Sistein	0.10 ± 0.001	0.4	5.9
Aspartat	2.31 ± 0.002	9.4	9.6
Histidin	0.56 ± 0.001	2.2	2.4
Arjinin	1.11 ± 0.002	4.4	6.1
Prolin	1.51 ± 0.002	6.4	4.2
Toplam aminoasit	24.73		
Toplam esansiyel aminoasit	8.57	34.65	

Mantarlardan elde edilen ve antikanser özellikler gösteren bileşiklerin çoğunluğunun polisakkaritler olduğu gösteren sayısız çalışma vardır. Bu polisakkaritler ise çoğunlukla mantarların hücre duvarının yapısında bulunmaktadır. Her ne kadar kitin ve kitosan da hücre duvarında bulunsa da antikanser etkinlik göstermez. Antikanser etkinlik gösteren polisakkaritler çoğunlukla (1→3), (1→6) β-glukan veya (1→3) α-glukan türevleri olmaktadır. Bu bileşikler lineer veya dallanmış glikoz monomerlerinden veya yan zincirinde basit şekerlerin çeşitli kombinasyonları olan (glukuronik asit, ksiloz, galaktoz, mannoz, arabinoz, ksiloz) türevlerden oluşabilirler. Proteinlerle kompleks yapıları olasıdır. Antikanser etkinlik gösteren diğer polisakkaritler ise glukoz haricindeki

monosakkaritlerin polimerleşmesiyle oluşan glikanlardır. Bu glikanlar arabinoz, mannoz, fukoz, galaktoz, ksiloz, glukuronik ait ve glukoz içerebilir (36). *Tricholoma* cinsine ait mantarlarda da bu açıklanan yapıları bünyesinde barındıran ve antikanser etkinlik gösteren birçok tür vardır.

T. matsutake'den su ekstraksiyonu ve alkol çöktürme sonucu elde edilen polisakkarit fraksiyonunun yapılan analizlerle kimyasal yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler sonucu polisakkaritin moleküler ağırlığının 15.76 kDa olduğu görülmüştür. Monosakkarit analizi sonucu D-glukoz, D-galaktoz, D-mannoz and D-fukoz monomerlerinden oluştuğu bulunmuştur. Karbonhidrat polimerlerinin birbirine β -glikozidik bağlarla bağlı olduğu IR Spektroskopisi ile belirlenmiştir. (1).H-NMR, (13)C-NMR ve 2D-NMR sonuçlarına göre şekerlerin β ve α bağlarıyla bağlı olduğu; β bağ/ α bağ oranının 4/1 olduğu görülmüştür. Bu ana bilgiler ışığında molekülün ana iskelet olarak (1-4)-beta-piran glukoz içerdiği ve O-6 konumundan bağlı olan dallanmış zincirin fukoz (1-2) mannoz (1-3)-alfa-piran galaktoz olduğu tespit edilmiştir (37).

Yine aynı türle yapılan başka bir çalışmada mantara alkol çöktürmesi, protein uzaklaştırma, DEAE-52 selüloz iyon değiştirme kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi işlemleri uygulanarak MTS-1 ve MTS-2 isimli iki polisakkarit izole elde edilmiştir. MTS-1 ve MTS-2 polisakkaritlerinin moleküler ağırlıkları YBSK ve jel geçirgenlik kromatografisi vasıtasıyla; monosakkarit analizi ise gaz kromatografisi ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak MTS-1 5939 Da, MTS-2 ise 232317 Da bulunmuştur. MTS-1 glukoz, ksiloz ve galaktozun sırasıyla 12.89: 1.20: 1 oranında birleşmesiyle oluşurken MTS-2 monomer olarak sadece glukoz içermektedir (38).

T. giganteum'dan sıcak su ile polisakkarit ekstraksiyonu için optimum şartların belirlendiği bir çalışmada ekstraksiyon için optimum koşullar ekstraksiyon sıcaklığı için 100 °C, ekstraksiyon zamanı için 3 saat, ekstraksiyon sıvısı: ekstre edilecek madde oranı 20:1 ve polisakkaritleri çöktürmek için 5 katı etanol kullanımı olarak belirlenmiştir (39). Çalışmamızda sıcak su ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılan yöntemle aynıdır.

T. lobayense R. Heim, çok sağlıklı ve besleyici bir mantardır. Yapılan bir çalışmayla %99' dan daha fazla saflıkta üç polisakkarit ekstresi (TLH-1, TLH-2, TLH-3) elde edilmiştir. Antioksidan deney sonuçlarına göre üç ekstre içerisinde en aktif olarak TLH-3 bulunmuştur. Bu ekstrelerin yapısal analizleri sonucu; moleküler ağırlıkları

TLH-1 için 8.43×10^5 Da, TLH-2 için 5.36×10^5 ve TLH-3 için 4.53×10^3 bulunmuştur. TLH-1 ve TLH-2'nin çoğunlukla 1-4-bağlı- α -D-glukopiranozil'den oluştuğu; TLH-3'ün ise C-6 konumundan 1-3-bağlı- α -glukopiranozil olarak dallandığı ve 1-3-bağlı- β -D-galaktopiranozil içeren çok dallanmış bir glukogalaktan olduğu tespit edilmiştir. TLH-3'ün etki bakımından en güçlü olmasının nedeni, molekülün moleküler ağırlığının daha düşük olmasına, çok dallanmış olmasına, çok yönlü bağlarının olmasına ve konformasyonunun kompleks olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (40).

Amerikan Matsutake mantarı olarak bilinen *T. magnivelare*'nin misel ve sporokarp yapılarının uçucu bileşikleri araştırılmıştır. Uçucu bileşik analizleri GC-MS ile yapılmıştır. Sonuç olarak sporokarp yapısı uçucu bileşenleri; metil sinnamat, α -pinen, bornil asetat ve 1-okten-3-ol bulunmuştur. Miseller yapı uçucu bileşenleri ise; 3,5-dikloro-4-metoksibenzaldehit, 3,5-dikloro-4-metoksibenzil alkol ve hekzanal olarak bulunmuştur (41).

Güney Kore'de yapılan bir çalışmada *T. matsutake*'ye ait uçucu bileşik analizi GC-MS ile, kokulu madde analizi ise GC-olfaktometri ile yapılmıştır. Şapka kısmında 24, sap kısmında 21 uçucu bileşik, tespit edilmiştir. Metil sinnamat ve 1-okten-3-ol bunların en çok bulunanlarıdır. 1-okten-3-on ise şapka ve sap kısmında mantarın ana kokusunu oluşturan maddedir. Şapka ve sap kısmının koku içerikleri ve kokuları farklılıklar göstermektedir (42).

2.7. *Tricholoma* Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları

2.7.1. Antihipertansif Etki

T. giganteum Masee fruktifikasyonları Asya'da evde yapılan tedavilerde, farmasötik amaçla uzun zamandır kullanılmaktadır. Bu kullanımlarından yola çıkılarak yapılan bir çalışmada bu mantarın distile su ekstresi elde edilmiştir. Ultrafiltrasyon, Sephadex G-25 kolon kromatografisi ve Ters Faz YBSK ile ACE inhibitörü peptidler fraksiyonlanmıştır. Elde edilen fraksiyonlardan birisi, spontan hipertansif ratlarda, 1 mg/kg dozda yüksek antihipertansif etki göstermiştir. ACE'nin kompetitif bir inhibitörü olduğu bildirilmektedir (43).

T. mongolicum S. Imai'nin misellerinden elde edilen lektinin sıçanlara jugular venden intravenöz 10 mg/kg dozda uygulanmasıyla, arteryel kan basıncında 95.3 ± 7.4 mmHg düşüş sağlayarak hipotansif etki gösterdiği görülmüştür (44).

2.7.2. Antimikrobiyal Etki

T. giganteum fruktifikasyonlarından izole edilen lakkazın, HIV-1 revers transkriptazı ($IC_{50}=2.2 \mu M$) inhibe ederek antiretroviral etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (45).

T. giganteum'dan birçok kromatografi tekniği kullanılarak izole edilen trichogin isimli bir proteinin *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* ve *Physalospora piricola* üzerinde antifungal etkinlik gösterdiği; ayrıca HIV-1 revers transkriptaz enzimini ($IC_{50}=83$ nM) inhibe ettiği tespit edilmiştir (46).

İçinde *T. giganteum*'un da bulunduğu 18 mantara ait ekstreler, *Leishmania donovani* protozoasına karşı antilaşmanyal etkinlikleri için incelenmiştir. *T. giganteum*'a ait ekstrenin *L. donovani*'nin gelişim formlarından biri olan promastigotlara karşı etkin olduğu tespit edilmiştir (47).

T. columbetta (Fr.) P. Kumm. ve *T. caligatum*'un da dahil olduğu bir çalışma grubunda mantarların siklohekzan, diklorometan, metanol ve deiyonize su ekstreleri elde edilmiştir. Bu ekstrelerin Gr(-) *Pseudomonas aeruginosa*, Gr(+) *Bacillus cereus* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkisi agar difüzyon metoduyla çalışılmıştır. Sonuç olarak her iki türe ait metanol ekstrelerinin, aynı mantarlara ait diğer ekstrelere göre her üç patojene de (*C. albicans*, *B. cereus* ve *P. aeruginosa*) 20 mg/mL konsantrasyonda en güçlü inhibisyon zonunu oluşturarak antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer ekstrelerde ve düşük konsantrasyonlarda ise etkinlik ya hiç bulunamamış ya da daha az bulunmuştur (48).

Hindistan'da Batı Bengal yenilebilir mantarlarıyla yapılan bir çalışmada *Tricholoma* cinsine ait 3 tür (*T. crassum* Sacc., *T. lobayense*, *T. giganteum*) için antimikrobiyal etkinlik araştırılmıştır. Mantarlardan metanol ekstreleri elde edilmiş, akabinde *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* için disk difüzyon metoduyla antimikrobiyal tarama yapılmış ve *T. giganteum*'un minimum inhibisyon

konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Sonuç olarak *T. crassum* ekstresi yalnızca *B. cereus* ve *P. vulgaris*'e karşı inhibisyon zonu oluşturabilmiş; *T. lobayense* ekstresi yalnızca *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı zon oluşturmuştur. *T. giganteum* ekstresi ise *C. albicans* haricindeki bütün mikroorganizmalara karşı etkili bulunmuştur *T. giganteum* ekstresinin tüm mikroorganizmalar için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) 75 µg/disk bulunmuştur (49).

İçerisinde *T. mongolicum*'dan elde edilen TML-1 ve TML-2 isimli iki lektinin de bulunduğu birçok maddenin antinematodal etkinliği bir çalışmayla belirlenmiştir. *D. dipsaci* için TML-1, *H. glycines* için ise TML-2 güçlü antimikrobiyal etkili bulunmuştur (50).

2.7.3. Antikanser, İmmünstimülan ve İmmünmodülatör Etkiler

T. mongolicum'dan izole edilen TML-1 ve TML-2 isimli iki lektinin, farelere implante edilen sarkoma 180 hücrelerinin büyümesini; farelerdeki makrofajları aktive ederek ve nitrit iyonlarının üretimini stimüle ederek inhibe ettiği tespit edilmiştir. Özellikle TML-2, yüksek derecede aktif bulunmuştur (51).

Hong Kong'da bulunan lokal bir *Tricholoma* türünün misel kültüründen polisakkarit-peptit kompleksi bir madde izole edilmiştir. Bu maddenin farelerdeki sarkoma 180 hücrelerinin büyümesini önlediği, makrofaj hücrelerini aktive ettiği, T-hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği düşünülmektedir. Böylelikle immünmodulator ve antitümör etkinlik göstermektedir (52)

T. equestre'den elde edilen flavomannin-6,6-dimetileter isimli maddenin, Caco-2 hücre hattında, G0/G1 fazındaki duraklamayı indükleyerek ve p27 protein seviyesini yükselterek sitostatik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (53).

T. matsutake'den ultrasonik etkiyle ekstre edilen polisakkaritler, DEAE-Sepharose kolon vasıtasıyla fraksiyonlara ayrılarak TMP-1, TMP-2, TMP-3 olmak üzere 3 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların kimyasal bileşim ve yapı tayini sonucunda TMP-2'nin diğerlerinden farklılık gösterdiği ve Glukoz: Galaktoz: Mannoiz monomerlerinden sırasıyla 5.9: 1.1: 1.0 oranıyla oluştuğu tespit edilmiştir. Glikozidik bağlarının 1-6 ve 1- bağlı glikozlardan oluştuğu tespit edilmiştir. Antioksidan etkinlik

gösteren bu madde 4.0 mg/mL dozda, HEPG-2 ve A-549 kanser hücre hatlarında sırasıyla yaklaşık %68 ve %59 antiproliferatif etki göstererek canlılığı azaltmıştır (54).

T. giganteum'dan elde edilen suda çözünebilen bir polisakkarit ekstresi ve suda çözünmeyen üç polisakkarit ekstresi iyon-değiştirici kromatografi, jel filtrasyon ve affinite kromatografisi ile birçok fraksiyona ayrılmıştır. Bu fraksiyonlardan suda çözünebilir olan FA-1 fraksiyonu, Sarkoma-180 hücreleri implante edilmiş farelerde tümörü yaklaşık %69 oranında baskılamıştır. Suda çözünmeyen fraksiyonlardan FIII-2-a fraksiyonu, aynı tümör üzerinde yaklaşık %93 oranında bir inhibisyon göstermiştir. Her iki ekstreye ait kimyasal ve yapısal analiz sonucu olarak; FA-1'in %1 protein içeren ve molekül ağırlığı 5.2×10^4 Da olan β -D-glukan olduğu, suda çözünmeyen bir fraksiyon olan FIII-2a'nın ise moleküler ağırlığı 4.1×10^5 Da olan küçük miktarlarda ksiloz, galaktoz ve %3.5 protein içeren bir (1-6)- β -D-glukozil dallı (1-3)- β -D-glukan olduğu tespit edilmiştir (55).

T. lobayanse'nin kültür filtratlarından izole edilen protein-polisakkarit kompleksinin farelerde bulunan Sarkoma 180 hücrelerine karşı antitümöral etkinlik gösterdiği, kanser hücre hatlarında ise 30 ve 60 μ g/mL gibi düşük dozlarda dahi sitotoksik etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir (56).

İsviçre albino fareleri benzo[a]piren uygulaması ile midelerinin ön bölgesinde kanser oluşturulmuştur. Hasta hale getirilen farelere *T. giganteum*'un %80'lik etanol ekstresi, 10-100 mg/kg dozda 16 hafta verilmiştir. 16 haftanın sonunda kanserin baskılandığı görülmüştür. Hücrelerdeki antioksidan deney sonuçları da göz önüne alındığında *T. giganteum*'un bu koruyucu etkisini; lipid peroksidasyonunu düzenlemesiyle, antioksidan savunma sistemini aktive etmesiyle, hücre çoğalmasının inhibe etmesiyle ve apoptozu indüklemesiyle gösterdiği düşünülmektedir (57).

T. crassum alkali ekstresinden hetero-polisakkarit yapıda bir madde izole edilmiştir. Bu polisakkarit; makrofajları, timosit ve splenositleri proliferate ederek immün cevaplar oluşturmuştur (58).

2.7.4. Antioksidan Etki

T. matsutake türüne ait dört ayrı kalite mantarın serbest radikal süpürücü etkisi ve nitrik oksit üretimini inhibe edici etkisi incelenmiştir. Nitrik oksit inhibe edici etki RAW 264.7 hücrelerinde çalışılmıştır. Öncelikle mantarlara ait etil asetat, bütanol, dietileter ve su fraksiyonları elde edilmiştir. Akabinde antioksidan deneyleri yapıldığında dört kalite mantar için de serbest radikal süpürücü etki sıralaması etil asetat fraksiyonu> bütanol fraksiyonu> dietileter fraksiyonu> su fraksiyonu şeklindedir. Nitrik oksit sentezini inhibe edici sıralama ise üç fraksiyonda denenmiş ve etilasetat> bütanol> su şeklindedir. Bütanol ve etil asetat fraksiyonlarının daha aktif çıkmasının sebebi fenolik madde ve flavonoit içerikleriyle antioksidan etkinliklerinin korele olması sebebiyle içerdikleri fenolik madde ve flavonoitlerle alakalı olduğu düşünülmektedir (59).

T. mongolicum için optimum polisakkarit ekstraksiyon parametreleri sıcaklık: 48.4 °C, pH: 5.4 ve ekstraksiyon zamanı: 134 dakika olarak hesaplanmış ve ekstre verimi bu şartlarda ortalama %24 bulunmuştur. Bu şartlarda elde edilen polisakkarit ekstresi DEAE-53 anyon değiştirici kromatografi ve Sephadex-100 kromatografi uygulanarak 4 fraksiyona ayrılmış ve her fraksiyonun ayrı ayrı insan serviks karsinoma hücre hattı üzerinde (HeLa) antioksidan ve antiproliferatif etkileri incelenmiştir. TMIP-4, hem antioksidan hem de antiproliferatif etkiler açısından en etkin fraksiyon bulunmuştur (60).

İçinde *T. caligatum*'un da bulunduğu mantarlarla yapılan çalışmada bu mantara ait diklorometan, metanol ve sıcak su ekstraktlarının (polisakkarit saflaştırılması yapılmadan direkt su ekstresi) antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerine bakılmıştır. Antioksidan deneyleri ve toplam fenolik madde gallik asit standartı üzerinden göre hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 2.5'te gösterilmiştir (48).

Tablo 2.5. *T. caligatum*'a ait diklorometan, metanol ve su ekstraktlarının antioksidan gücü ve toplam fenolik madde miktarları. Ort±SS. TE: Troloksa Eşdeğer (48).

Ekstreler	ABTS ⁺ • Radikali Süp. Etki (µM TE/g kuru ağırlık)	DPPH [•] Rad. Süp. Etki (µM TE/g kuru ağırlık)	Demir İnd. Gücü Belirlenmesi (µM TE/g kuru ağırlık)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g kuru ağırlık)
Diklorometan ekstresi	4.02 ± 0.40	3.72 ± 0.30	8.75 ± 0.42	3.87 ± 0.01
Metanol ekstresi	7.44 ± 1.58	0.12 ± 0.02	0.43 ± 0.12	4.76 ± 0.60
Su ekstresi	3.53 ± 1.77	2.04 ± 0.46	17.29 ± 0.38	5.89 ± 0.24

2.7.5. Hepatoprotektif Etki

Parasetamol ile indüklenerek karaciğer hasarı oluşturulan farelere, içerisinde *T. lobayense*'nin de bulunduğu üç mantara ait su ekstreleri 300 mg/kg dozda verilmiştir. Sonuç olarak türe ait bu ekstre, hepatoprotektif etkiler göstererek karaciğerdeki hasara ait kan parametrelerinden olan serum glutamik pirüvik transaminaz (SGPT) ve serum glutamik oksaloasetik asit transaminaz (SGOT) seviyelerini kayda değer biçimde düşürmüştür (61).

2.7.6. Hipoglisemik Etki

T. mongolicum'un da içerisinde bulunduğu bir çalışmada mantar ekstrelerinin diyabet üzerine etkileri incelenmiştir. Streptozotosinin intraperitoneal enjeksiyonu yoluyla indüklenerek diyabetli hale getirilmiş farelere bu mantarlara ait ekstreler oral yolla 10 mg/kg dozda verilmiştir. 25 gün süren çalışmada *T. mongolicum*'un polisakkaritlerce zengin fraksiyonunun diğer bütün ekstrele göre daha güçlü bir etki göstererek plazma glukoz seviyelerini düşürdüğü ve hipoglisemik etki sağladığı tespit edilmiştir (62).

2.7.7. Toksikite

2002 yılında Polonya Gdansk Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne yatış yapan anne ve oğlunu içeren bir olguda; 9 ardışık yemek boyunca *T. equestre* yabani mantarından 100-300 gram yedikleri anlaşılmıştır. Son yemekten 48 saat sonra başlayan yorgunluk, kaslarda zayıflık, iştah kaybı, hafif bulantı, aşırı terleme şikayetleri ortaya çıkmıştır. Rabdomiyoliz (kas dokusunda bozulma) olarak teşhis edilen olguda bu durumun altında yatan başka bir parazitik, viral veya immün hastalık, travma veya ilaca maruziyet tespit edilememiştir. Sonuç olarak *T. equestre* türünün bir toksin içerdiği ve rabdomiyolize (kas dokusunda bozulma) yol açtığı tespit edilmiştir (63).

2.7.8. Yaşlanma Karşıtı Etki

T. matsutake'den elde edilen polisakkaritin yapılan bir çalışmayla; insan fibroblast hücrelerinde matriks metaloproteinazların salınımını inhibe ederek elastaz aktivitesini artırdığı ve böylelikle cildin kırışıklıklara onarımından sorumlu elastaz enzimi ile birlikte yaşlanma karşıtı etki gösterdiği belirtilmiştir (64).

Daha önceki çalışmalarla antioksidan etkinliği belirlenmiş *T. lobayense*'ye ait TLH-3 polisakkaritinin bu antioksidan etkisinin daha geniş anlamda incelendiği bir çalışmada polisakkaritin *in vitro*, insan embriyonik akciğer fibroblast hücrelerinde (HELFL) canlılığı artırdığı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini azalttığı ve tert-bütillhidroperoksitin (*t*-BHP) indüklediği oksidatif hasarları da azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca polisakkaritin yaşlanma karşıtı etkisi de; D-Galaktozun indüklediği yaşlanan fare modeliyle çalışılmış; TLH-3 polisakkaritinin fare karaciğer ve serumunda bulunan malondialdehit (MDA) oluşumunu inhibe ettiği, süperoksit dismutaz (SOD), ve katalazın (CAT) etkisini artırdığı ve bu sebeplerle yaşlanma karşıtı etki gösterdiği tespit edilmiştir (65).

2.8. *Tricholoma anatolicum* Üzerinde Kimyasal Çalışmalar ve Biyoaktivite Çalışmaları

2.8.1. *Tricholoma anatolicum* Üzerinde Kimyasal Çalışmalar

Bu mantarla ilgili çalışmaların çoğunluğu ülkemizde yapılmıştır. Güneybatı Anadolu'dan toplanan *T. anatolicum* örneklerinin kimyasal içerik ve besinsel değeri belirlendiği bir çalışmayla belirlenmiştir. Mantarın nem, yağ, kül, toplam karbonhidrat ve mineral bileşimi (Fe, Na, K, Zn, Cu, Ca, Cd, Pb) analiz edilmiştir. Ayrıca mantarın enerji değerleri de hesaplanmıştır. Analizler mantarın 3 gelişim aşaması olan misel, genç şapka ve olgun şapkada ayrı ayrı incelenmiştir (66). Tablo 2.6'da misel, genç ve olgun şapkalara ait; yüzde olarak nem, kül, protein, ham yağ, toplam karbonhidrat miktarı gösterilmektedir. Ayrıca toplam karbonhidrat, yağ ve protein içeriği üzerinden oransal enerji düzeyleri de kcal ve kJ cinsinden hesaplanmıştır. Tablo 2.7'de ise mantarın 3 dönemde de mineral kompozisyonları verilmiştir.

Tablo 2.6. *T. anaticum* misel, genç şapka ve olgun şapkalarının nem, kül, protein, ham yağ, toplam karbonhidrat miktarları ve enerji seviyeleri. Ort±SS (66).

	Misel	Genç şapka	Olgun şapka
Nem (%)	33.69 ± 2.51	14.75 ± 0.16	11.03 ± 0.16
Kül (%)	0.26 ± 0.06	2.67 ± 0.12	1.30 ± 0.08
Protein (%)	97.02 ± 0.52	90.24 ± 0.55	93.95 ± 0.42
Ham yağ (%)	0.97 ± 0.05	0.56 ± 0.03	0.53 ± 0.17
Toplam karbonhidrat (%)	1.74 ± 0.56	6.71 ± 0.58	4.40 ± 0.54
Enerji (kcal)	403.8 ± 0.6	391.2 ± 1.6	396.6 ± 2.0
Enerji (kJ)	1714.9 ± 2.0	1668.9 ± 6.4	1691.6 ± 4.6

Tablo 2.7. *T. anaticum* misel, genç şapka ve olgun şapkalarının mineral kompozisyonu (Değerler kuru materyalde mg/kg olarak hesaplanmıştır). Ort±SS (66).

	Misel	Genç şapka	Olgun şapka
Fe	73.4 ± 5.91	77.0 ± 4.08	68.4 ± 0.82
Na	127.7 ± 6.5	69.0 ± 2.48	79.3 ± 0.69
K	40.6 ± 3.87	53.2 ± 3.04	58.3 ± 3.91
Zn	66.4 ± 0.59	65.41 ± 0.61	61.4 ± 0.97
Cu	38.0 ± 0.17	38.88 ± 1.34	46.68 ± 2.77
Ca	88.13 ± 1.39	77.86 ± 3.44	81.86 ± 2.35
Cd	-	-	-
Pb	-	-	-

Başka bir çalışmada ise mantara ait aroma bileşenlerinin GC-MS ile analizi yapılmıştır. *T. anaticum*'a ait aroma ana bileşenleri sırasıyla hekzanal (%27.588), 2-metil bütanal (%9.802) ve 3-metil bütanal (%9.647) bulunmuştur. Aroma bileşeninin %64.897'sinin aldehit, %15.576'sının alkol, %2.248'inin keton, %10.311'ünün diğer uçucu bileşik ve %3.217'sinin terpenlerden oluştuğu tespit edilmiştir (67).

Makrofungusa ait yağ asidi kompozisyonunun GC-MS ile belirlendiği başka bir çalışmaya ait sonuçlar ise Tablo 2.8'dedir (68).

Tablo 2.8. *T. anatolicum*'a ait yağ asiti kompozisyonu ve *T. anatolicum*' a ait yağ asitlerinin yüzde dağılımı (68).

Yağ asidi	Yağ asidinin yaygın ve (sistemik adı)	Yüzde yağ asiti %
C 10:0	Kaprik asit (Dekanoik asit)	0.06
C 11:0	Henedekanoik asit (Undesilik asit)	0.04
C 12:0	Laurik asit (Dodekanoik asit)	0.03
C 13:0	(Tridekanoik asit)	0.02
C 13:1	Tridesilik asit (Tridekaenoik asit)	0.01
C 14:0	Miristik asit (Tetradekanoik asit)	0.36
C 14:1	Miristoleik asit (cis-9-Tetradekanoik asit)	0.77
C 15:0	Pentadesilik asit (Pentadekanoik asit)	0.07
C 16:0	Palmitik asit (Hekzadekanoik asit)	10.87
C 16:1	Palmitoleik asit (trans-9-Hekzadekanoik asit)	0.72
C 17:0	Margarik asit (Heptadekanoik asit)	0.13
C 17:1	Margaroleik asit (Cis-10-heptadekanoik asit)	0.42
C 18:0	Stearik asit (Oktadekanoik asit)	6.22
C 18:1	Oleik asit (cis-9- Oktadekanoik asit)	33.80
C 18:2	Linoleik asit (LA) (cis-9, 12- oktadekanoik asit)	35.86
C 20:0	Araşidik asit (Eikosanoik asit)	0.10
C 20:1	Gadoleik asit (cis-11-Eikosanoik asit)	0.50
C 18:3	Linolenik asit (a-linoleik asit, ALA) (cis-9,12,15- Oktadekanoik)	5.04
C 21:0	Heneikosanoik asit	0.89
C 20:2	Eikosadienoik asit (cis-11,14- Eikosadienoik asit)	0.32
C 20:3	Di homo-gamma-linoleik asit (DGLA)	0.12
C 20:4	Araşidonik asit (cis-5,8,11,14-Eikosatetraenoik asit)	1.12
C 22:1	Erusik asit (cis-13-dokosenoik asit)	0.15
C 20:5	Eikosapentaenoik asit (EPA) (cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaenoik asit)	0.56
C 22:2	Cis-13,16- Dokosadienoik asit	0.10
C 22:4	Dokosatetraenoik asit	0.08
C 24:1	Nervonik asit (cis-tetrakosenoik asit)	0.05
C 22:5	Dokosapentaenoik asit (cis 7,10,13,16,19-Dokosapentaenoik asit)	0.22
C 22:6	Dokosaheksaenoik asit (DHA) (cis,4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik asit)	1.41

Diğer bir çalışmada ise mantarın toplam protein, toplam karbonhidrat, C vitamini miktarları; GC-MS sistemi kullanılarak kalitatif ve kantitatif yağ asidi analizi; mineral ve ağır metal içerikleri belirlenerek besinsel özellikleri incelenmiştir. Toplam protein miktarı 29.00 g/100 g, toplam karbonhidrat miktarı 59.35 g/100 g, yağ miktarı 3.40 g/100 g, C vitamini miktarı 3.20 mg/g olarak bulunmuştur. Yağ asidi ana bileşenleri oleik asit ve linoleik asit bulunmuş ve sırasıyla %63,24 ve %17,13 oranlarında tespit edilmiştir. Mineral ve ağır metal içeriği ise Tablo 2.9'da verilmiştir (25).

Tablo 2.9. *T. anaticum* mineral ve ağır metal bileşimi (mg/kg) (25).

Mineral	Na	Mg	Ca	K	Mn	Fe	Zn	Se	P
Konsantrasyonu mg/kg	194.5	304.4	55.6	15676	7.6	65.8	5.6	0.4	1783
Ağır Metal	Pb	Cd	Ni	As	Cl	Al	Ag	Co	Cu
Konsantrasyonu mg/kg	0.36	-	0.59	0.69	0.19	236.93	0.05	0.08	7.86

2.8.2. *Tricholoma anaticum* Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları

Yapılan sitotoksikite etkinlik çalışmasında mantara ait ultrasonik etkiyle elde edilmiş su, metanol, etanol ekstraları; paklitaksel ve vinkristine dirençli MCF-7 hücrelerine uygulanmış ve XTT hücre canlılık testi ile sitotoksik etkinlik belirlenmiştir. Sonuç olarak vinkristine dirençli hücrelerde IC₅₀ değerleri 1.08-1.80 mg/ml, paklitaksele dirençli hücrelerde ise 1.11-2.83 mg/mL bulunmuştur. En yüksek etkinlik etanol ekstralarında gözlemlenmiştir (69).

Başka bir çalışmada türün antioksidan gücü ve antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Metanol ekstresi antioksidan deneylerde kullanılmış ve sonuç olarak toplam fenolik madde miktarı 0.265 mg/ml GAE bulunmuştur. CUPRAC antioksidan deney sonuçları olarak TEAC değeri 0.129 mg/ml bulunmuştur. DPPH• radikalini süpürücü etkisi 250 µg/ml konsantrasyonda %90 oranında bulunmuştur. Linoleik asit oksidanını engelleme yüzdesi ise 1 mg/mL konsantrasyonda %74.18 bulunmuştur. Aynı çalışmada mantarın antimikrobiyal etkinliği de incelenmiştir. Hekzan, aseton, kloroform ve metanol ekstraları çalışılmıştır. Sonuç olarak kloroform ekstresi, *Streptococcus mutans*'a karşı 5 mm; aseton ekstresi ise *Escherichia coli*'ye karşı 5 mm genişliğinde inhibisyon zonu oluşturarak az da olsa antimikrobiyal etki göstermiştir (68).

2.9. Kanser

2.9.1. Kanser Tanımı

Kanser, kısaca hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıdır. Anormal olarak çoğalan bu hücreler yapısal olarak da farklılaşabilir. Kontrolsüz şekilde çoğalan bu hücreler kimi zaman kendi fonksiyonlarını yerine getiremezken, kimi zamanda yeni fonksiyonlar kazanabilirler. Kansere hücreleri köken aldıkları dokudan uzaklaşarak farklı dokuları etkileyerek ordaki sistemik faaliyetleri de etkileyebilirler. Kansere hastalığı birden ortaya çıkan bir hastalık değildir. Ortalama süreç olarak hastalığın ortaya çıkması 15-20 yıllık bir süreci kapsamaktadır. Kansere köken aldıkları dokunun ismine göre isimlendirilirler. En sık görülenleri deri, akciğer, meme, sindirim sistemi ve üreme sistemi organlarını tutan kanser türleridir (70).

Kansere oluşumuyla ilgili güncel dogma; DNA diziliminde değişim (mutasyon) sonucu oluşan sadece tek bir anormal hücreden köken alan multi-gen ve multi-basamaklı bir hastalık olduğu yönündedir. Bu hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve ikinci bir mutasyonla daha kaba bir safhaya geçilir. Artan mutasyonlar ve bu hücrelerin çoğalmasıyla birlikte tümör kütlesi oluşmaya başlar. Ardarda gelişen mutasyonlar ve aşırı çoğalma sonucu tümör büyüyüp genişleyerek, bazal membran bariyeri çevreleyen dokuları aşarak vücudun başka bölgelerine ulaşır. Buna “metastaz” denir. Bu kontrol altına alınamayan çoğalma vücuttaki normal dokuların bu hücrelerce istila edilmesine ve dolayısıyla kanserden ölüme sebebiyet verir (71).

Kansere hücreleri hem *in vivo* hem de *in vitro* kontrolsüz çoğalmaktadırlar. Normal hücrelerde yoğunluğa bağlı inhibisyon oluşur, yani hücre sayısı belirli bir yoğunluğa erişince hücre siklusu G0 fazında durur. Ancak kansere hücreleri bu fazda durmak yerine yoğunluk artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler. Kansere hücrelerinin kontrolsüz çoğalmaları için ikinci bir neden ise; normal hücrelerin çoğalmasını sınırlayan, serum büyüme faktörlerine duyulan ihtiyacın, bu hücrelerde normal hücrelere kıyasla çok az olmasıdır. Bazı durumlarda kansere hücresi büyüme faktörünü kendi dahi salgılayabilir. Kansere hücrelerinin diğer bir özelliği ise hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin daha düzensiz olmasıdır. Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalmadan dolayı bu hücrelerde tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla çok azdır. Bu azalma sonucunda kansere hücrelerinin diğer hücre ve doku bileşenleri ile etkileşimleri de azalır

ve kısıtlamalardan kurtularak yayılma ve metastaz yapma yeteneğine kavuşurlar. Hücre-hücre etkileşimi açısından normal hücre ve kanser hücrelerindeki bir diğer fark kontakt inhibisyonudur. Örneğin hücre kültüründe fibroblastlar, kültür kabı içinde komşu hücrelerle temas edinceye kadar hareket ederek temas halinde dururlarken, tümör hücreleri bu temasla durmazlar ve hareket etmeye ve çoğalmaya devam ederler. Oysaki burdaki kontakt etkileşim normal hücreler için sadece hareketi değil aynı zamanda çoğalmayı da sonlandırır. Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleriyle etkileşimini değiştiren ve böylelikle invazyon ve metastaz gibi iki önemli özelliğinin ortaya çıkmasını sağlayan farklılıkları da vardır. Bunlardan ilki kanser hücrelerinin hücre dışı matriks proteinlerini parçalayan protezlar salgılamasıdır. Bu sayede malign hücreler normal komşu doku içerisine girebilir. İkincisi ise malign hücrelerin yeni kan damarlarının oluşumunu (anjiojenez) hızlandıran büyüme faktörlerini salgılayabilmeleridir. Hücre sayısı belli bir yoğunluğa ulaştınca tümörün daha fazla besin ve oksijen ihtiyacı oluşur ve anjiyojenez sonucu oluşan yeni kapillerle beslenerek büyürler. Anjiyojenez aynı zamanda kanser hücrelerinin kolayca girebildiği yeni kılcallar oluşturduğu için tümörden kopan hücrelerin dolaşıma katılarak başka dokularda metastaz yapmasına da sebebiyet verir (72).

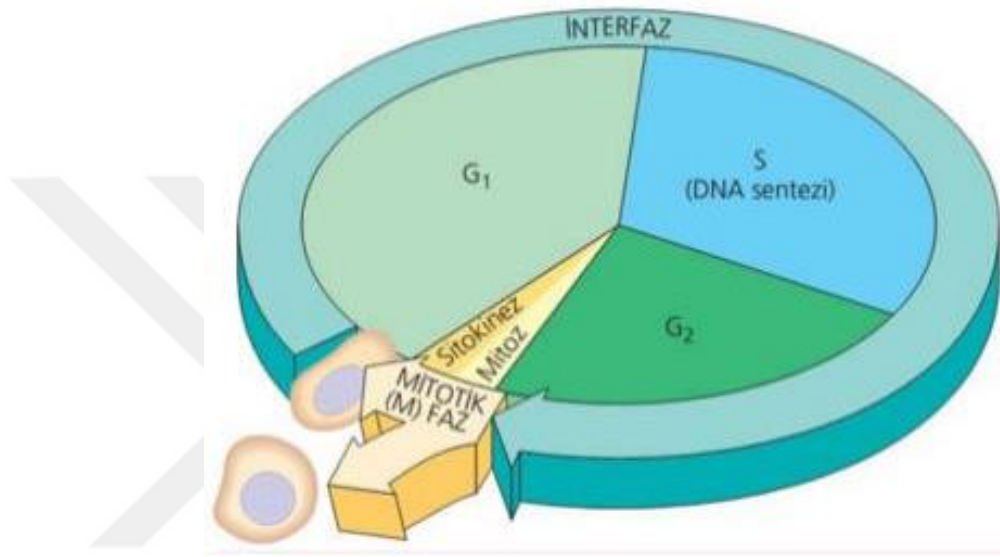
2.9.2. Kanserin Nedenleri

Kanserlerin sebebi ve oluşum mekanizması henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Bilinen ise kanserin bulaşıcı bir hastalık olmadığıdır. Kanser hastalıklarının büyük çoğunluğunun sebebi çevresel faktörler iken bazılarında genetik faktörler ve yine bazı kanserlerde de her iki faktörün birden oluşum üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Başlıca sebepleri ise; iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, hava kirliliği, kimyasal karsinojenler, beslenme faktörleri, sigara, alkol, virüsler ve genetik faktörlerdir. Sonuç olarak kanser tek bir sebebe bağlı değildir. Birçok sebebin etkili olabileceği kompleks bir hastalıktır (70).

2.9.3. Normal Hücre Döngüsü

Hücrelerin normal yaşam siklusu bölünme ve dinlenme evrelerinden oluşmaktadır. G0 olarak adlandırılan dönem dinlenme dönemidir ve bölünme evresine göre çok uzundur. Hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının devam ettirdiği evredir. Bölünme dönemi ise mitoz

evre için hazırlıkların yapıldığı G₁, S ve G₂ evreleri ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M evresinden oluşmaktadır. G₁ fazında DNA replikasyonu için gerekli protein ve RNA'ların sentezi yapılırken; S fazında ise replikasyona başlanacak bölgeler belirlenir ve DNA replike olur, diploit hale gelir; G₂ fazında ise mitoz için son hazırlıklar yapılır. Son olarak M fazı mitoz bölünmenin gerçekleştiği ve iki hücrenin oluştuğu aşamadır (73). Şekil 2.6'da normal hücre bölünme evreleri görülmektedir.



Şekil 2.6. Normal Hücrede Bölünme Evreleri (74)

2.9.4. Karsinojenez

Bu devrelerin başlatılması, zamanlaması ve tamamen hatasız yürütülmesi birçok protein sayesinde kontrol edilir. Hata oluşsa dahi proteinler tarafından bertaraf edilerek sistemin sorunsuz şekilde çalışması sağlanır. Bu kontrol proteinlerinin sentezini düzenleyen genler ise protoonkogenler veya tümör baskılayıcı genlerdir. Normalde protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin aktiviteleri dengelidir. Protoonkogenlerin aktivitesindeki bu dengenin bozulması kanser gelişimine engel olan proteinlerin sentezini de etkileyeceği için kansere neden olabilir. Bu dengeyi çeşitli mutasyonların ve çeşitli sebeplerle DNA zincirinde bozulmaların meydana gelerek bozduğu düşünülmektedir (73). Protoonkogenlerin anormal ekspres ve mutant hallerine ise onkogen denir. Onkogenler ise anormal hücre proliferasyonu ve tümör gelişimine yol açarlar (75). Bir diğer görüş ise epigenetik modifikasyonlar sonucu tümör baskılayıcı genlerin susmasının kansere neden olduğudur (73).

Bu patogenetik evrelerden sonra kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve sürekli bölünebilmesi de hastalığın oluşumunun daha net anlaşılması bakımından şu şekilde açıklanmıştır. Burda devreye telomeraz aktivitesi ve apoptozis olmak üzere iki önemli aşama girmektedir. Telomerler kromozomların uç bölgelerinde bulunur ve her mitozdan sonra kesilerek kısaltılır. Yaşam devam ederek ardarda bölünmeler oldukça bu kromozom kısalır ve sonuçta hücre yaşlanarak ölür. Kanser hücrelerinde ise artan telomeraz enzim aktivitesi neticesinde mitoz sonucu oluşan bu kısalma bir şekilde tamamlanır. Böylelikle bölünme sınırlanamaz hale gelir. Apoptozis ise hücrelerin intiharı veya planlı bir şekilde ölümüdür. Apoptozis bir emniyet subabı gibi normal hücrelerin farklılaşarak bu işleyişe başkaldırmalarını engeller. Normal şartlarda hücre yaşlandıkça DNA hasarı da artar; bu hasarlar DNA hasarına duyarlı Poly ADP riboz polimeraz gibi proteinler vasıtasıyla giderilir. Bu hasarlar ortadan kaldırılamayacak boyutta ise bu defa kaspaz gibi proteinler devreye girerek hücrenin kontrollü bir şekilde ölümünü sağlar. Apoptozisle böylelikle kanser riski oluşturabilecek hücrelerin yok edilmesi sağlanır (73). Yukardaki bilgiler ışığında derleyecek olursak hücrenin normal yaşam siklusunu sağlayan protoonkogenlerin defekti sonucu onkogen oluşumu sonucu veya protoonkogenlerin işlevsizleşmesi sonucu, tümör baskılayıcı genler, DNA hasarını düzeltgen genler ve apoptozisi sağlayan genlerde oluşan defektler sonucu kanser ortaya çıkmaktadır.

2.9.5. Anjiyojenez ve Metastaz

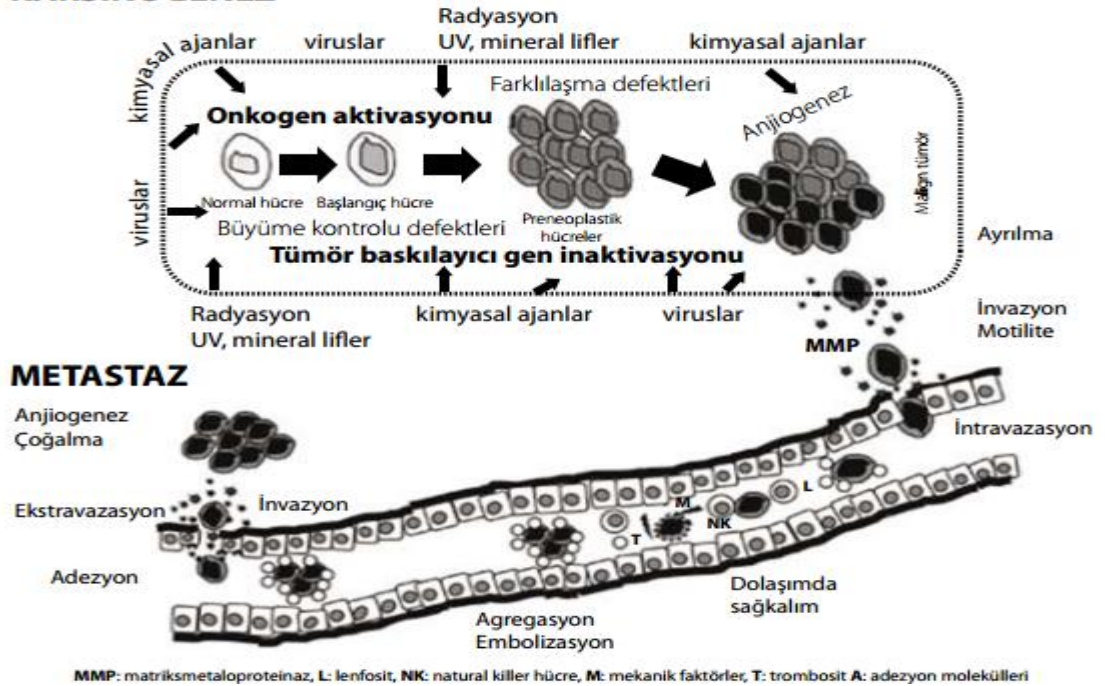
Tümör hücreleri başlangıçta oluştukları dokunun kapillerlerinden beslenirler. Bu beslenme ile 2-3 mm boyuta kadar ulaşan tümör için artık hücre ölümü de artmıştır. Daha fazla çoğalabilmek için yeni bir damar sistemine yani anjiyojeneze ihtiyaç duyar. Anjiyojenez sonucu tümör besine ve oksijene kavuşur hücre ölümü azalarak, tümör büyümeye devam eder ve metastaza yol açabilir (76).

Yeni damar oluşumu ve olgunlaşması pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörlerin dengesiyle gerçekleşir. Anjiyojenez birçok uyarıcı tarafından uyarılmaktadır. Ancak bunların en önemlisi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dir (77).

Büyüyen tümörden belli bir olgunluğa eriştikten sonra bazı malign hücreler koparak, (ayrılma) doku içinde ilerlemeye devam eder (invazyon). Bu malign hücreler, bir

damarla karşılaştıklarında damar duvarını delerek damar içerisine girer ve dolaşıma geçmiş olurlar. Kanla birlikte dolaşımda ilerleyen hücreler hedef organlara ait damarlara ulaştıklarında onları delerek dokuya geçerler ve hedef dokuda çoğalmaya başlarlar. Buna “metastaz” denir. Kanser hücreleri vasküler sistem içerisine girip ilerlerken her dokuda metastaz yapmazlar belli dokulara karşı seçici davranmaktadırlar. Örneğin mide kanseri karaciğere metastaz yaparken, meme kanseri kemik ve akciğere, kemik kanseri ise akciğere metastaz yapmaktadır. Bunu belirleyen faktörler ise kanser hücrelerinin yüzey özellikleri ile organa ait damar yapısı ve organın damar duvarına ait hücrelerinin yüzey özellikleridir. Primer tümörden kopan hücreler ekstraselüler matrikste metalloproteinazlar (MMP), protein kinaz ve lizozomal enzimler salgılayarak ilerleyebilirler (83).

KARSİNOGENEZ



Şekil 2.7. Karsinogenez ve Metastaz (76).

2.9.6. İmmün Denetim, Kanser Hücrelerinin Yok Edilmesi, Apoptozis

İmmün sistemin ilk ve en önemli elemanı lenfositlerdir. Dolaşımda bulunan lökositlerin beşte biri lenfositir. Bu hücreler T, B ve null lenfositler olmak üzere 3'e ayrılır. Antijenik tümör hücrelerini en iyi kontrol eden grup T-lenfositlerdir. Kemik iliğinde üretilen T-lenfositler timusa uğrayarak antijene özgü reseptörler ve yüzey antijenlerini

kazanırlar. Timusa uğrayıp farklılaştıkları için T-lenfosit adını almışlardır. T-lenfositler yüzeylerinde taşıdıkları fonksiyonlarıyla alakalı CD hücreleriyle adlandırılırlar. CD4 ve CD8 olmak üzere ikiye ayrılırlar. T-hücrelerinin antijeni tanınmasında ise T-hücre reseptörü ve CD3 yardımcı molekülü görev alır. T-hücreleri temas ettikleri tümör hücrelerini lizise uğrattır. T-lenfositlerin görev yapabilmesi için daha önceden o tümör hücresi ile karşılaşmaları gerekmektedir. B-lenfositler ise tümöre spesifik antikorlar sentezlerler. Bu şekilde iki yolla tümör hücrelerinde lizis oluştururlar. İlki antikora bağımlı hücrel sitotoksitedir. Burada tümöre spesifik bağlanmış olan antikorlara air serbest Fc kısımlarına, Fc reseptörü taşıyan sitozolitik T-lenfosit, NK (Doğal Öldürücüler) hücreleri, makrofaj ve granüosit bağlanır ve malign hücre lizise uğrattır. İkincisinde ise antikorların tümör hücre yüzeyine kompleman elemanlarını bağlayıp fikse ederek membran yüzeyinde delikler oluşmasına lizise sebep olur. NK hücreleri ise daha önceden tümörle karşılaşmalarına gerek kalmadan tümör hücrelerini doğrudan lizise uğratabilirler. Doğrudan sitotoksik etkilerinin yanısıra interferon, IL-1, IL-2, TNF, NK sitotoksik faktör vb. sitokinler vasıtasıyla da immünite sağlarlar. Makrofajlar bir diğer savunma elemanıdır. Makrofajlar; hücre proliferasyonunu, anjiyojenezi, tümör stroması oluşumunu inhibe ederek ve doğrudan veya dolaylı olarak tümör hücrelerini öldürerek immünite sağlarlar. Yalnız, anjiyojenez ve stromaların yıkılması tümör kitlesinin büyümesine ve metastaza da sebebiyet verebilir. Salgıladıkları IL-2 ve gamma-interferon vb. maddeler aracılığıyla tümör hücrelerini yok ederler. Yine ters etki olarak TNF, IL-1 ve prostaglandinler aracılı tümör gelişmesi ve metastaz sürecini hızlandırabilirler. Bir diğer grup ise dendritik hücrelerdir. Potansiyel antijen sunuculardır. T-lenfositlere yakın lokalizasyonlarda ölmekte olan tümör hücrelerinin antijenlerini işaretleyerek T-hücelere sunarlar. Onları aktif hale getirirler. LAK hücreleri immünite de görev alan bir diğer gruptur. Özellikleri ise IL-2 ile inkübe edildiklerinde tümör hücrelerinde sitotoksikite oluşturmalarıdır. TIL (Tümörü infiltre eden lenfositler) hücreleri genellikle lenfosit ve makrofajlardan oluşur. LAK hücrelerine göre en önemli avantajları ise IL-2 ile inkübasyonda 50-100 kat daha sitotoksik olmalarıdır. Özellikle metastatik lezyonlarda rastlanılır. Bu hücrel yapıların haricinde tümörün çevresinde ortaya çıkan ve immün sistem hücreleri tarafından salgılanan ve immün cevapta rol oynayan proteinlerden oluşan sitokinlerin önemli görevlerinden biri de immünitedir. Sitokinler aynı zamanda tümör patojenezinde de rol alabilirler.

Sitokinlerin bir kısmının inhibisyonu bir kısmınınsa aktivasyonu sitotoksik etkiler sağlamaktadır (78).

İmmün sistem bu malign hücrelere karşı iki çeşit cevap verir. Bunlar doğal ve edinsel immünite olarak ikiye ayrılır. Tümör hücresi antijenlerine karşı vücutta bir sinyal oluşturduğu zaman NK-hücreleri hızlı bir cevap olarak, interferon- γ gibi (makrofajları, dendritik hücreleri toplayan ve aktiveleştiren kemokinlerin oluşumunu sağlayan özelliktedir) proinflamatuvar sitokinler salgırlar (doğal bağışıklık). Bölgeye gelen makrofajlar tümör hücrelerini lizozomal enzimler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit aracılığıyla direkt olarak öldürürler. Dendritik hücreler ise tümör parçacıkları ve proteinlerini lenf nodlarının drenajına taşırlar ve CD4 ve CD8 T-hücrelerine sunarlar, böylelikle edinsel bağışıklığı başlatırlar. Aktif hale geçen CD4 ve CD8 hücreleri tümörün bulunduğu yere giderek sitotoksik granüller salırlar (79).

Organizmanın tümör hücrelerine karşı cevap verdiği bir diğeryol ise apoptozis yani programlı hücre ölümdür.

Fakat apoptozis yalnızca kanser hücrelerine karşı verilmiş bir cevap değildir. Normal hücre yenilenmesi, organizma gelişimi, bağışıklık sistemi işleyişi, embriyo gelişimi vb. faaliyetlerde de apoptozis etkindir. Apoptozis; hücrede ölüm sinyallerinin alımıyla başlar, kaspazlar aktive olur akabinde hücre ölümü gerçekleşerek hücre parçalanır ve fagositoz sağlanır. Apoptozisin regülasyonunda ise kalsiyum, seramid, Bel-2 gen ailesi gibi moleküller, kaspazlar, p53 ve mitokondri gibi organeller vb. birçok yapı ve moleköl önemli görev almaktadır (80).

2.9.7. Dünyadaki ve Ülkemizdeki Kanser Vakaları

Türkiye’de 2015 yılı TÜİK verilerine göre nedeni tespit edilen 65 yaş altındaki ölümlerin %29’ u kanser nedeniyle gerçekleşirken, 65 yaş ve üstü ölümlerde kanserin oranı %16 ile ikinci sıraya düşmektedir. Bu yaş grubunda %46 ile dolaşım sistemi sorunlarından kaynaklı ölümler ilk sırayı almaktadır.

Avrupa Birliği’nin (AB) güncel verisi olan 2013 yılı sonuçları incelendiğinde, Avrupa’daki her dört ölümden birinin kanserden kaynaklandığı görölmektedir.

Tüm dünyada en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserlerdir. En çok mortaliteye yol açan kanserler ise akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanseridir (81).

2000'li yılların başında dünyada yılda 6 milyon kişi kansere yakalanırken 20 yıl içerisinde bu sayının ikiye katlanarak 12 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. 2030 yılı öngörülürü ise; o yıl içerisinde 24 milyon insanın kansere yakalanacağı, aynı yıl içerisinde kansere bağlı sebeplerle 17 milyon insanın kaybedileceği ve 75 milyon insanın ise kanser hastası olarak yaşıyor olacaktır (9).

2.9.8. Kanser Tedavi Yöntemleri

-Cerrahi

Eski zamanlardan beri uygulanmaktadır. Kanserden iyileşen hastaların büyük kısmında ilk tedavi olarak yerini korumaktadır. Tanısal, önleyici, küratif ve palyatif olarak uygulanabilmektedir. Tek başına yeterli olmadığı durumlarda diğer yöntemlerle kombine edilmelidir (70).

-Radyoterapi

X-ışınları, gamma ışınları veya elektronlar gibi iyonize ışınların tümör hücrelerinin tahrip etmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Cerrahi gibi radikal veya palyatif amaçla kullanılmaktadır. Kanser türüne göre seçilecek ışın özel aletler aracılığıyla hastalara uygulanmaktadır (70).

-Kemoterapi

Tümörlü hücrelerin yok edilebilmesi için kemoterapötik ilaçların kullanılması işlemidir. Kemoterapi de tek başına ve diğer yöntemlerle kombine kullanılabilir. Kemoterapi tedavileri uzun süreli ve zahmetlidir. Hastalar özellikle bu tedavinin yan etkilerinden yakınmaktadır. Kemoterapi günümüzde çok yaygın kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan 50'yi aşkın kemoterapötik ajan vardır (70).

-Diğer Tedavi Yöntemleri

a-) İmmünoterapi: Vücudun bağışıklık sisteminin bir şekilde uyarılmasının tedaviye katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla BCG aşısı gibi bağışıklık uyarıcılar, interlökin ve interferonlar kullanılmaktadır. Klinik uygulamalar noktasında daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (70).

b-) Hormon tedavisi: Meme ve prostat kanseri gibi hormonlara bağlı gelişen tümörlerde hormonların tedavi maksadıyla kullanılmasıdır (70).

c-) Lazer tedavisi: Kullanımı kısıtlı olmakla birlikte bazı beyin ve gırtlak tümörlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca cerrahi rezeksiyonlarda lazer kullanımının avantajlı olduğu durumlar vardır (70).

d-) Tamamlayıcı ve alternatif tedavi: Konvansiyonel tıbbın bir parçası olarak kabul görmeyen çoğunlukla hastaların tercihlerine bağlı olarak tıbbi tedaviye destek amaçlı, tıbbi tedaviyle birlikte, tıbbi tedavi yerine, kanserin tekrarlamasını önleme amaçlı veya son çare olarak kullandıkları diğer yöntemlerdir (82).

2.10. Mantarlardan İzole Edilen Antikanser ve İmmunomodülatör Etkili Maddeler ve Polisakkaritler

Mantarlar sahip oldukları besleyici ve tıbbi özelliklerinden dolayı bileşimlerinde bulunan etkin maddelerin tespit ve izole edilmesiyle kanser de dahil birçok hastalığın tedavisinde ve hastalıktan korunmada kullanılmaktadırlar (8). Kanserden her yıl çok sayıda insan hayatını kaybetmektedir. Modern tıbbi kanser tedavisi belli bir çerçeveye oturtulmuş olmasına rağmen çeşitli kanserlerin moleküler davranışlarının tam anlamıyla anlaşılabilmesi, hali hazırdaki tedavilerin olası yan etkileri hala sorun teşkil etmektedir. Bu bağlamda biyolojik olarak kanser hastalığına karşı immünoterapötik etkiler gösteren doğal bileşikler popüler hale gelmiştir. Tıbbi mantarlardan izole edilen birçok madde bu özellikleri göstermekte, araştırılmakta ve gelecek için çalışmalar devam etmektedir (83). Mantarlardan elde edilen bu etkin bileşikler yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı olmak üzere iki grupta toplanmıştır (Tablo 2.10).

Tablo 2.10. Mantarlardan elde edilen antikanser etkili bileşiklere ait ana gruplar (84).

Düşük molekül ağırlıklı bileşikler	Yüksek molekül ağırlıklı bileşikler
Kinonlar	Homoglukanlar
Serebrosidler	Heteroglukanlar
İzoflavonlar	Glikanlar
Kateşoller	Glikoproteinler
Aminler	Glikopeptidler
Triaçilgliseroller	Proteoglikanlar
Seskiterpenler	Proteinler
Steroidler	RNA-protein kompleksleri
Organik germanyum	
Selenyum	

Çalışmamız için incelenen ve önem arz eden kısım ise polisakkaritlerdir. Polisakkaritler mantarlardan elde edilen yüksek molekül ağırlıklı bileşikler sınıfında bulunmakta ve bu sınıftaki homo ve heteroglukanlar, homo ve heteroglikanlar, glikoproteinler, glikopeptidler ve proteoglikanlar polisakkaritleri ve polisakkaritlerin başka madde grupları (protein, peptit vb.) ile oluşturduğu kompleksleri temsil eden başlıklardır (83).

2.11. Fungal (Mantar Kökenli) Polisakkaritler

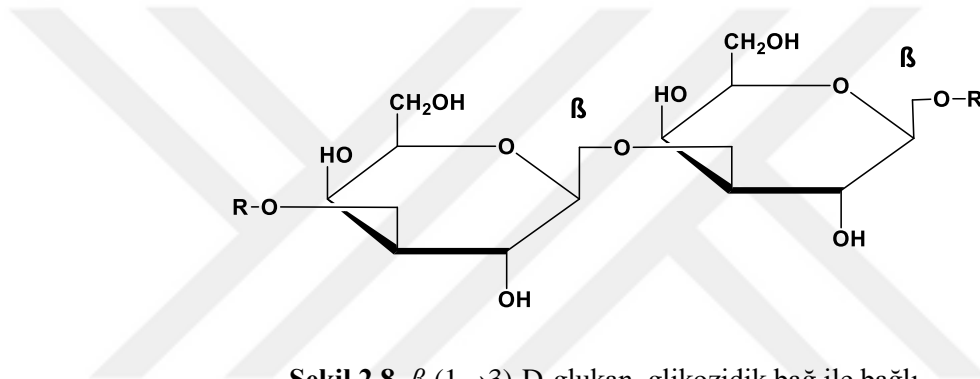
2.11.1. Fungal Polisakkaritler ve Genel Tanımı

Fungal polisakkaritler; mantarın hücre duvarı yapısında bulunan, mantarda enerji deposu ve ekstraselüler hücre korunması gibi görevleri yerine getiren polimerik yapıdaki şeker türevleridir (85).

Kimyasal bağlanma şekli ve moleküler farklılıklarıyla bu polisakkaritler; β -glukanlar, hetero- β -glukanlar, glikanlar ve heteroglikanlar olarak çeşitlilik gösterir. Glukanlar yalnızca D-glukoz alt birimlerinden oluşur; heteroglukanlarda ise ana iskelet D-glukoz iken yan zincir glukoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, fukoz, riboz ve glukuronik asit gibi monosakkaritlerden oluşabilmektedir. Glikanlarda, ana iskelet ve yan iskeletler glukoz harici tek tip monosakkaritten oluşmakta ve oluştuğu şeker türüne göre galaktan, mannan, ksilan, fukan gibi adlandırılmaktadır. Heteroglikanlar ise yan iskelet ana

iskeletten farklı şeker türlerinden oluşur (83). Şekil 2.8’de β -glukan kimyasal yapısı görülmektedir.

Polisakkaritlerin yapısı ve etkinliği; monosakkarit konfigürasyon ve kompozisyonundan, glikozidik bağların pozisyonundan, monosakkaritlerin sırası ve karbonhidrat içermeyen grupların türü, sayısı ve lokasyonundan etkilenmektedir. Ayrıca bu şekerlerin proteinlerle kompleks yaptığı; glikoproteinler, heteroglikan-protein kompleksleri, glikopeptidler ve proteoglikanlar bu etkileri gösteren polisakkarit içeren mantar kaynaklı etkin bileşiklerdir. Bu bileşiklerin yalın polisakkaritlerden daha etkin oldukları görülmüştür (83).



Şekil 2.8. β -(1→3)-D-glukan, glikozidik bağ ile bağlı.

2.11.2. Fungal Polisakkaritlerin Antikanser Etki Mekanizması

Mantar polisakkaritleri antikanser etkilerini 3 yolla göstermektedirler:

- Kanserden koruyucu etki: Bu polisakkaritlerin oral alımı sonrasında kanser oluşumunu önlemesi,
- Bağışıklık artırıcı etki: Tümörlere karşı bağışıklığın artırılması yoluyla,
- Doğrudan etki: Apoptozisi indükleyerek, tümör hücrelerin çoğalmasını engelleyerek veya anjiyogenezi önleyerek antikanser etkinlik gösterirler (36, 86, 87).

-Kanserden Koruyucu Etki

Mantar polisakkaritlerinin kanserden koruyucu etkinlik gösterdiği ilk olarak *Hypsizyguus marmoreus* H.E. Bigelow. mantarı ile yapılan çalışmayla bulunmuştur. Çalışma sonucunda bu etkiyi immün sistemi güçlendirerek gösterdiği tespit edilmiştir. Japonya'da *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, Brezilya'da *Agaricus blazei* Murril üretiminde çalışan çiftçilerde bu mantarlara ait polisakkaritlerin koruyucu etkileri gözlemlenmiştir. Çiftçilerde kanserden ölüm oranının normal popülasyona göre %40 daha az olduğu tespit edilmiş, akabinde her iki mantar türüyle hayvan deneyleri yapılmıştır. Deneylerde farelere tümör hücreleri aşılanmış ve diyetlerine bu iki mantara ait polisakkaritler eklenmiştir. Belli süre sonunda diyetlerine bu polisakkaritlerin dahil olduğu farelerde tümörlerin azaldığı tespit edilmiştir (88).

-Bağışıklık artırıcı etki

Kanser hücrelerine karşı dolaylı bir etki söz konusudur. Polisakkaritler temel olarak immün sisteme ait hücreler olan T ve B-lenfositler, sitotoksik T-lenfositler ve NK hücreleri üzerinden etkinlik gösterir. Bu hücrelerin TNF- α , IFN- γ ve IL-1 β gibi sitokinler salmasını sağlarlar. Bu salınan sitokinler ise tümör hücrelerinde apoptozise ve farklılaşmaya yol açarak antiproliferatif etki gösterir. Aynı zamanda sitokinler reaktif azot, oksijen araçları ve interlökinleri de salgırlar. Bir polisakkarit grubu olan β -glukanlar, immün sistem hücrelerini makrofajlarda bulunan Dectin-1 ve makrofaj, nötrofil ve NK hücreleri üzerinde bulunan CR3 reseptörleriyle birleşerek tümörlere karşı aktif hale getirirler (87).

Doğrudan etki: Bcl-2 gen ailesi apoptozisi düzenleyen birçok proteini kodlar. Bu gen ailesinin alt gruplarından Bcl-2, Bcl-xL ve Bcl-w anti-apoptotik etkiler, Bax, Bad, Bak, Bik ve Bid ise pro-apoptotik etkiler göstermektedir. Bax, apoptotik süreçte oligodimerlerin oluşmasında anahtar bir rol üstlenmektedir. *Cordyceps militaris* L. (Fr.) kaynaklı polisakkaritler A-549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağımlı olarak Bax miktarında artışa ve Bcl-2 miktarında düşüşe neden olarak apoptozise yol açmıştır. Yapılan birçok çalışmayla Maitake mantarının MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát polisakkaritleri ise HT-29 kolon kanseri hücre hattında ve melanoma hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro*

kaspaz-3'ü up- regüle ederek apoptozisi indüklemiştir. Benzer şekilde şizofilan polisakkaritinin, tamoxifen kemoterapötöği alan deneysel olarak kanser hastası edilmiş, hepatoselüler karsinomali farelerde, kaspaz-3 proteinini indükleyerek apoptozise yol açtığı gösterilmiştir. *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél.' den elde edilen suda çözünebilen β -glukan türevinin farelerde m-RNA Bcl-2 düzeyini düşürerek ve m-RNA Bax düzeyini yükselterek Sarkoma 180 tümörünü apoptozise sürüklediği düşünülmektedir (87).

Hücrenin proliferasyonu sağlayan hücre siklusunda, siklustaki bazı basamakların sonlanmasıyla proliferasyon durur. Bazı polisakkaritler bu şekilde etkinlik gösterir. Örneğin; grifolin polisakkariti, ERK1/2 ve ERK5 yollarını kısıtlayarak hücre siklusunu G1-fazında durdurarak çoğalmayı sonlandırır. Şizofilan polisakkariti ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, Y15 fosforilasyonunu artırarak CDK-1 (siklin bağımlı kinaz-1)'i inaktif hale getirir. Böylelikle siklusun G2/M basamağında yığılma oluşmasını indükleyerek proliferasyonu durdurur, ayrıca apoptozisi indükleyen p53'ünde birikmesini artırarak antikanser etkinlik gösterir. *Coriolus versicolor* (L.) Quél.'den elde edilen polisakkaritler ise tümör hücrelerini mitozun G0/G1 fazını durdurarak antiprolifere etmiştir (87).

Birçok kanser türünde transkripsiyon faktörlerinin aşırı aktif olduğu görülmektedir. Aktif NF- κ B'ler, hücre proliferasyonunu artıran, apoptozisi inhibe eden, anjiyogenez ve metastazı artıran gen transkripsiyonunu artırarak tümör hücrelerinin büyümesini sağlarlar. Yapılan birçok çalışmayla polisakkaritlerin NF- κ B inhibitörlerinin fosforilasyonunu ve bozunmasını inhibe ederek NF- κ B aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd.'dan elde edilen PSP isimli protein-polisakkarit kompleksinin, HL-60 lösemi hücrelerinde NF- κ B faktörlerinin düzeyini düşürdüğü ve ERK kinaz düzeyini de düşürerek antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır (36).

Ayrıca polisakkaritler çeşitli yollar vasıtasıyla anjiyogenez de inhibe etmekte ve böylelikle tümörün yayılımını engellemektedirler (87).

2.11.3. Klinikte Kullanılan Fungal Polisakkaritler

Her üçü de polisakkarit kökenli olan bu ilaçlar Japonya'da kanser ilacı olarak klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu ilaçlar;

1. PSK veya krestin olarak adlandırılan ilaç, Kawarate (*Coriolus versicolor*) mantarından elde edilmektedir. 1970'lerin sonunda geliştirilen ilaç Japonya'da oldukça popüler bir kanser ilacıdır. Mide ve diğer kanser türlerinin tedavisinde oral yolla kullanılmaktadır.
2. Shiitake (*Lentinus edodes*) mantarından elde edilen lentinan, mide kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. 1980 yılında onaylanan ilaç, oral emilimi düşük olduğu için enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır.
3. Şizofilan ise Suehirotake (*Schizophyllum communune*) mantarından elde edilmiş bir ilaçtır. Boğaz kanseri tedavisinde enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Deney Materyali

Deneysel çalışmalarda kullanılan *T. anaticum* mantarı 2013 yılında Adana İli Feka İlçesi'nden, mantarın olgunlaşma ayları olan Ekim-Kasım aylarında toplatılmıştır. Mantarın teşhisi Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yaptırılmıştır. Tüm mantar fruktifikasyonları bıçakla ince dilimlenerek açık havada, gölgede kurutulmuş ve ardından öğütücüde toz haline getirilerek deneylerde kullanılmıştır. Şekil 3.1'de deney materyali görülmektedir.



Şekil 3.1. Deney materyali olan *T. anaticum* mantarının fruktifikasyon yapıları.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ve MALDI-QIT-TOF Spektrometri analizlerinde analitik kalitede çözücüler ve standart maddeler kullanılmıştır. Tüm deneyleerde kullanılan su deiyonize su ve distile sudur.

3.1.3. Kullanılan Aletler

- Ayarlanabilir otomatik tekli ve çoklu pipetler (Eppendorf)
- Buzdolabı (+4°C, -20°C ve -80°C derin dondurucu)
- Çalkalamalı su banyosu (Nüve ST 402)
- Hücre sayım cihazı (Roche Innovatis Cedex Xs)
- Işık mikroskobu (Optech Inverted Microscope)
- Karbondioksitli etüv (New Brunswick Galaxy 170R)
- Liyofilizatör (Labconco Freezone 4.5)
- MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometresi (Shimadzu AXIMA Resonance)
- Mikrolaka okuyucu (Biotek Synergy HT)
- Otoklav (Hirayama)
- pH metre (Inolab pH 720 WTW)
- Rotavapor (Ilmvac vakum pompası, Heidolph Laborat 4000 efficient)
- Santrifüj cihazı (Thermo scientific SL 16R, Hettich mikro 200R)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- Steril laminar kabin (Safe Fast Elite)
- Ultrasonik banyo (Elma S 100H Elmasonic)

- Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)
- Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı (Agilent Technologies 1200 Series)

3.2. Deneysel Çalışma

Bu bölümde *T. anatolicum* tüm fruktifikasyonları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri, elde edilen ekstrelerde miktar tayini, fraksiyonlama çalışmaları, antioksidan deneyleri, sitotoksisite deneyleri ve yapı tayinine yönelik çalışmalar verilmektedir.

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

a-) Etanol Ekstresi

Daha öncesinde ince dilimlenerek kurutulmuş mantarlar öğütücüde ince toz haline getirildikten sonra çalkalamalı su banyosunda 37 °C’de çözücü olarak %85’lik etanol kullanılarak 3’er saat süreyle 3 kez masere edildi. Her seferinde süpernatant kısmı süzülerek alındı ve ayrı bir kaptaki birleştirildi. Birleştirilen süpernatant vakum altında rotavaporda etanol tamamen buharlaşana kadar yoğunlaştırıldı. Elde edilen ekstre darası alınmış bir behere alınarak -20 °C’de dondurulduktan sonra liyofilize edildi (57). Bu ekstre kısaca “EE” olarak isimlendirilmiştir.

b-) Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi

Kurutulmuş mantar örnekleri öğütücüde ince toz haline getirildikten sonra rotavaporda 100 °C’de çözücü olarak distile su kullanılarak 3’er saat süreyle 3 kez ekstre edildi. Her seferinde süpernatant kısmı süzülerek alındı ve ayrı bir kaptaki birleştirildi. Birleştirilen süpernatant 4000 rpm’de 30 dk. santrifüj edildi. Pellet kısmı uzaklaştırılarak süpernatant kısmı toplandı. Süpernatant vakumda rotavaporda bir miktar konsantre edildi (39).

- Sevag Metodu ile Deproteinizasyon

Elde edilen süpernatant 100 mL’sine 20 mL kloroform ve 4 mL *n*-bütanol eklenerek ayırma hunisinde 20 dk. dikkatlice muamele edildi. Denatüre proteinler su fazıyla ayırım yüzeyinde gözlemlendi. Kloroform ve *n*-bütanol fazı ayrılarak su fazına aynı işlem tekrar uygulandı. Toplamda üç kez uygulanan bu işlem sonucunda su fazı ayrı bir kaba

alınarak ileri işlemlere geçildi (89).

Sevag yöntemiyle deproteinizasyonun ardından elde edilen su fazına hacminin beş katı oranında absöü etanol eklenerek 12 saat 4 °C'de bekletildi. 12 saat sonrasında polisakkaritlerin beher dibinde yoğun bir çökelti oluşturduğu gözlemlendi. Bu çökelti kısmı 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek toplandı. Darası alınmış saat camı üzerinde biriktirilen çökelti 40 °C'de etüvde kurutulmaya bırakıldı. Elde edilen ekstre tartılarak saklandı (39). Bu ekstre kısaca "PS" olarak isimlendirilmiştir.

c-) Ultrasonik Etkiyle Elde Edilen Polisakkaritçe Zengin Su Ekstresi

Kurutulmuş mantar örnekleri öğütücüde ince toz haline getirildikten sonra rotavaporda 37 °C'de çözücü olarak etanol kullanılarak 24 saat süreyle ekstre edildi. Ekstraksiyon ardından süpernatant kısmı süzülerek atıldı. Çökelti 45 °C'de etüvde bir saat kurutuldu. Çökelti üzerine 28 katı distile su eklenerek 17 dk ultrasonik banyoda ekstre edildi. Çözelti 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Çökelti atılarak süpernatant biriktirildi. Süpernatanta 4 katı hacminde absöü etanol eklenerek 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda beherin dibinde çöken polisakkaritler gözlemlendi. Bu çökelti kısmı 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek pellet toplandı. Pellet sırasıyla etanol, aseton, ve eter ile yıkanarak 40 °C'de etüvde bir saat kurutuldu (90).

- TCA (Trikloroasetik asit) ve Sevag Metoduyla Deproteinizasyon

- TCA (Trikloroasetik asit) Metodu

Pellet üzerine 50 mL distile su ve buz banyosunda 4 g trikloroasetik asit ilave edildi ve ardından 4 °C'de 4 saat beklemeye bırakıldı (91). Dört saat sonra çözelti 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi ve pellet atılarak süpernatant kısmı NaOH ile nötral (pH=7) pH'ya getirildi.

- Sevag Metodu

Nötralizasyon işleminden elde edilen süpernatant 100 mL'sine 20 mL kloroform ve 4 mL *n*-butanol eklenerek ayırma hunisinde 20 dk dikkatlice muamele edildi. Denatüre proteinler su fazıyla ayırım yüzeyinde gözlemlendi. Kloroform ve *n*-bütanol fazı ayrılarak su fazına aynı işlem tekrar uygulandı. Toplamda iki kez uygulanan bu işlem sonucunda su fazı ayrı bir kaba alındı (89).

Sevag yöntemiyle deproteinizasyonun ardından elde edilen su fazına hacminin 4 katı oranında absolü etanol eklenerek 24 saat 4 °C'de bekletildi. 24 saat sonrasında polisakkaritlerin beher dibinde yoğun bir çökelti oluşturduğu gözlemlendi. Bu çökelti kısmı 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek toplandı. Distile suda çözülerek -20 °C'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi (39). Bu ekstre kısaca "PSU" olarak isimlendirilmiştir.

3.2.2. Kompozisyon Analizleri

Mantardan elde edilen ekstreler, antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik bileşikler, antikanser etkiden sorumlu polisakkaritler ve proteinler bakımından spektrofotometrik ve kromatografik olarak incelendi.

a-) Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı, gallik asite eşdeğer olarak Folin- Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (92).

6 mL distile su içeren 10 mL ölçekli kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin- Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 2 saat 25 °C'de inkübe edildikten sonra absorpsiyon 760 nm'de ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi (93).

b-) Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerde bulunan toplam flavonoit miktar tayinleri, Zhishen ve ark.'nın çalışmalarında kullandıkları yöntem referans alınarak yapıldı (94).

Buna göre 1 mL ekstre, 4 ml distile su ve 0,3 mL %5'lik NaNO_2 (50 g/L) ile karıştırıldı. 5 dk. sonra 0,3 mL %10'luk alüminyum triklorit (100 g/L) eklendi. 6. dakikada 2 mL 1 M NaOH (40 g/L) eklenip, toplam hacim su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözeltilerin absorbansları 510 nm'de ölçüldü. Ekstrenin içerdiği toplam flavonoit miktarı, kateşin kalibrasyon eğrisi kullanılarak, kateşine eşdeğer olarak ($\text{mg}_{\text{CE/gekstre}}$) hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı (93).

c-) Toplam Flavonol Miktar Tayini

Ekstrelerde bulunan toplam flavonol miktar tayinleri rutine eşdeğer, (RE) $\text{mg}_{\text{RE/gekstre}}$ olarak hesaplandı (95).

2 mL ekstre (10g/L), 2 mL etanolik alüminyum triklorit (20 g/ L) ve 6 mL sodyum asetat (50 g/L) karıştırıldıktan sonra 20 °C de 2.5 saat bekletildi ve 440 nm'de ölçüm yapıldı. Aynı işlemler kalibrasyon eğrisi hazırlamak üzere 0,5-0,015 mg/mL konsantrasyonlardaki etanolik rutin çözeltileri ile gerçekleştirildi. Bütün ölçümler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı (93).

d-) Toplam Şeker Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam şeker miktarı D (+) Glukoz'a eşdeğer olarak ve Fenol-sülfürik asit metodu kullanılarak ölçülmüştür (96).

Distile suda çözünen örnekler ve standart değişen konsantrasyonlarda 1'er mL deney tüpüne kondu. Üzerine %5 fenol çözeltisinden (suda) 1 mL ilave edildi. Ardından karışım üzerine 2.5 mL konsantre sülfürik-asit ilave edildi. Tüpler çalkalamalı su banyosunda oda ısısında 20 dk bekletildi, ardından küvetlere yerleştirilerek 490 nm'de absorbansları okundu. Glukoz standartı için kalibrasyon eğrisi çizilerek örnekler ile karşılaştırıldı. Toplam şeker, D (+) Glukoza eşdeğer hesaplandı. Deneyler üç paralel çalışılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

e-) Toplam Protein Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam protein miktarı sığır serum albüminine eşdeğer ve Lowry metodu kullanılarak ölçülmüştür (97).

Örnek ve standart tüplerine değişen konsantrasyonlarda 1 mL protein çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 mL saf su kondu. Tüm tüplere 3 mL C reaktifi eklendi. (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşturulur. A reaktifi (%2 Na₂CO₃ 0.1 N NaOH içerisinde çözünmüş); B reaktifi ise %0,5 CuSO₄ %1'lik Na-K tartaratta çözünmüş) Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Tüm tüplere 300 µL Folin-Fenol reaktifi vorteksenerek eklendi. Oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi. Absorbanslar 660 nm'de köre karşı okundu. Protein miktarları oluşturulan sığır serum albüminine ait kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplandı. Tüm analizler üç paralel çalışıldı ve ortalama değerler verildi.

3.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

a-) İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

Ekstrelerin demir (III)'ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu (1986) yöntemine göre yapıldı (98).

1 mL ekstre çözeltisi 2.5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum heksasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırıldı. 50 °C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2,5 mL %10'luk trikloro-asetik asit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, 2,5 mL üst kısım 2,5 mL su ve 0,5 mL %0.1'lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okundu. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Ekstrelerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi. Tüm analizler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler olarak verildi (93).

b-) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın metoduna göre yapıldı (99).

Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) içerisinde hazırlanmış, 50 µL ekstre çözeltisi 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) ve 1 mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak BHA, BHT, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm' de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot Versiyon 12.0) hesaplandı. Değerler üç paralel çalışıldı ve deneyin ortalaması olarak verildi (93).

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Ab_{\text{kontrol}} - Ab_{\text{sömek}}) / Ab_{\text{kontrol}}] \times 100$$

c-) 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS⁺•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin ABTS⁺• radikalini süpürücü etkisi Re ve ark.'nın yöntemi referans alınarak yapıldı (100).

ABTS⁺• radikali (7 mM) ABTS⁺•'in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2,45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0.700 (±0.030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltisi (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA, askorbik asit, rozmarinik asit ve gallik asit kullanıldı. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot Versiyon 12.0) hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı (93).

d-) Askorbat–Fe (III)-Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

Ekstrelerin hidroksil radikalini süpürücü etkisi Aruoma ve ark. yöntemine göre yapıldı (101).

Sığır beyin ekstresi (Bovine brain extract,) 10 mM PBS (pH 7,4) ile karıştırıldı ve buz banyosu içerisinde şeffaf bir süspansiyon oluncaya kadar (5 mg/ mL fosfolipit lipozomu) ultrasonik banyoda bekletildi. 0,2 mL lipozom, 0,5 mL PBS tamponu, 0,1 mL 1 mM FeCl₃ ve 0,1 mL ekstre çözeltisi karıştırıldı. Peroksidasyon reaksiyonunu hızlandırmak için 0,1 mL 1 mM askorbat çözeltisi ilave edildi. Karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 µL %2’lik (a/h) butillenmiş hidroksi toluen (etanol içerisinde), 1 mL %2,8 (a/h) trikloroasetik asit ve 1 mL %1 (a/h) 2-tiyobarbitürik asit (TBA, 0,05 M NaOH içerisinde) ilave edildi. Karışım 100 °C’de su banyosunda 20 dakika ısıtıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan (TBA)₂-MDA kromojenleri 2 mL *n*-bütanolle ekstre edildi. Bütanol fazlarının absorbansı 532 nm’de ölçüldü. Standart olarak BHA ve BHT kullanılmıştır. Deneyler üç paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı (102). İnhibisyon yüzde hesabı:

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Ab_{Skontrol} - Ab_{Sörnek}) / Ab_{Skontrol}] \times 100$$

e-) Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali İle Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozulması

Deney Halliwell ve ark. yöntemine göre yapıldı (103).

100 µL ekstre çözeltisi, 500 µL 5,6 mM 2-deoksiriboz (50 mM KH₂PO₄-NaOH tampon, Ph 7,4 içerisinde), 200 µL önceden karıştırılmış 100 µL FeCl₃ ve 104 mM EDTA (1:1, h/h) çözeltisi, 100 µL 1,0 mM H₂O₂ ve 100 µL 1,0 mM sulu askorbik asit çözeltileri ile karıştırıldı. Karışım vortekslenip 50 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı, ardından 1 mL %2,8 trikloroasetik asit ve 1 mL %1,0 tiyobarbitürik asit eklenerek karışım tekrar 50 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Oluşan oksidasyon 532 nm’de ölçüldü. İnhibisyon yüzdesi kontrolün absorbansı (A_k) ve örnek absorbansı (A_ö) kullanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı. Deneyler üç paralel yapıldı, ortalama değerler kullanıldı (93).

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_k - A_{\delta}) / A_k] \times 100$$

3.2.4. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su (PS) Ekstresi Üzerinde Fraksiyonlama Çalışmaları

a-) Açık Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlama

Çalışmamızda fraksiyonlama amacıyla Sephadex LH-20'nin dolgu materyali olarak kullanıldığı açık kolon kromatografisi (AKK) yönteminden yararlanıldı.

Bu yöntemin çalışma prensibi jel filtrasyondur (moleküler eleme). Ayırma, örnek bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük molekül ağırlıklı bileşenler, kolonda uzun süre kalırken, büyük molekül ağırlıklı daha kısa süre kalırlar. Literatürde polisakkaritlerin fraksiyonlanması için kullanılan yöntemlerden biri jel filtrasyondur (104). Fraksiyonlandırma işlemi, jel filtrasyon tekniği sebebiyle literatürdeki yöntemle benzerdir ancak kullanılan kolon dolgu maddesi farklılık göstermektedir.

Kolona basit vakum pompası entegre edilerek fraksiyonlama hızlandırıldı. Fraksiyonlar 2.5 mL hacimde toplandı. Kontrolleri YBSK'de RID dedektör ile yapıldı. Fraksiyonlama işleminde kullanılan ham sıcak su ekstresine ait YBSK kromatogramındaki piklerin ayrımı sağlanacak şekilde çalışıldı. Bu ayrımı sağlayan fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırıldı. İleri sitotoksisite deneyleri için liyofilize edildi. Kromatografide kullanılan çözücüler, distile su ve analitik kalitede çözücülerdir.

- Kolonun Hazırlanması

Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi (SFK)

İstenilen miktarda tartılan Sephadex LH-20, yeterli miktarda metanol ile jel kıvamına gelmesi için manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bekletildi. Karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan 25×450 mm cam kolona dolduruldu ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan metanol geçirildi. Daha sonra kolon elüsyona başlanacak çözücüyle şartlandırıldı. Adsorbanın üzerinde 1- 2 mm çözücü bırakıldı.

Sistem Özellikleri

Dolgu materyali : Sephadex LH-20 (Sigma, 25-100 µm)

Kolon boyutu : 25×450 mm

Solvan sistemi : 1-) H₂O-MeOH (100:0) 700 mL

2-) H₂O-MeOH (97:3) 200 mL

3-) H₂O-MeOH (50:50) 200 mL

4-) H₂O-MeOH (30:70) 200 mL

5-) H₂O-MeOH (0:100) 250 mL

Pompa : Vakum pompası

Fraksiyon hacmi : 10 mL

Tüp sayısı : 155 adet

- Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

10 mg polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) tartıldı. Yeterli miktarda 1/1 metanol-su karışımı içinde tamamı çözüldükten sonra, bir pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edildi. Kolon musluğu bir miktar açılarak numune adsorbana emdirildi. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirildi ve kolona yeterli miktarda çözücü sistemi eklendi. Kolon musluğu ve ardından vakum pompası çalıştırılarak elüsyona başlandı.

- Elüsyon Aşaması ve Sonlandırılması

Hareketli faz olarak distile su, ardından sırasıyla 3:97, 50:50, 70:30 metanol: su karışımı kullanıldı. Elüsyon sırasında alınan fraksiyonlara ait tüpler YBSK'da analiz ve kontrol edilerek fraksiyonlama işlemine polarite değiştirilerek devam edildi. Elüsyon bittikten sonra kolon % 100 metanol ile yıkanarak kaldırıldı.

b-) Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Fraksiyonlama

Çalışmamızda adsorban olarak fraksiyonlama için RP-18 silikajel kullanılmış olan orta basınçlı sıvı kromatografisi (OBSK) yönteminden yararlanıldı.

Bu yöntemin çalışma prensibinde partiyon mekanizması önceliklidir. Sabit faz, hareketli faza göre apolar yapıdadır. Polar maddeler polar, apolar maddeler ise apolar sabit faz tarafından daha fazla tutulur. C18-silikajel apolar bir sabit faz olduğu için numune içerisindeki apolar maddeler sabit fazla daha fazla etkileşime gireceği için kolonu ilk en polar madde en son ise en apolar madde terk eder. Kullandığımız Ters Faz RP-18 Kolon kromatografisi, literatürde bulunan oligosakkarit ayrımı için partiyon kromatografisinin kullanıldığı bir yöntem ayrım tekniği açısından benzerlik göstermektedir (105).

Fraksiyon kontrolleri YBSK'de RID dedektör ile yapıldı. Fraksiyonlanmamış ham sıcak su ekstresine ait YBSK kromatogramındaki piklerin ayrımı sağlanacak şekilde çalışıldı. Bu ayrımı sağlayan fraksiyonlar birleştirilerek yoğunlaştırıldı. İleri sitotoksisite deneyleri için liyofilize edildi. Kromatografide kullanılan çözücüler, distile su ve analitik kalitede çözücülerdir. Şekil. 3.2'de Ters Faz RP-18 kolon kromatografisinde kullanılan Buchi C660 fraksiyon ayıcı ve toplayıcı görülmektedir.

Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi

- Kolonun Hazırlanması

Kolon, dolgu materyali ile doldurularak dolgu materyalinin kolona iyice oturması sağlandı. MeOH basınç sağlayan bir pompa ile kolona gönderildi ve adsorbanın doyumluğu sağlandı. Kolondan yeterli miktarda MeOH geçirildi ve daha sonra kolon elüsyona başlanacak çözücüyle şartlandırıldı.

Sistem Özellikleri

Fraksiyon toplayıcı sistem	: Buchi C-660 Fraction Collector
Dolgu materyali	: Lichroprep RP-C18 (Merck, 25-40 μ m)
Kolon boyutu	: 15 \times 100 mm
Solvan sistemi	: 1-) H ₂ O-MeOH (100:0) 325 mL 2-) H ₂ O-MeOH (70:30) 75 mL 3-) H ₂ O-MeOH (0:100) 100 mL
Peristaltik pompa	: Buchi C601
Basınç	: 3-7 bar
Akış hızı	: 5 mL
Fraksiyon hacmi	: 2.5 mL
Fraksiyon süresi	: 30 sn
Tüp sayısı	: 200 adet



Şekil 3.2. Ters Faz RP-18 kolon kromatografisinde kullanılan Buchi C660 fraksiyon ayıcı ve toplayıcı.

- Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

10 mg polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) tartıldı. Yeterli miktarda 1/1 metanol-su karışımı içinde tamamı çözüldükten sonra, bir pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edildi. Kolon sistemi bir miktar çalıştırılarak numune adsorbana emdirildi. Kolonun üzerine, adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek için pamuk yerleştirildi ardından cihaz çalıştırılarak elüsyona başlandı.

- Elüsyon Aşaması ve Sonlandırılması

Hareketli faz olarak %100 H₂O, ardından 30:70 (metanol: su) karışımı kullanıldı. Elüsyon sırasında alınan fraksiyonlara ait tüpler YBSK'da analiz ve kontrol edilerek fraksiyonlama işlemine devam edildi. Elüsyon bittikten sonra kolon %100 metanol ile yıkandı.

c-) Fraksiyonların Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Analizi

Fraksiyonlama işlemi yapılmadan önce polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) ve standart olarak glukoz (Sigma) 1'er mg tartıldı. Aynı ayrı metanol:su (1:1) karışımının 1 mL'sinde çözülerek YBSK'da RID dedektör varlığında kırılma indislerine göre ayırım yapılarak kromatogramları alındı.

Sıcak su ekstresinden Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi ve Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar; fraksiyonlama işlemi sürerken ve/veya sonlandırıldıktan sonra YBSK'da analiz edildi. Kromatogram profillerine göre fraksiyonlar birleştirildi.

YBSK Analiz Sistemi Özellikleri

Cihaz	: Shimadzu 20A YBSK sistemi
Dedektör	: RID (Shimadzu RID 20A)
Kolon	: Mediterranean Sea C18 (25 x 0,46 cm, 5mm, Teknokroma)
Hareketli Faz	: Su

3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada, ATCC firmasından temin edilen;

-A-549-) ATCC Kodu: (ATCC® CCL-185™), Açık ismi: (Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücresi),

-MCF-7-) ATCC Kodu: (ATCC® HTB-22™), Açık ismi: (Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi),

-COLO-205-) ATCC Kodu: (ATCC® CCL-222™), Açık ismi: (Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi),

-HEPG-2-) ATCC Kodu: (ATCC® HB-8065™), Açık ismi: (Hepatoselüler Karsinoma Epitelyal Hücresi) kullanıldı.

Çalışmalar süresince bu hücreler +37 °C' de %5 CO₂ sağlayan inkübatörde delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutuldu ve düzenli olarak takip edilip besi yerleri iki gün ara ile değiştirilerek kültür sürdürüldü. Çoğalan hücrelerin bir kısmı dondurulup -80 °C'de muhafaza edildi. Deneyle ve hücre çoğaltımı daima steril laminar kabinde ve steril malzemelerle yapıldı. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan aletler Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan aletler; A-) Steril laminar kabin, B-) Işık mikroskobu, C-) Steril Pipetler, D-) CO₂'li İnkübatör.

a-) Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

- Besiyeri Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması ve ilerleyen süreçlerde deneylerde kullanılması amacıyla besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri %89 RPMI-1640L-Glutamin+Hepes mediyumu, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin karışımından oluşmaktadır. Tüm hücrelerde ve deneylerde bu besiyeri kullanıldı. Bu besiyeri her deney için taze hazırlandı.

- Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi

Daha önceden pasajlanan ve -80 °C'de saklanan hücreler, +37 °C'de çözüldü. Çözünen hücre 15'lik falkon tüpe alındı. Üzerine 9 mL taze besiyeri eklendi ve 20 °C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 1 mL kadar taze besiyeri eklenip yavaşça pipetleyerek homojenize edildi ve delikli hücre kültür kabına aktarıldı. Hücre kültür kabına 9 mL taze besiyeri eklendi. Kap ileri, geri ve dairesel hareket ettirilerek içerisindeki hücrelerin kabın tabanına homojen yayılımı sağlandı. Ardından delikli kültür kabı CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

- Hücrelerin Bakımı

Ekimi yapılan CO₂'li inkübatöre kaldırılan hücreler düzenli olarak takip edildi. Çoğunlukla iki gün ara ile üzerlerindeki besiyeri atılarak 9 mL taze besiyeri eklendi. Bu kontroller sırasında hücrelerde çoğalma ve kontaminasyon olup olmadığı ışık mikroskopunda incelendi.

b-) Hücrelerin Deneyler İçin Kullanıma Hazırlanması ve Dondurulması

Yapılan kontrollerde istenilen sayıda çoğalan hücreler (%80 doluluk) tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Delikli kültür kabındaki hücrelerin üzerlerindeki eski besiyeri tamamen uzaklaştırıldı ardından 4 mL tripsin eklenerek 5-10 dk. beklendi. Işık mikroskopunda hücrelerin kabın tabanından tamamen ayrıldıkları gözlemlendi. Kaba 8 mL besiyeri eklenerek tamamı 12 mL olan içerik 15 mL'lik falkon tüpe alınarak 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pellet elde edildi. Bu aşamada

deney yapılacak ise hücreler için sayım işlemine geçildi. Deney yapılmayacak ise bu hücreler donduruldu. Dondurma işleminde pellet üzerine 1 mL %5 DMSO içeren taze besiyeri eklenerek pipetleme yapıldı. Ardından içerik kriyo tüplerine konularak önce 1 saat +4 °C de ardından 1 saat -20 °C de bekletildi. Sonunda ileri dönemlerde kullanılmak üzere -80 °C dolaba kaldırıldı.

c-) Hücrelerin Sayımı

Yeterli sayıda çoğalan hücreler kaptan tripsinle kaldırılıp, santrifüjlenerek pellet elde edildikten sonra pellet üzerine 1 mL taze besiyeri kondu. Pipetleme yapılarak hücre içeriğinden 0.5 mL'lik ependorff tüpüne 20 µL eklendi. Üzerine 80 µL taze besiyeri eklenerek pipetleme yapıldı. Bu karışımdan 20 µL alınarak başka bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 20 µL tripan mavisi eklenerek pipetleme yapıldı. Oluşan bu karışımdan 10 µL Cedex Smart Slide kartuşuna eklendi. Hücre sayım cihazında ölçüm yapıldı. Buradan çıkan sonuç 1 mL besiyerinde bulunan hücre sayısını vermektedir. Gerekli hesaplamalar yapılarak bu içerik, taze besiyeriyle kuyucuk başına 12500 hücre uygulanacak şekilde seyreltildi.

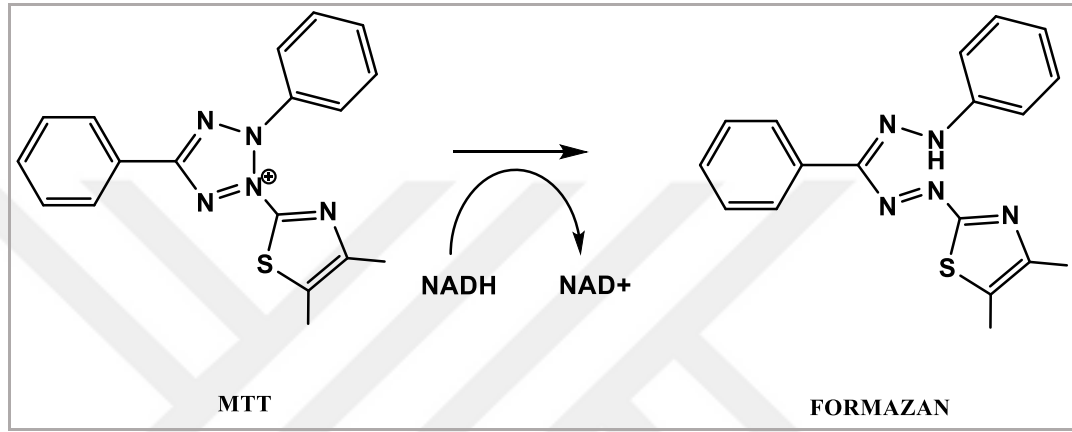
d-) Hücrelerin Plaklara Uygulanması

Deneyleerde 96'lık plaklar kullanıldı. Hücre sayım cihazında sayılan ve seyreltilen hücreler kuyucuklara çoklu dağıtım pipetiyle, her kuyucukta 100 µL içerik ve 12500 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Hücre dağıtımını yapılan plakların hücrelerin plak tabanına yapışabilmesi için 12 saat süreyle CO₂'li inkübatöre bırakıldı.

e-) Hücrelerdeki Sitotoksik Etkinin MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit) Testi ile Belirlenmesi

MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit) canlılık metodu; hücre canlılığını, proliferasyonunu ya da sitotoksitesini ölçmede kullanılan basit, kolorimetrik ve ekonomik bir yöntemdir. Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT yöntemiyle belirlendi. MTT pozitif yük taşıdığından hücre içine doğrudan penetre olabilmeye yeteneğine sahiptir. Canlı hücrelerde metabolik faaliyetler devam ettiği için MTT molekülü hücre içinde formazana dönüştürülmekte ve formazan 570 nm dalga

boyunda maksimum absorbans vermektedir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Hücreler öldüğündeyse, MTT'yi formazana çevirebilme yeteneğini kayb ettikleri için canlı hücrenin bulunmadığı kuyucuklarda renk oluşması beklenmemektedir. MTT molekülü NADH veya ona benzer bir redükleyici ajandan elektron transfer edilmesiyle formazana dönüşmektedir (106). (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. MTT'nin canlı hücrelerde mitokondriyal redüksiyonla formazona dönüşümü (106).

Formazan tuzu hücreler içerisinde ve hücre yüzeyine yakın bölgelerde çözünemeyen bir yapı olarak kalmaktadır. Bu çözünmeyen kristallerin çözünebilir hale getirildikten sonra absorbansının ölçülmesi gerekmektedir. Formazonu çözmek, rengi kalıcı hale getirmek, buharlaşmayı azaltmak ve fenol kırmızısı ile etkileşimi önlemek için DMSO çözücüsü kullanılmıştır (106).



Şekil 3.5. Ölçüme hazır bir plak. Koyu mor olan kuyucuklarda canlılık en yüksek düzeyde iken renk açıldıkça canlılık azalmaktadır.

- Deneyin Yapılışı

Daha öncesinde plaklara ekilen ve 12 saat yapışması için beklenen hücreler CO₂li inkübatörden alındı ve üzerlerindeki besiyeri pipetle tamamen boşaltıldı. Her bir kuyucuğa ayrı ayrı konsantrasyonlarda ekstreler ve/veya ekstre fraksiyonları ve/veya standart taze besiyerinde çözülerek eklendi. Bazı kuyucuklar tüm deneyler için kontrol olarak belirlenerek (Şekil 4.9-Şekil 4.16'daki deneyler için kontrol grupları) bu kuyucuklara sadece taze besiyeri veya test maddesini çözmek için çözücü olarak besiyeri haricinde başka bir çözücü kullanılmışsa, kullanılan oranda çözücü içeren taze besiyeri eklendi. Bu işlemlerde her bir kuyucuğa 100'er µL tatbik yapıldı. İşlem sonrası hücreler inkübatörde beklemeye alındı. Deneylerde incelenilen süreler çoğunlukla 24 saatti. Bazı deneylerde 48 ve 72 saatlik sonuçlar da incelendi.

Test maddesiyle muamele süresi dolan hücreler inkübatörden alındı. Üzerlerindeki besiyeri pipetle uzaklaştırıldı. Kuyucukları tamamen kapatacak miktarda 0.5 mg/mL konsantrasyonda MTT-taze besiyeri karışımı hazırlandı. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100'er µL eklenerek hücreler 4 saatliğine beklemeye bırakıldı. Ardından tüm hücrelerdeki MTT-taze besiyeri karışımı pipetle uzaklaştırılarak bu kuyucuklara 100'er µL DMSO tatbik edildi. DMSO eklenmesiyle kuyucuklarda renklenme gözlemlendi.

Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT, Gen5) kullanılarak absorbanans 570 nm'de okundu. Deneyler 3 paralel çalışıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

3.2.6. Etkin Fraksiyon (RP-138) Kompozisyon Analizleri

a-) RP-138 Fraksiyonu Üzerinde Monosakkarit Kompozisyonu Analizi

Sitotoksisite testlerinde en etkin fraksiyon olarak belirlenen RP-138 fraksiyonuna ait monosakkarit kompozisyonu YBSK sistemi kullanılarak analiz edildi. Fraksiyon içeriği olan polisakkaritler analiz edilmeden önce monosakkaritlerine hidroliz edilmiş, sonra monosakkaritler partiyon kromatografisi tekniğiyle ayrılmıştır (107). Deney için kullanılan standartlar analitik kalitededir.

- RP-138 Fraksiyonunun Monosakkaritlere Hidrolizi

Trifloroasetik Asit (TFA) ile Hidroliz

1-2 mg RP-138 fraksiyonu, 1 mL MeOH: H₂O (1:1) karışımı içinde çözündürüldü. Üzerine 2 M 1 mL Trifloroasetik asit (TFA) çözeltisi ilave edildi. Su banyosunda 100 °C'de 4 saat inkübe edildi (108). Su banyosundan alınan karışım bir süre soğutuldu. Ardından yüksek konsantrasyonda NaOH ile asitliği turnusol kağıdı kullanılarak nötralize edildi.

Hidroklorik Asit ile Hidroliz

1-2 mg. RP-138 fraksiyonu, 1 mL MeOH: H₂O (1:1) karışımı içinde çözündürüldü. Üzerine 6 N 1 mL Hidroklorik asit (HCl) çözeltisi ilave edildi. Su banyosunda 100 °C'de 4 saat inkübe edildi (109). Su banyosundan alınan karışım bir süre soğutuldu. Ardından yüksek konsantrasyonda NaOH ile asitliği turnusol kağıdı kullanılarak nötralize edildi.

- RP-138 Fraksiyonunun Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Analizi

Monosakkaritler YBSK' da kırılma indislerine göre karbonhidrat kolonu kullanılarak RID dedektörle tespit edilerek analiz yapıldı. Deney için D (+)-Glukoz (Sigma), D (+)-

Mannoz (Merck), D(-)Fruktoz (Sigma), D(+)-Galaktoz (Merck), D(+)-Ksiloz (Roth), L(+)-Arabinoz (Roth), L-Ramnoz (Roth) standartları kullanıldı.

Numune Hazırlama

Tüm standartlar %1 konsantrasyonda distile suda çözülerek balon jojelere konuldu. Hidroliz edilen fraksiyon ise herhangi bir işlem uygulanmadan doğrudan kullanıldı.

Analiz

Spesifikasyonları aşağıda belirtilen YBSK sistemi ile RP-138 fraksiyonunun hidroliziyle elde edilen monosakkaritlerin şahit standart monosakkaritlerle analizi yapıldı.

YBSK Sistemi

Cihaz	: Agilent Technologies 1260 Series
Dedektör	: Agilent 1260 İnfinitiy Refractive Index Dedektor(RID)
Kolon	: Zorbax Carbohydrate, 4.6×250 mm, 5µ
Kolon sıcaklığı	: 30 °C
Akım hızı	: 1 mL/ dk
Hareketli faz	: Asetonitril: Su (75:25 h/h)
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL

b-) RP-138 Fraksiyonunun MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometrisi Kullanılarak Glukan Standartı ile Karşılaştırılması

MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometrisi, Matriks Yardımcılı Laser Desorpsiyon İyonlaşmalı –Kuadripol İyon Tuzaklı-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresini ifade eder. Sistem ana hatlarıyla 4 bölümden oluşmaktadır;

i) İyonizasyon sistemi: Analizi yapılacak örnekler matriks molekülleri üzerindedir. Bu karışım üzerine gönderilen lazer matriksin iyonlaşmasını indükler; matrikse ait fotonlar örnekle etkileşime girerek örneği protonize eder.

ii) İyon tuzaklama bölümü: Kuadripol iyon tuzağı sistemi bulunmaktadır.

iii) Kütle analizörü: MALDI, uçuş zamanlı kütle analizörü ile kombine edilmiştir.

iv) Algılama bölümü: İyonların kütesinin yüküne oranının (m/z) kareköküne bağlı bir şekilde analiz yapılmaktadır, analiz edilecek maddeler yoğunluklarına ve bu özelliklerine göre analiz edilmektedir (110, 111).

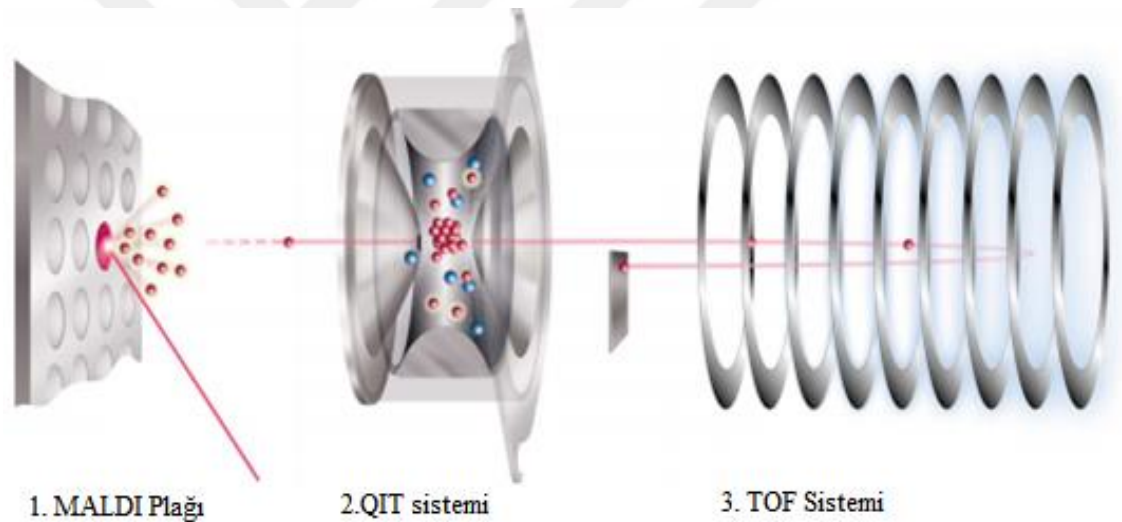
MALDI-QIT-TOF cihazı ve MALDI plağı Şekil 3.6’da görülmektedir.



Şekil 3.6. MALDI plağı ve MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometresi.

MALDI plaklarına ayrı ayrı uygulanan örnek ve standart kuruduktan sonra üzerlerine matriks çözeltisi ilave edildi ve kuruması beklendi. Kuyucuğunda matriks ve analizi yapılacak madde karışımını içeren plak analizöre yerleştirildi. Cihaz kuyucuğu lazerle bombardımana tabi tutuldu. Matriks aracılı uyarılan ve iyonize olan örnek/standart kuadripol iyon tuzaklı ve uçuş zamanlı analizör sistemlerinin kombine halde bulunduğu sisteme geldi burada analizi yapılacak iyon seçilip uçuş zamanlı sistemde ilerledi ve dedektöre gelen iyonlar değerlendirildi. Sistemin diğer kütle spektrometrelerinden farkı çok büyük molekül ağırlıklı polisakkarit, protein vb. maddelere uygulanabilirliği; Kuadripol iyon tuzağı sayesinde MSⁿ işlemi uygulanabilmesi; Uçuş zamanlı analizörle yüksek duyarlılıkta analiz yapabilmesidir.

Sistemin şematik çalışma görseli Şekil 3.7’de görülmektedir.



Şekil 3.7. MALDI plağında lazer bombardımanı ile iyonize olan örnek, QIT sistemi (Kuadripol İyon Tuzağı) sistemine gelir ve istenilen iyon seçilir. Seçilen iyon TOF sisteminde (Uçuş zamanlı) ayrılarak dedektörde okunur.

- Matriks Çözeltisi Hazırlama

2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) ve α -siyano-4-hidroksi-sinamik asit (CHCA) bire bir oranında karıştırıldı. %0,1 Trifloroasetik asit (TFA) içeren Asetonitril: Su (1:1) karışımı oluşturuldu. DHB ve CHCA bileşimi bu karışım içinde çözündürüldü.

- Numune Hazırlama

RP-138 fraksiyonu ve glukoz standartı metanol: su (1:1) karışımı içerisinde ayrı ayrı çözündürüldü.

- Tatbik

0.5 µL RP-138 fraksiyonu ve glukoz standartı MALDI plakındaki kuyucuklara ayrı ayrı tatbik edildi. Üzerlerine 0.5 µL matris çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

- Lazer Bombardmanı

Örnek ve numuneyi içeren plak, MALDI cihazının iyonizasyonu sağlayan birimine yerleştirildi. Pozitif moda ayrı ayrı iyonizasyonları sağlandı (MS¹). İyon tuzağından seçilen iyonlara ayrı ayrı MS² uygulandı.

- Analiz Sonuçlarının Okunması

Bombardman sonucu iyonize olan maddeler uçuş zamanlı kütle analizöründe *m/z* oranlarına göre hareket ederek dedektöre ulaştı ve okumaları yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler SPSS 24 istatistik programı ile yapıldı. Varyansların analizi Tek Yönlü ANOVA prosedürüne göre uygulandı. Ortalamalar arasındaki belirgin farklar Tukey's pairwise kıyaslama testine göre $p < 0,05$ seviyesinde, Dunnett kıyaslama testine göre $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ seviyesinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Ekstrelerin Hazırlanışı, Spektrofotometrik Bileşim Analizleri

4.1.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere 3 ekstre; etanol ekstresi (EE); polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) ve ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresi (PSU) mantar fruktifikasyonlarından gereç ve yöntemlerde anlatılan prosedürlerle elde edildi. Ekstrele ait yüzde verimler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü üzere etanol ekstresinde en yüksek verim elde edilmiştir. Polisakkarit izolasyonu için kullanılan iki farklı yöntemle elde edilen ekstrelerde ise en yüksek verim, polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresinde gözlemlendi. Diğer polisakkarit elde yöntemi olan ultrasonik etkiyle polisakkarit eldesinin ise verim olarak düşük bir yöntem olduğu görüldü.

Tablo 4.1. Ekstre verimleri.

Ekstreler	PS	PSU	EE
Verim %	5.0*	1.5	20.6

*Ortalama; (PS): Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, (PSU): Ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresi, (EE): Etanol ekstresi.

4.1.2. Toplam Fenol, Flavonoit, Flavonol, Şeker, Protein Tayini

Ekstrelerin toplam fenol, toplam flavonoit, toplam flavonol, toplam şeker, toplam protein miktarları deneysel kısımda verilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak tespit edildi. Toplam fenol miktarı gallik asite, toplam flavonoit miktarı kateşine,

toplam flavonol miktarı rutine, toplam şeker miktarı D (+)-glukoza, toplam protein miktarı ise sığır serum albümine eşdeğer hesaplandı. Toplam fenol, flavonoit ve flavonol sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Toplam fenol her üç ekstrede de çok düşük miktarda tespit edilmiştir. Toplam fenol miktarları bakımından ekstreler PSU> PS> EE şeklinde sıralanmıştır. Flavonoit sadece PU ekstresinde tespit edilmiştir ve düşük miktardadır. Toplam flavonol her üç ekstrede de tespit edilememiştir.

Tablo 4.2. Toplam Fenol, Toplam Flavonoit, Toplam Flavonol Miktarları

Ekstreler	Toplam Fenolik	Toplam Flavonoit	Toplam Flavonol
	mgGAE/gekstre	mgCAE/gekstre	mgRE/gekstre
PS	7.51±0.39*	-	-
PSU	10.36±0.53	0.58±0.44	-
EE	4.81±1.41	-	-

*Ortalama±SS; (PS): Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, (PSU): Ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresi, (EE): Etanol ekstresi.

Toplam şeker ve protein miktarları ise Tablo 4.3’de verilmiştir. Toplam şeker miktarı polisakkarit izolasyon teknikleriyle elde edilen ekstrelerde (PS, PSU) yüksek düzeylerde tespit edildi. Toplam protein miktarı ise PSU> PS> EE şeklinde sıralanmıştır ve yine polisakkarit izolasyon teknikleriyle elde edilen ekstrelerde yüksek düzeylerde bulunmuştur. Polisakkaritçe zengin ekstrelerde deproteinizasyon yapılsa dahi yüksek düzeyde proteine rastlanmıştır.

Tablo 4.3. Toplam Şeker ve Toplam Protein Miktarları

Ekstreler	Toplam Şeker	Toplam Protein
	mgGE/gekstre	mgBSAE/gekstre
PS	567.46±26.19*	628.57±13.99
PU	400.93±12.23	698.03±9.36
EE	232.09±11.33	252.66±6.06

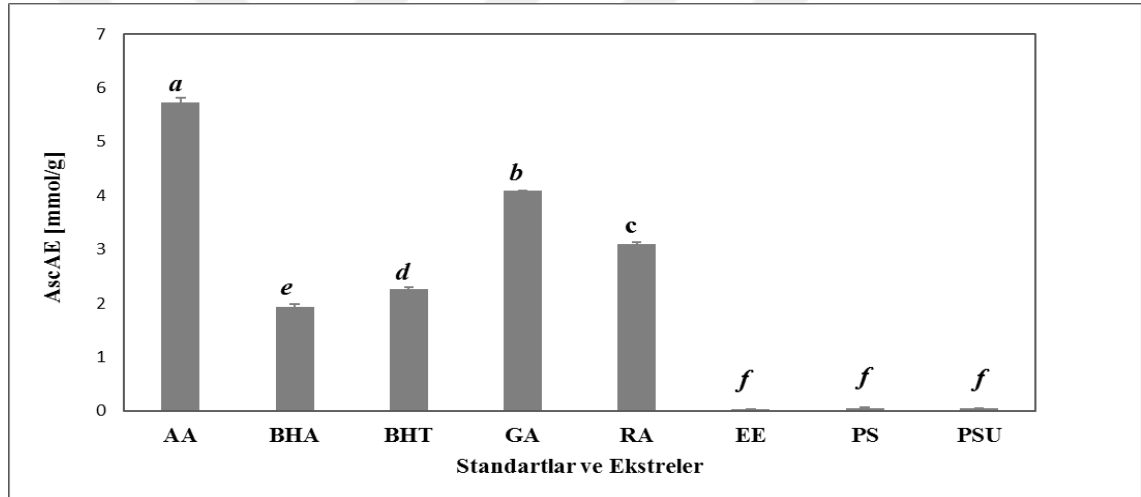
*Ortalama±SS; (PS): Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, (PSU): Ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresi, (EE): Etanol ekstresi.

4.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

4.2.1. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi

Maddeye ait antioksidan gücün değerlendirildiği parametrelerden biri de demir (III) indirgeyici özelliğidir. Özellikle lipofilik ve hidrofilik maddelerin tayini için uygundur. Polifenolik maddelerin demir indirgeyici gücünü tespit için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (112).

T. anaticum'dan elde edilen her üç ekstre ve standartların demir indirgeme kapasiteleri incelenmiş sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Verilen sonuçlar askorbik aside eşdeğer hesaplanmıştır. Grafiklerde görülen yüksek değerler yüksek aktiviteye işaret etmektedir.



Şekil 4.1. *T. anaticum* ekstreleri ve standartların demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri. Ortalama olarak verilen değerler %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-f) aynı harfler ile belirtilmiş barlar için $p > 0,05$ 'ten farklı değildir. AA: Askorbik Asit, BHA: Bütilenmiş Hidroksi Toluen, BHT: Bütilenmiş Hidroksi Anisol, GA: Gallik Asit, EE: Etanol Ekstresi, PS: Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi, PSU: Ultrasonik Etkiyle Elde Edilen Polisakkaritçe Zengin Su Ekstresi.

Ekstreler ve standartlara ait istatistiksel analiz sonucu; ekstrelerin her üçünde demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasitesi anlamlı bir şekilde standartlardan farklı ve zayıf bulunmuştur ($p < 0,05$).

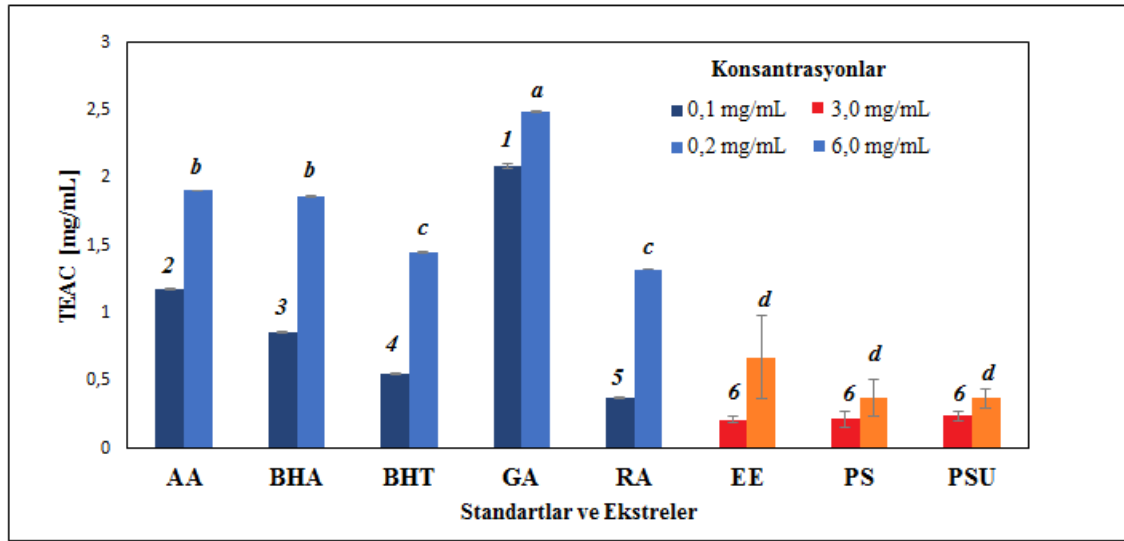
4.2.2. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) Radikalini Süpürücü Etki Tayin Edilmesi

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanımıyla enerjiye dönüşümü sırasında oluşan reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri hem yaşam için elzemdir hem de kullanımı sırasında metabolizmanın reaktif ara ürünler oluşturması kaçınılmazdır. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir (113). Serbest radikaller vücuttan süpürülerek vücutta oluşturabilecekleri zararlı etkiler ortadan kaldırılır. Bunu sağlayan maddeler antioksidan özellik gösterirler (114). Örneklerin radikal süpürücü etkinlikleri stabil bir radikal olan DPPH[•] radikali kullanılarak ölçülmüştür. Ekstre ve standartların, DPPH[•] radikalini fizyolojik pH'da süpürücü etkisi ölçülmüştür. Standartların etkinlik sıralaması gallik asit> rozmarinik asit> BHA >BHT> askorbik asit şeklindedir. En düşük IC₅₀ değeri askorbik asite ait ve 0.1271 mg/mL iken, her üç ekstre için de IC₅₀ değeri 6 mg/mL'nin üzerinde bulunduğu öngörülmektedir.

4.2.3. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS^{+•}) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Serbest radikal süpürücü etkinin tayininde kullanılan metodlardan birisi de (ABTS^{+•}) radikalini süpürücü etki tayinidir. Koyu mavi renkli bir bileşik olan ABTS^{+•} radikalinin kationunun süpürücü etki gösteren bileşiklerle etkileşime girerek rengini kaybetmesi ve bu kaybın spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanır (112).

Tüm ekstrelerin ABTS^{+•} radikalini süpürücü etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Yüksek TEAC değeri yüksek aktiviteyi işaret etmektedir.



Şekil 4.2. *T. anaticum* ekstreleri ve standartların ABTS⁺ radikalini süpürücü etkileri. Ortalama olarak verilen değerler %95 güven aralığında belirtilmiştir. (a-f) aynı harfler ve (1,4) aynı sayılar ile belirtilmiş barlar p>0,05'ten farklı değildir. AA: Askorbik Asit, BHA: Bütillenmiş Hidroksi Toluen, BHT: Bütillenmiş Hidroksi Anisol, GA: Gallik Asit, EE: Etanol Ekstresi, Ps: Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi, PSU: Ultrasonik Etkiyle Elde Edilen Polisakkaritçe Zengin Su Ekstresi.

Ekstreler ve standartlara ait istatistiksel analiz sonucu; ekstrelerin her üçünün de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS⁺) radikalini süpürücü gücü anlamlı bir şekilde (p<0,05) standartlardan farklı ve zayıf bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlar (0,1 ve 3 mg/mL) birlikte, yüksek konsantrasyonlar (0,2 ve 6 mg/mL) birlikte analiz edilmiştir. Ekstrelerin standartlara göre yüksek konsantrasyonları (3 ve 6 mg/mL) çalışılmış olmasına rağmen etki istatistiksel olarak standartlar kadar aktif bulunamamıştır.

4.2.4. Askorbat-Fe(III) Katalizli Fosfolipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu

Vücutta oluşan serbest radikaller lipid yapıları peroksidederek protein ve DNA hasarı kaynaklı hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Peroksidasyonu önleyen maddeler antioksidan etkinlik göstermektedir (115). Fizyolojik pH'da yapılan deneyde bovine-brain kaynaklı fosfolipit lipozomlarının askorbat-Fe(III) katalizli radikali bozunmasında hidroksil radikalini süpürücü etkinlik TBA-reaktif bileşiklerin formasyonunun inhibisyonu ölçülmektedir. Sonuçlar irdelendiğinde en düşük etkili standart olan BHT'ye ait IC₅₀= 0,0853 mg/mL iken tüm ekstrelere ait IC₅₀ değerlerinin 1 mg/mL'nin üzerinde olduğu öngörülmektedir.

4.2.5. Spesifik Olmayan Hidroksil Radikali ile Yönlendirilmiş 2-Deoksiriboz Bozunması

Deney, Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikalının deoksiriboza atak etmesi ve parçalanması sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin düşük pH ve sıcaklık etkisiyle TBA ile reaksiyona girerek oluşturduğu rengin spektroskopik olarak ölçülmesi esasına dayanır (103). Hücrelerde hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek DNA hasarı vermektedir (113). Deneyde ise model olarak hidroksil radikali deoksiriboza yönlendirilmekte ortama verilen maddelerin bu reaksiyonu önleyebilirliği antioksidan güç olarak kabul edilmektedir. Düşük IC₅₀ değeri yüksek aktifliği işaret eder. Ekstreler için IC₅₀ değerleri çok yüksek bulunmuş PS, PSU için 6 mg/mL'nin üzerinde; EE için 10 mg/mL'nin üzerindedir. Ekstrelerde etkinlik çok zayıf gözlenmiştir.

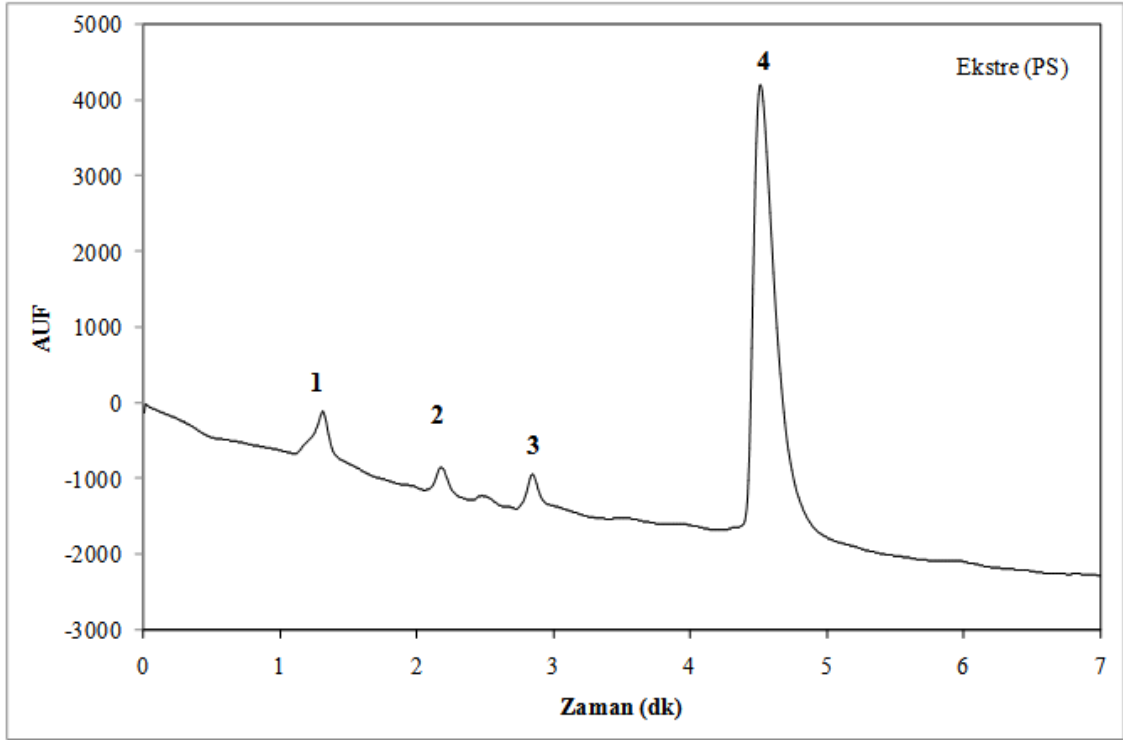
4.3. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) Üzerinde Fraksiyonlama Çalışmaları

Toplam polisakkarit miktarı diğer ekstrele göre daha yoğun olan polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) üzerinden fraksiyonlama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarla zayıf sitotoksik etkinlik gösteren ham polisakkaritçe zengin ekstre (PS) daha güçlü etki gösteren fraksiyonlara ayırmak amaçlanmıştır. Fraksiyonlama işlemlerine başlamadan önce ham ekstre (PS) ve gluklan standartına ait YBSK analizleri yapılmış ve fraksiyonların ayrımı ve analizinde anahtar olarak kullanılmıştır.

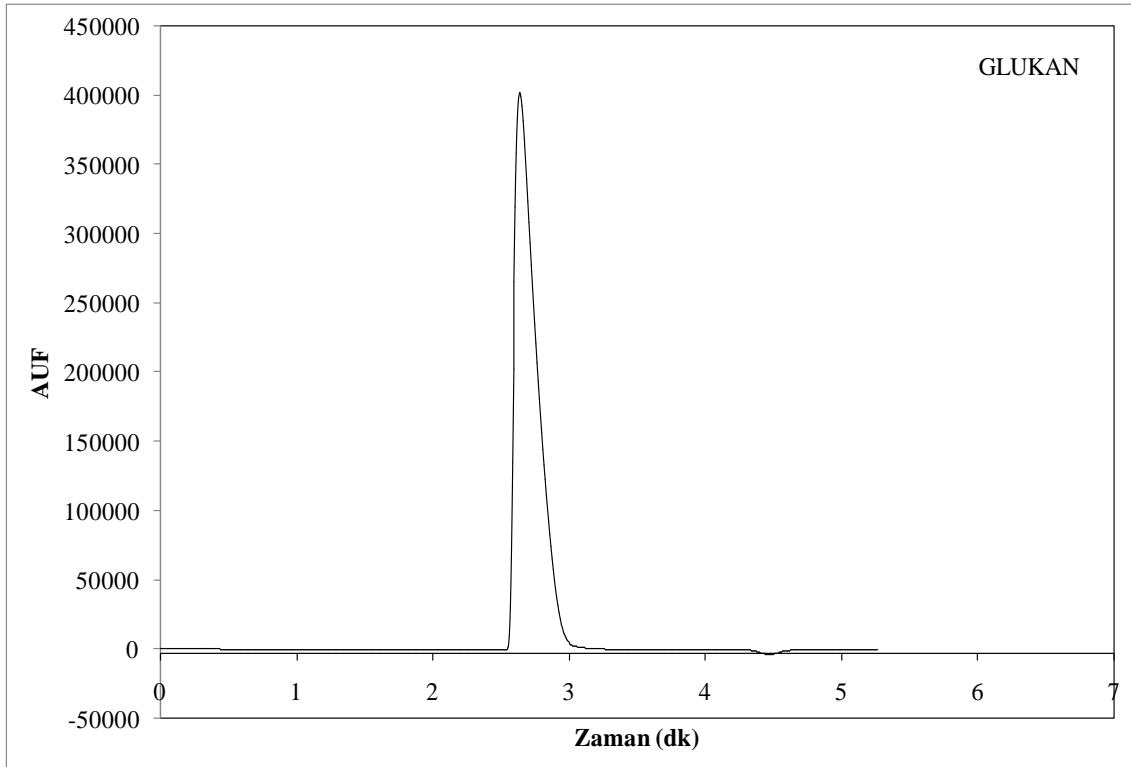
Fraksiyonlama için Açık Kolon Kromatografisi ve Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi kullanılmıştır. Açık Kolon Kromatografisinde; Sephadex LH-20 Kolon kullanılmış Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisinde ise Ters Faz RP-18 Kolon kullanılmıştır.

Sonuç olarak iki adet Açık Kolon Kromatografisi fraksiyonu ve iki adet Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi fraksiyonu olmak üzere 4 fraksiyon elde edilmiştir.

4.3.1. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) ile Glukan Standartının Karşılaştırılması:



Şekil 4.3. Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresine (PS) ait YBSK kromatogramı.

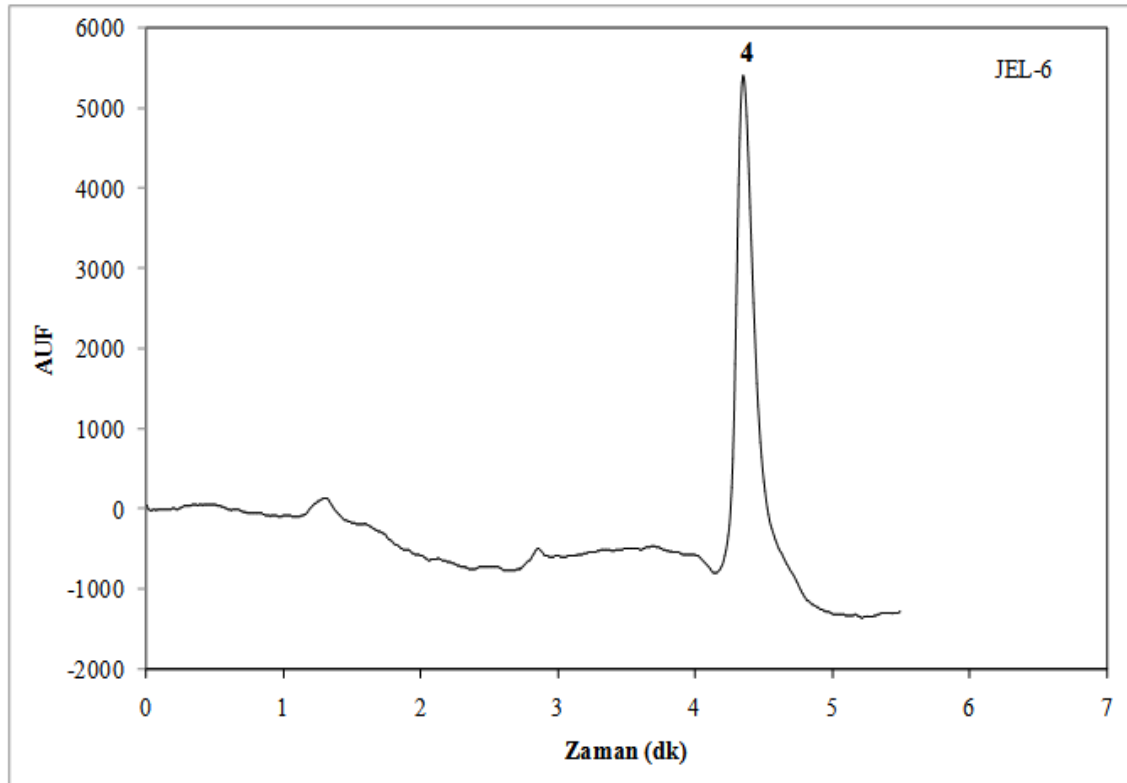


Şekil 4.4. Glukan standartına ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Şekil 4.3'teki sıcak su ekstresi ve Şekil 4.4'teki glukun standartına ait kromatogramlar incelendiğinde; sıcak su ekstresine ait kromatogramda 4 adet pik tespit edilmiştir. Glukun standartına ait kromatogramda ise 1 pik gözlemlenmiştir. Her iki kromatogram üst üste karşılaştırıldığında sıcak su ekstresine ait kromatogramdaki 3 numaralı pikin glukun standartına ait kromatogramda gözlenen pik ile aynı geliş zamanına sahip olduğu anlaşılmıştır.

4.3.2. Tüplere Ait YBSK Kromatogramları, Tüplerin Birleştirilmesi ile Fraksiyonların Tespiti

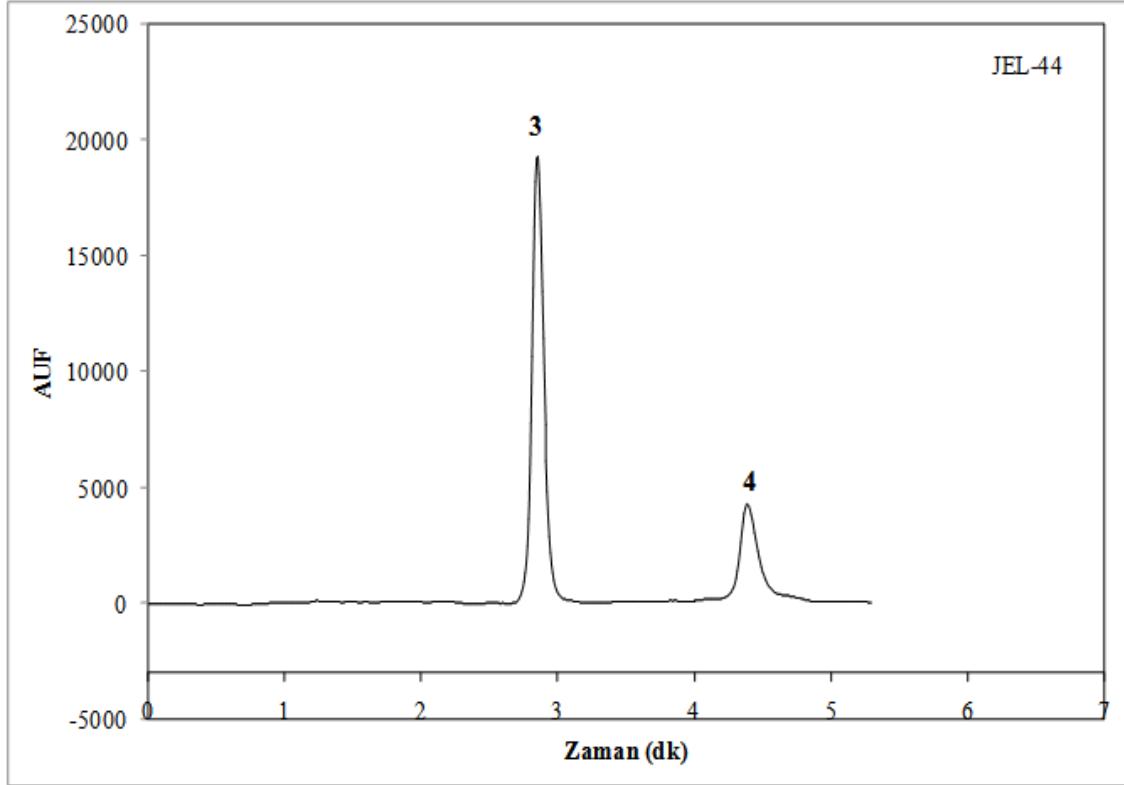
a-) Jel Filtrasyon Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi Fraksiyonları



Şekil 4.5. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 6. tüpe ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Şekil 4.5'deki kromatograma göre; polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresine ait kromatogramda gözlenen 4. Pik (Şekil 4.3), bu tüpe ait kromatogramda da güçlü bir şekilde gözlemlenmiştir. İlerleyen tüplerde 15. tüpe kadar bu pik temiz bir

şekilde gözlemlenmiştir. Bu sebeple 6-15. tüpler birleştirilmiştir. Bu fraksiyona sinyalin en güçlü alındığı tüpün numarasını içeren “JEL-6” ismi verilmiştir.

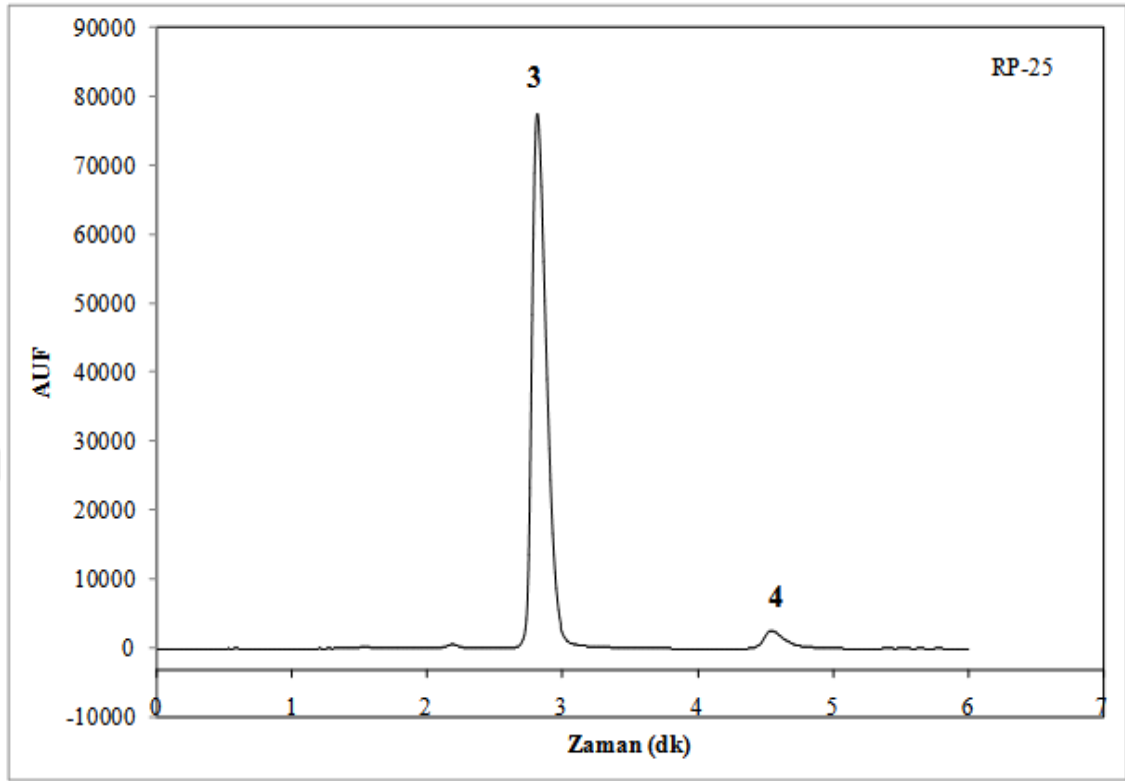


Şekil 4.6. Sephadex LH-20 Kolon Kromatografisi 44. tüpe ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Şekil 4.6'daki kromatograma göre; polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresinde gözlenen 3.pik (Şekil 4.3) bu tüpe ait kromatogramda güçlü şekilde gözlemlenmiştir. Geride 18. tüpe kadar ilerleyen tüplerde ileride ise 68. tüpe kadar bu pik güçlü bir şekilde gözlemlenmiştir. 4.pik 18-68. tüpler aralığında kesintisiz gözlemlenmiştir. 3. pik tek başına ayırt edilememiştir. Bu sebeplerle 18-68. tüpler birleştirilmiştir. Bu fraksiyona 3.pike ait sinyalin en güçlü alındığı tüpün numarasını içeren “JEL-44” ismi verilmiştir.

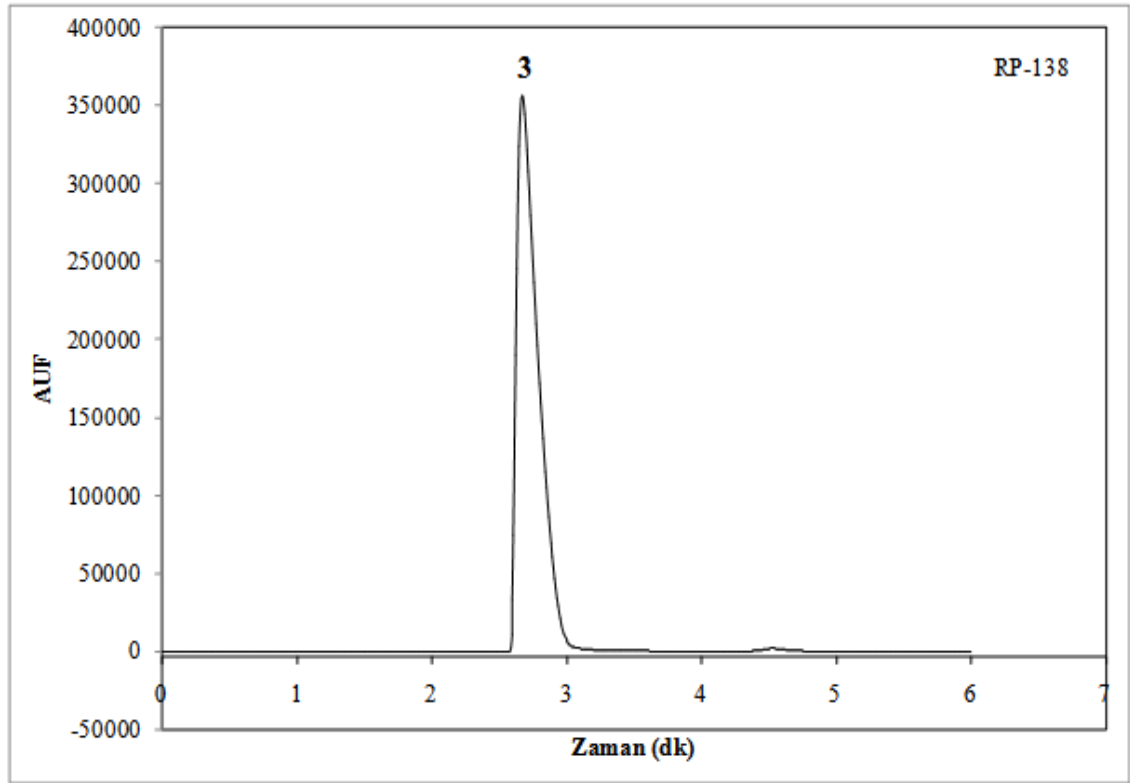
Sonuçta teorik olarak molekül ağırlıklarına göre birbirinden farklı JEL-6, JEL-44 olmak üzere iki fraksiyon elde edilmiştir. JEL-6'ya ait moleküler ağırlığın ayırımın temel prensibi jel filtrasyon gereğince JEL-44'ten daha büyük olduğu düşünülmektedir.

b-) Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi Fraksiyonları



Şekil 4.7. Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi 25. tüpe ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Şekil 4.7’deki kromatogram hareketli faz olarak H₂O-MeOH (0:100) kullanılan bölgede gözlenen bir kromatogramdır. Sıcak su ekstresinde gözlenen 3. Pikten (Şekil 4.3) bu tüpte de yoğun bir şekilde sinyal alınmıştır. 3. pikin güçlü sinyal verdiği 20-28. tüpler birleştirilmiştir. 4. Pikin ayrımı yapılamamıştır. Bu fraksiyona 3.pike ait sinyalin en güçlü alındığı tüpün numarasını içeren “RP-25” ismi verilmiştir.



Şekil 4.8. Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi 138. tüpe ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Şekil 4.8’ deki kromatogram hareketli faz olarak H₂O-MeOH (70:30) kullanılan bölgede gözlenen bir kromatogramdır. Bu çözücü sisteminin kolona girmesiyle kolonda gözle de ayırt edilebilen bir ayırım gerçekleşerek sarı-kahve renkli bir bant oluşmuş ve kolonu terk etmiştir. Diğer tüplerle alınan örneklere göre göze görülebilir şekilde koyu renkte örnekler alınmıştır. Sıcak su ekstresinde (Şekil 4.3) gözlenen 3. pikten bu tüpte her iki fraksiyonlama tekniğiyle de elde edilen tüm tüpler içindeki en şiddetli sinyal alınmıştır. Gerisindeki ve ilerisindeki tüplerde bu sinyalin güçlü gözlemlendiği tüpler olan 130-150. tüpler birleştirilerek, fraksiyona 3.pike ait sinyalin en güçlü alındığı tüpün numarasını içeren “RP-138” ismi verilmiştir. Burda sistemden geçen çözücülerin çözücü oranı metanol yönüne kaydığından dolayı polaritenin düştüğü, ilk gelen fraksiyonlara nazaran daha polaritesi düşük maddelerin ayrıldığı düşünülmektedir. Literatürde de benzer teknikle oligosakkaritler polarite farklarına göre ayrılmıştır (105). Sonuç olarak teorikte polaritesi fazla olan RP-25 ve daha az polar RP-138 fraksiyonları elde edilmiştir.

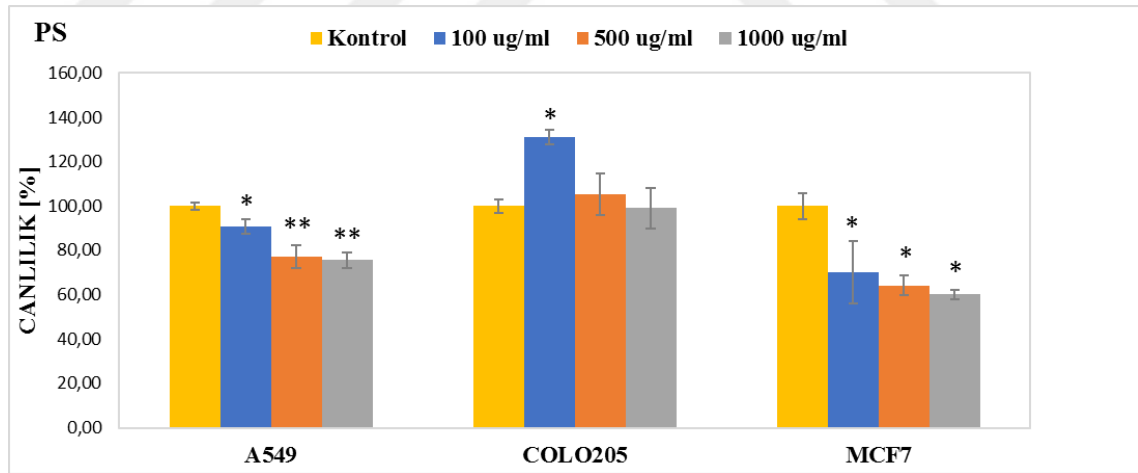
4.4. Sitotoksisite Çalışmaları

Hücre hatlarına uygulanacak olan örnek ve standart belirlenen dozlarda her kuyucuğa ayrı ayrı uygulanmıştır. Çalışılan tüm plaklarda bazı kuyucuklara herhangi bir örnek veya standart uygulanmayarak kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Örnek veya standart uygulanan gruplarla kontrol grupları kıyaslanarak sitotoksik etkinlik incelenmiştir.

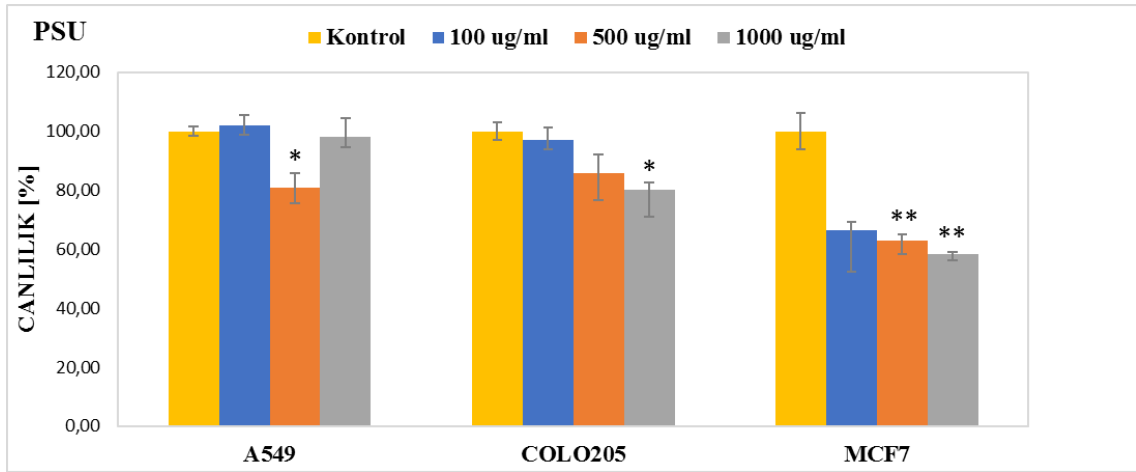
4.4.1. Ham Ekstrelerin (PS, PSU, EE) Sitotoksik Etkinliği

Elde edilen 3 farklı ekstre (PS, PSU, EE) 100 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonda A-549, MCF-7, COLO-205 hücre hatlarını içeren plaklara uygulanmış ve 24 saat sonunda MTT sonuçları multifonksiyonel mikropłaka okuyucuda ölçülmüştür.

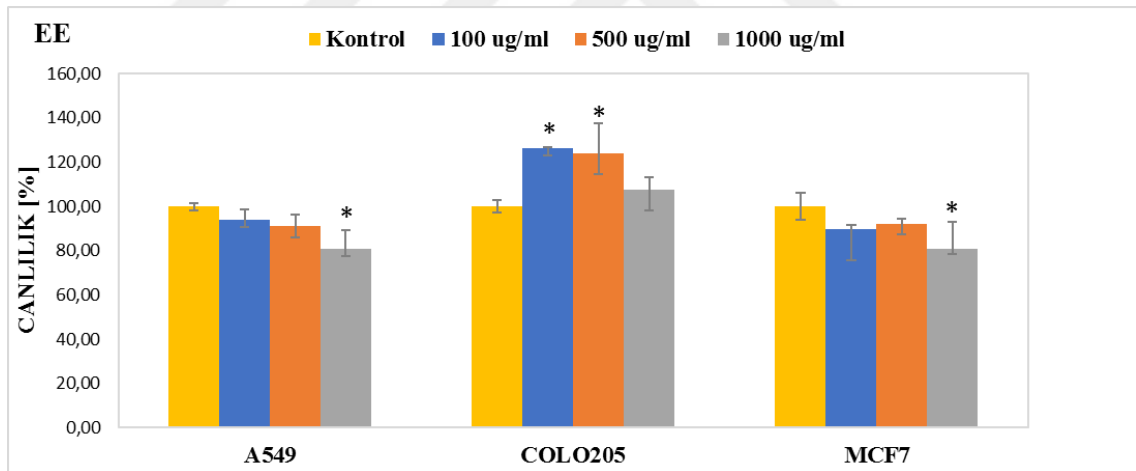
Sitotoksik etkinlikleri grafiklerle gösterilmiştir. HEPG-2 hücre hatlarında denenen iki ekstre (polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, etanol ekstresi); hücrelerin proliferasyonunu artırmıştır. Bu yüzden grafiklerde gösterilmemiştir. Her üç ekstreye ait grafikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.9. Polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresinin (PS) 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hüresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)



Şekil 4.10. Ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresinin (PSU), 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)



Şekil 4.11. Etanol ekstresinin (EE) 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ 'tir.)

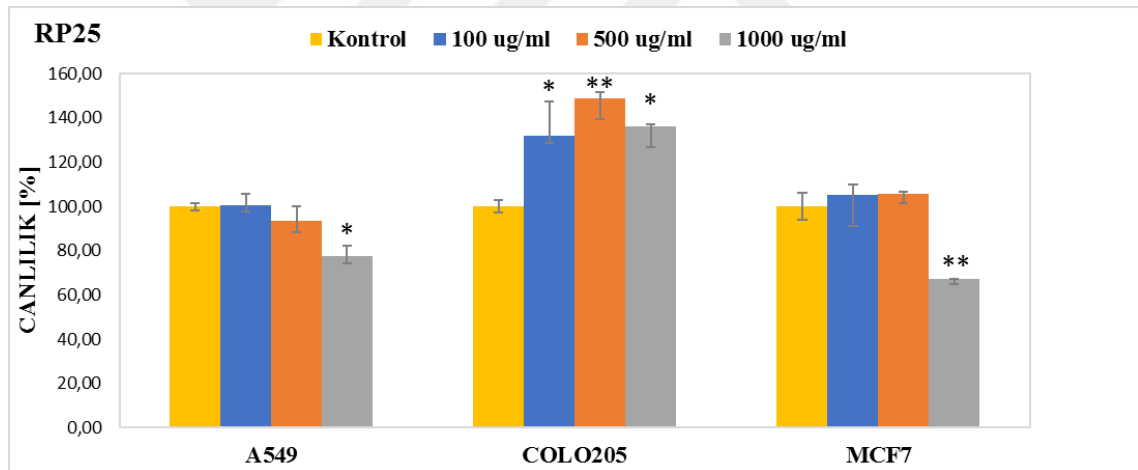
Ekstreler uygulandıktan 24 saat sonra hücre canlılığı (% canlılık) gözönüne alındığında her üç ekstre; 3 hücre hattı için, denenen tüm konsantrasyonlarda, canlılıkta %50 ve daha fazla inhibisyon sağlayamamıştır.

A-549 hücre hattı için kontrole göre en yüksek inhibisyon doza bağımlı bir şekilde %24'e kadar PS ekstresi ile maksimum konsantrasyon olan 1000 µg/mL'de sağlanmıştır (p<0.001).

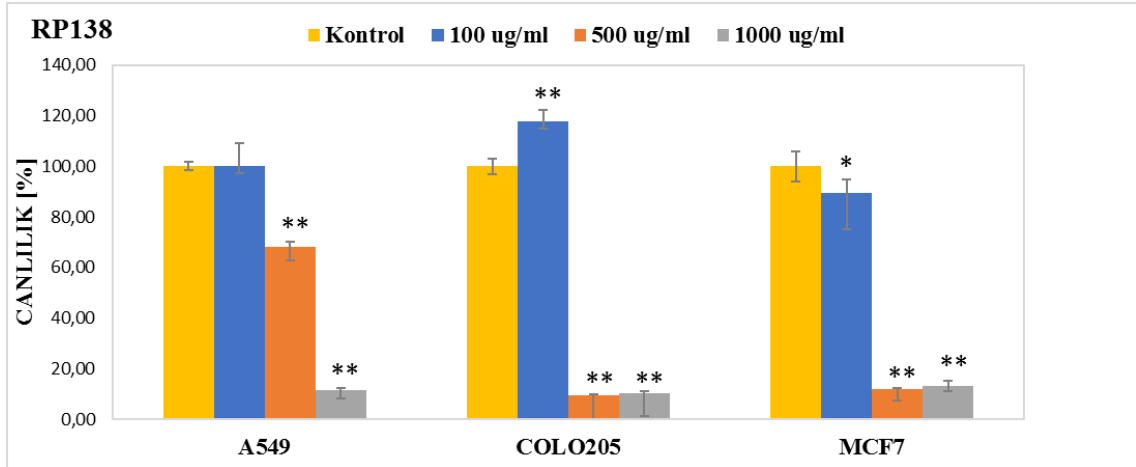
COLO-205 hücre hattı için kontrole göre en yüksek inhibisyon PSU ekstresi ile maksimum konsantrasyon olan 1000 µg/mL'de sağlanmıştır ve yaklaşık %19 bulunmuştur (p<0.05).

MCF-7 hücre hattı için kontrole göre en yüksek inhibisyon PSU ekstresi ile maksimum konsantrasyon olan 1000 µg/mL'de sağlanmıştır ve yaklaşık %42 bulunmuştur (p<0.001).

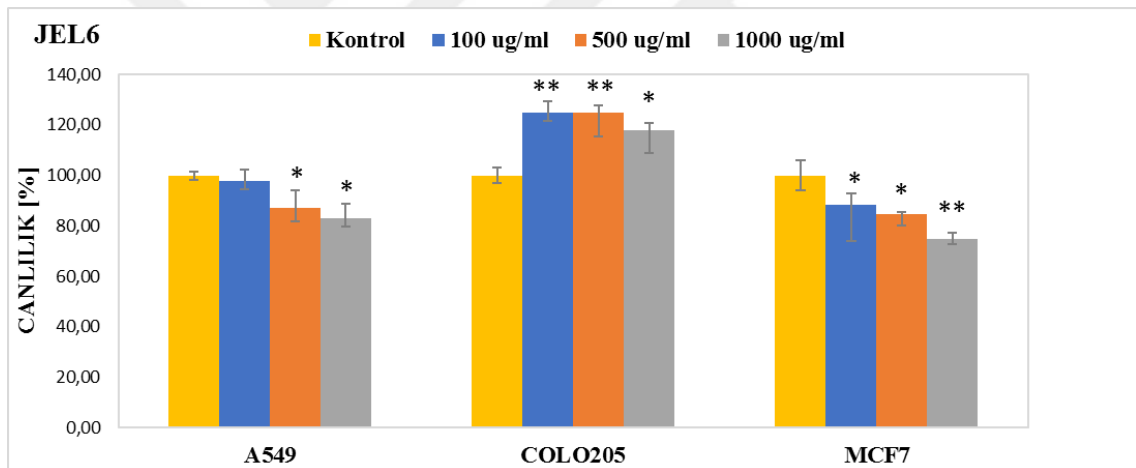
4.4.2. Polisakkaritçe Zengin Sıcak Su Ekstresi (PS) Fraksiyonlarının (RP-25, RP-138, JEL-6, JEL-44) Sitotoksik Etkinliği



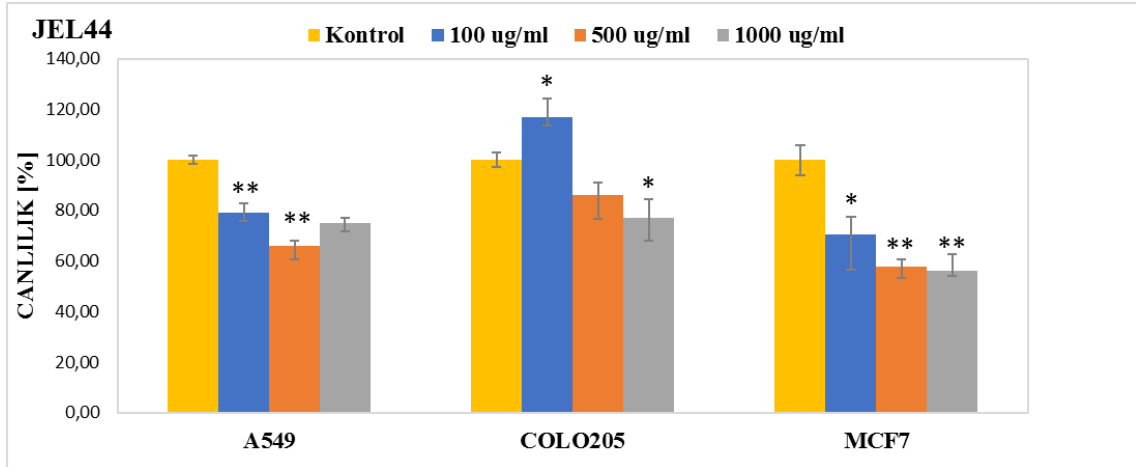
Şekil 4.12. RP-25 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hücresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri *p<0,05 ve **p<0,001'dir.)



Şekil 4.13. RP-138 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hüresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)



Şekil 4.14. JEL-6 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hüresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)



Şekil 4.15. JEL-44 fraksiyonunun 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hüresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)

Fraksiyonlardan uygulandıktan 24 saat sonra hücre canlılığı (% canlılık) gözönüne alındığında fraksiyonlardan üçü (RP-25, JEL-6, JEL-44) 3 hücre hattı için, denenen tüm konsantrasyonlarda, canlılıkta %50 ve daha fazla inhibisyon sağlayamamıştır. Diğer fraksiyon olan RP-138 ise; A-549 hücre hattı için 1000 $\mu\text{g/mL}$, COLO-205 hücre hattı için 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$, MCF-7 hücre hattı için 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ uygulama konsantrasyonlarında canlılıkta %50'den fazla inhibisyon sağlamıştır.

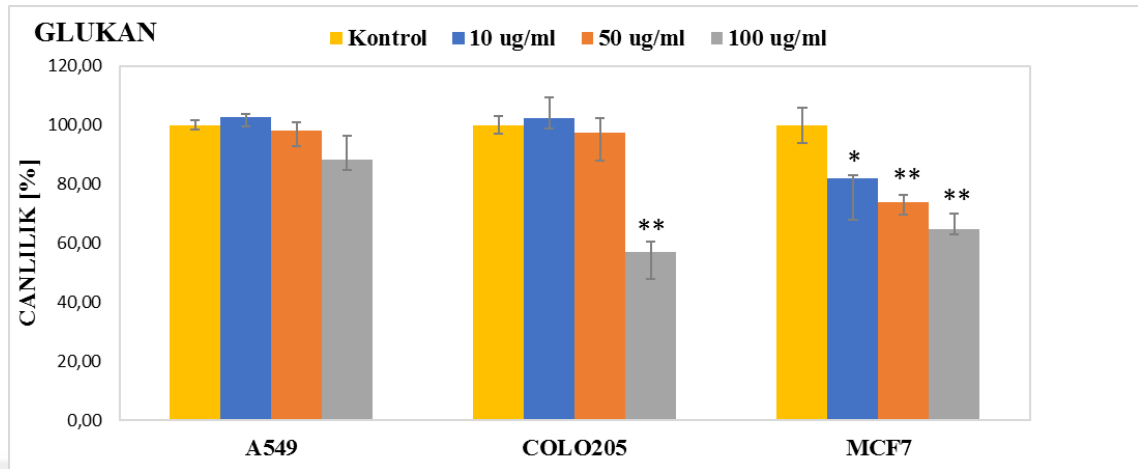
RP-138 fraksiyonu A-549 hücre hattı için 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre yaklaşık %82 inhibisyon sağlamıştır ($p < 0,001$).

RP-138 fraksiyonu COLO-205 hücre hattı için 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre sırasıyla yaklaşık %90 ve %90 inhibisyon sağlamıştır ($p < 0,001$).

RP-138 fraksiyonu MCF-7 hücre hattı için 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kontrole göre sırasıyla yaklaşık %88 ve %87 inhibisyon sağlamıştır ($p < 0,001$).

Etkin görülen RP-138 fraksiyonu için bazı yapı aydınlatma çalışmaları yapılmıştır.

4.4.3. Glukan Standartının Sitotoksik Etkinliği



Şekil 4.16. Glukan standartının 3 farklı kanser hücre hattında, ortalama 12500 hücre içeren kuyucuklarda, 24 saat sonunda yüzde canlılığa etkisi. A549: İnsan Akciğer Karsinoma Epitelyal Hücre Hattı, COLO205: İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Epitelyal Hücre Hattı, MCF7: İnsan Meme Adenokarsinoma Epitelyal Hüresi. (Kontrol grubuna göre anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ 'dir.)

Glukan standartı ile A-549 hücre hattı için maksimum uygulama konsantrasyonu olan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda yaklaşık %12 inhibisyon hesaplanmış olmasına rağmen kontrole göre anlamlı bir inhibisyon gerçekleşmemiştir ($p > 0,05$).

Glukan standartı ile, COLO-205 hücre hattı için en yüksek inhibisyon 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda gözlenmiş ve hücre canlılığında kontrole göre %43 inhibisyon sağlanmıştır ($p < 0,001$).

Glukan standartı ile MCF-7 hücre hattı için doza bağımlı bir şekilde maksimum uygulama konsantrasyonu olan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de hücre canlılığında kontrole göre %35 inhibisyon sağlanmıştır ($p < 0,001$).

Glukan standartı suda ve besiyerinde çözünmemiş bu sebeple DMSO'da çözünerek besiyerine eklenmiştir. DMSO'daki çözünürlüğü de az olduğu için standart 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonun üzerinde çalışılamamıştır.

4.5. Etkin Fraksiyon (RP-138) Kompozisyon Analizleri

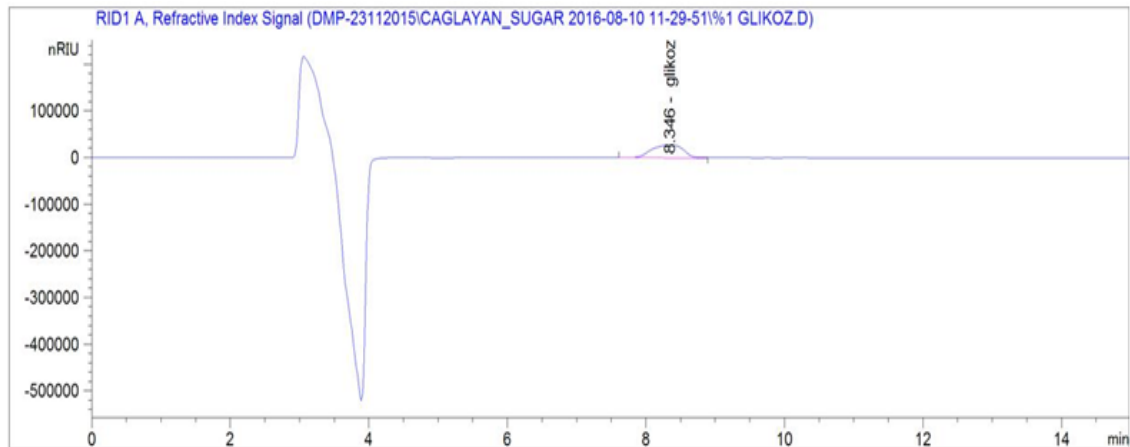
4.5.1. RP-138 Fraksiyonu Üzerinde Monosakkarit Kompozisyonu Analizi

Sitotoksosite testlerinde en etkin fraksiyon olarak belirlenen RP-138 fraksiyonuna ait monosakkarit kompozisyonu YBSK sistemi kullanılarak analiz edildi. Fraksiyon içeriğinde bulunduğu düşünülen polisakkaritler analiz edilmeden önce monosakkaritlerine hidroliz edildi. Analiz hidrolizatlar üzerinde yapıldı. Standart olarak; D(+)-Glukoz (Sigma), D(+)-Mannoz (Merck), D(-)Fruktoz (Sigma), D(+)-Galaktoz (Merck), D(+)-Ksiloz (Roth), L(+)-Arabinoz (Roth), L-Ramnoz (Roth) kullanıldı.

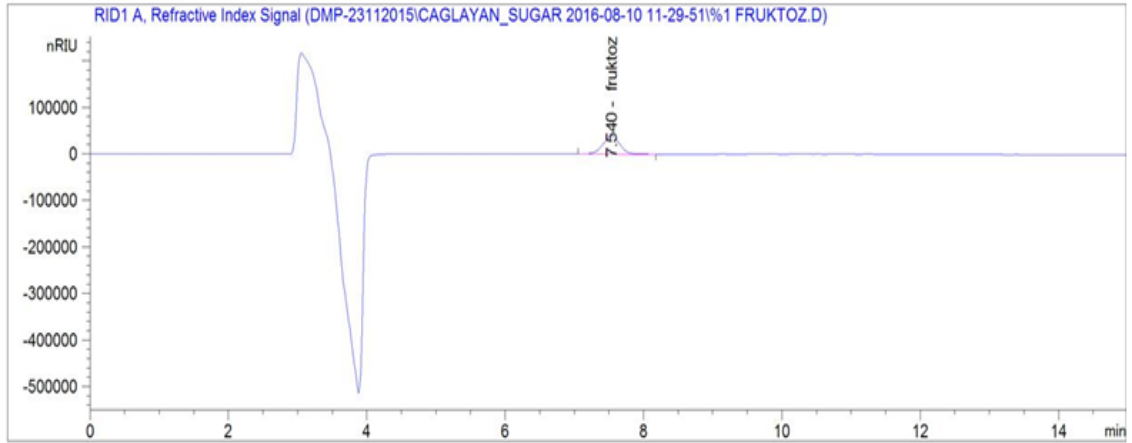
YBSK Sonuçları

Standartlara ait kromatogramlar ve fraksiyon hidrolizatlarına ait kromatogramlarla karşılaştırılarak fraksiyon içeriği kalitatif analiz edildi. Monosakkarit kompozisyonu oransal olarak belirlendi.

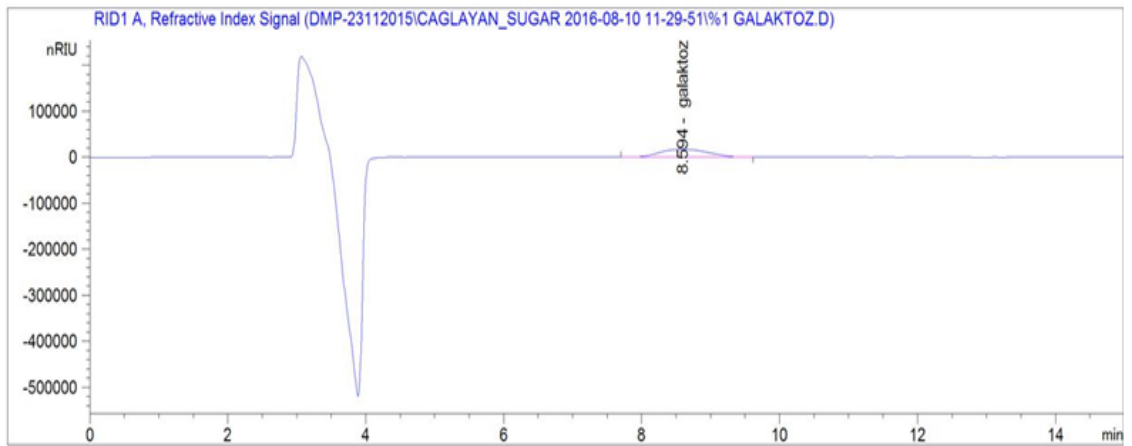
- Standartlara Ait Kromatogramlar



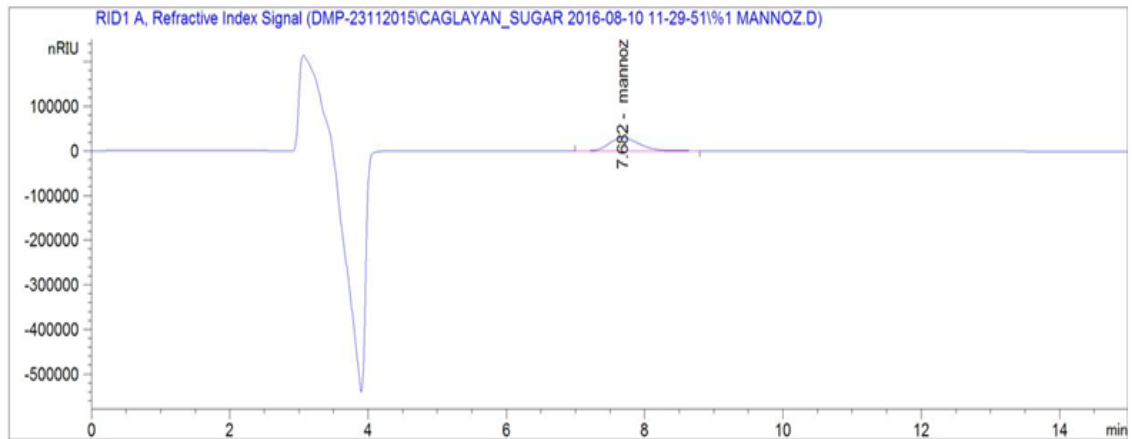
Şekil 4.17. Glukoz standartına ait YBSK kromatogramı.



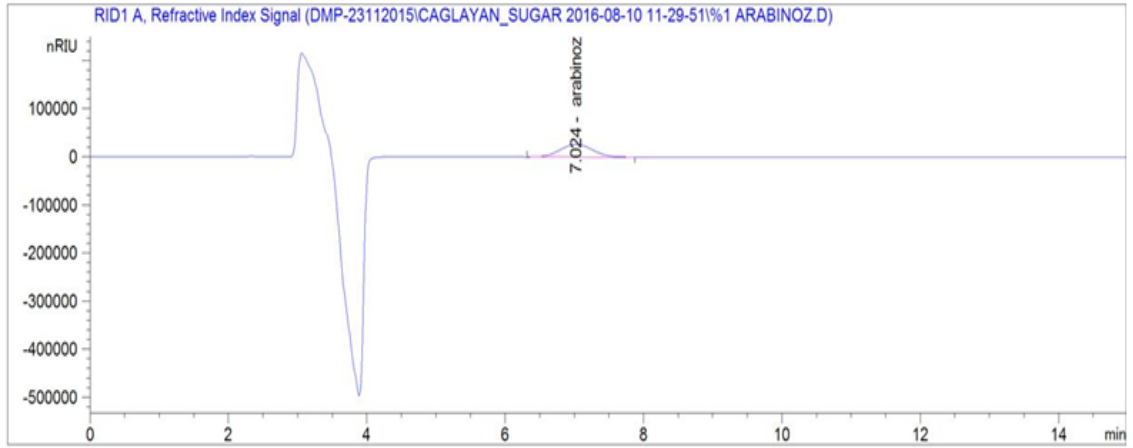
Şekil 4.18. Fruktoz standartına ait YBSK kromatogramı.



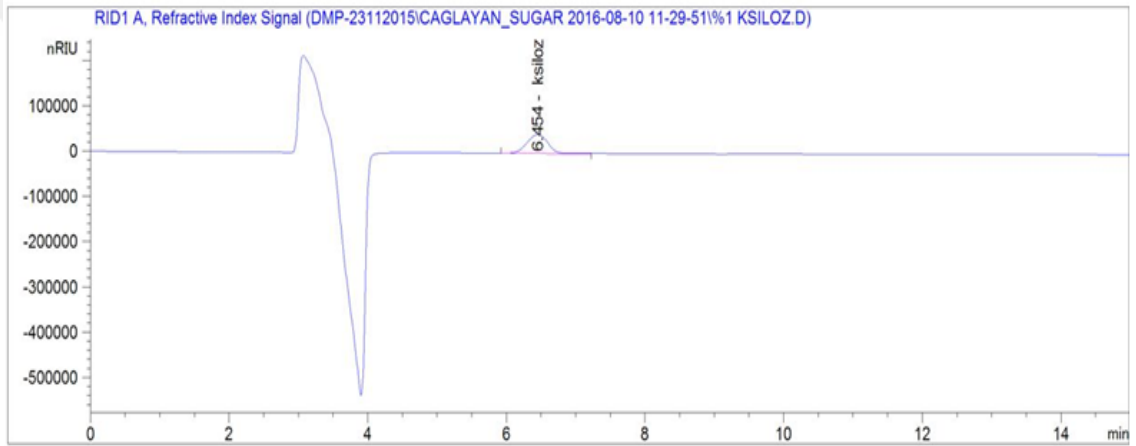
Şekil 4.19. Galaktoz standartına ait YBSK kromatogramı.



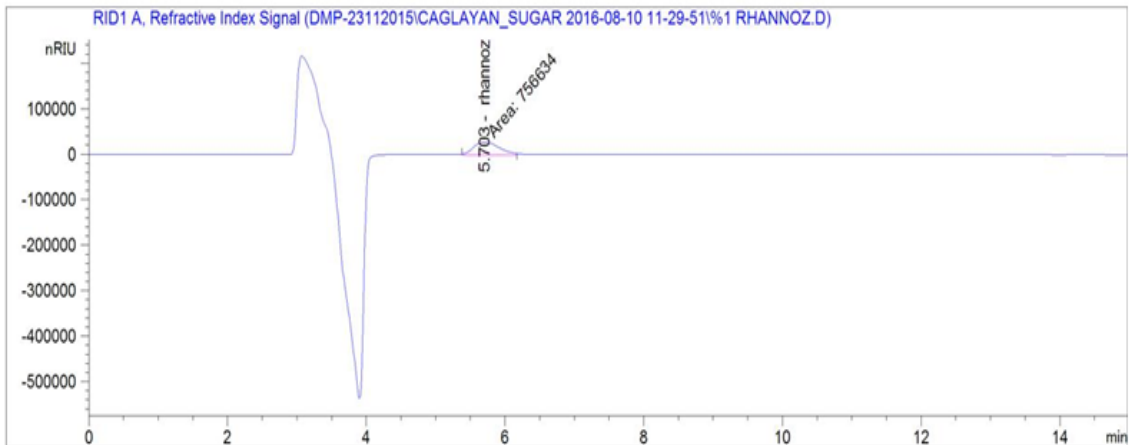
Şekil 4.20. Mannoz standartına ait YBSK kromatogramı.



Şekil 4.21. Arabinoz standartına ait YBSK kromatogramı.

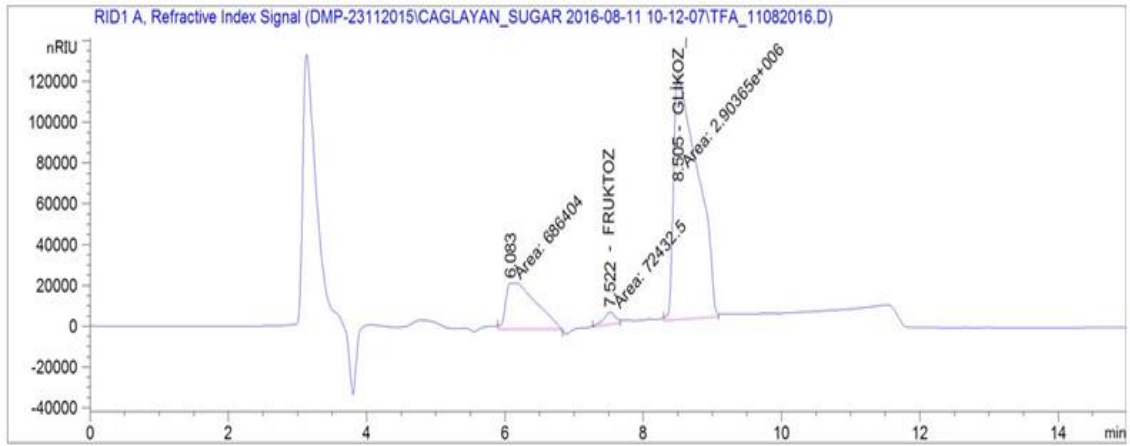


Şekil 4.22. Ksiloz standartına ait YBSK kromatogramı.

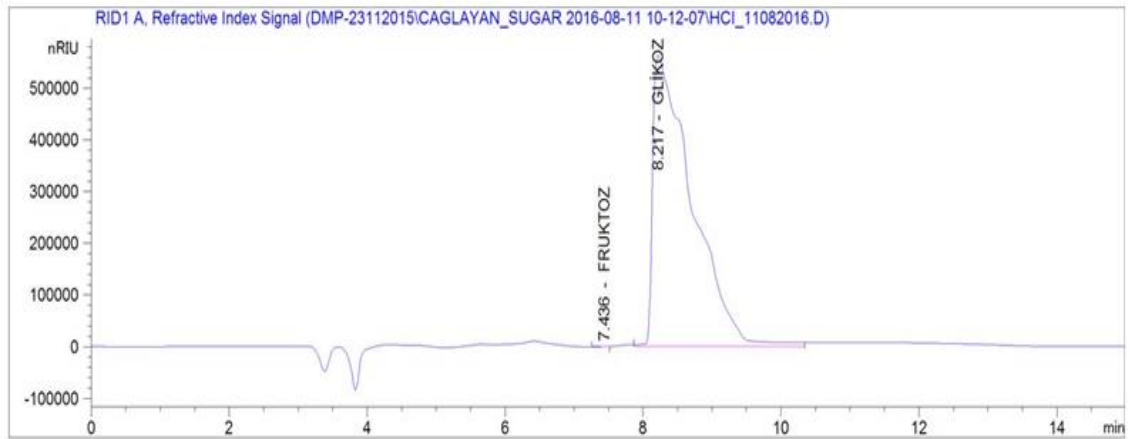


Şekil 4.23. Ramnoz standartına ait YBSK kromatogramı.

-Hidroliz Edilen RP-138 Fraksiyonuna Ait Kromatogramlar



Şekil 4.24. TFA ile hidroliz edilen RP-138 fraksiyonuna ait YBSK kromatogramı.



Şekil 4.25. HCl ile hidroliz edilen RP-138 fraksiyonuna ait YBSK kromatogramı.

Değerlendirme: Her iki kromatogram (Şekil 4.24, Şekil 4.25) incelendiğinde glukoz ve fruktoza ait sinyaller gözlemlenmektedir. TFA ile hidroliz edilen fraksiyona ait kromatogramda (Şekil 4.24) 6. dk civarında elimizdeki standartların hiçbirleriyle eşleşmeyen bir pike rastlanmıştır. Ancak bu pik HCl ile hidroliz edilen numuneye ait kromatogramda (Şekil 4.25) gözlenmemiştir. Bu pikin başka bir şekere ait bir pik olması olasılığı yerine HCl ile yapılan hidrolizde bu pik doğrulanmadığı için kirlilik ya da başka bir maddenin girişimi olarak değerlendirilmiştir. Her iki kromatograma ait piklerin alanları hesaplanarak glukoz ve fruktozun hidrolizatlardaki oransal durumu hesaplandığında her iki fraksiyon hidrolizatında da glukoz %99'dan fazla, fruktoz ise %1'den az bulunmuştur.

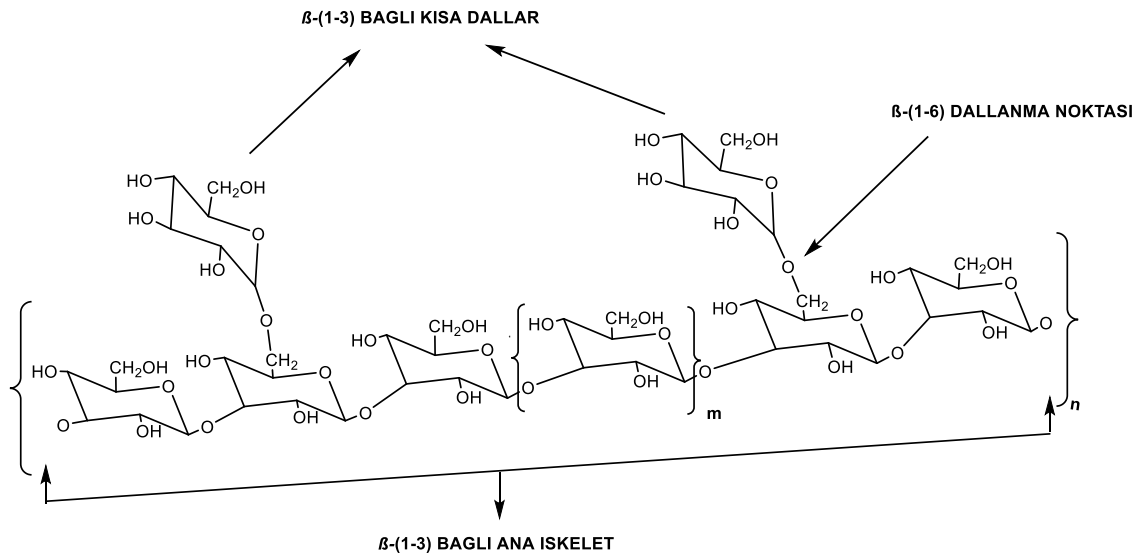
İki yöntem birbiriyle kıyaslandığında ise HCl ile yapılan hidrolizin monosakkarit veriminin daha fazla olduğu belirlenmiştir.

4.5.2. RP-138 Fraksiyonunun MALDI-QIT-TOF Kütle Spektrometrisi Kullanılarak Glukan Standartı ile Karşılaştırılması

MALDI-QIT-TOF Kütle spektrometrisine uygulanan RP-138 fraksiyonu ve glukan standartına ait MS¹ ve MS² spektrumları elde edildi.

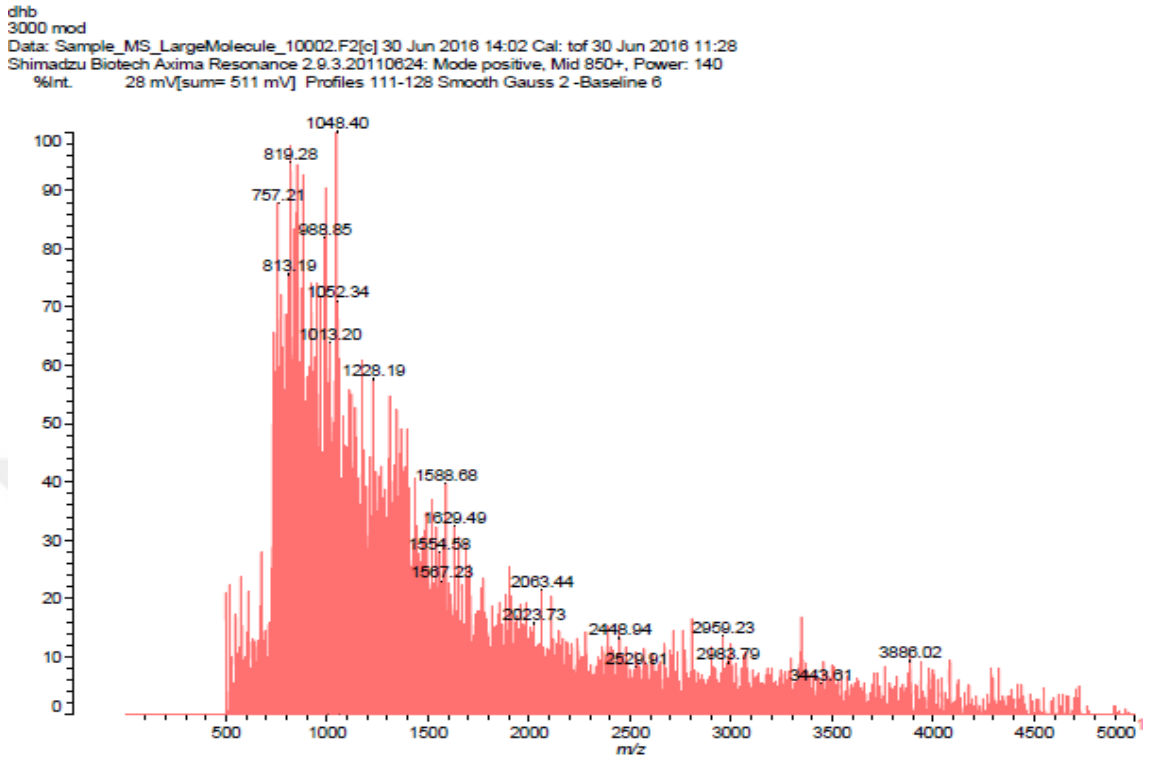
RP-138 fraksiyonu ve glukan standartı için inceleme maddelerin birbirlerine benzerlikleri üzerinden yapıldı. MS² için iyon seçimi yapılırken hem standart hem de örnekte benzer parçalanma ürünlerini veren; yüksek yoğunluklu iyonlara ait pikler dikkate alındı.

Deneyde kullanılan glukan standartı *Saccharomyces cerevisiae* (bira mayası)' dan elde edilen bir glukan ekstresi idi. Saf glukan içeriği ve sadece glukoz monomerlerinden oluştuğu bilgisi haricinde spesifikasyonlarında başka bir belirteç yoktu. Literatür araştırması *S. cerevisiae*'dan elde edilen glukanların (1-3)-(1-6)- β -glukan olduğunu göstermektedir (116).

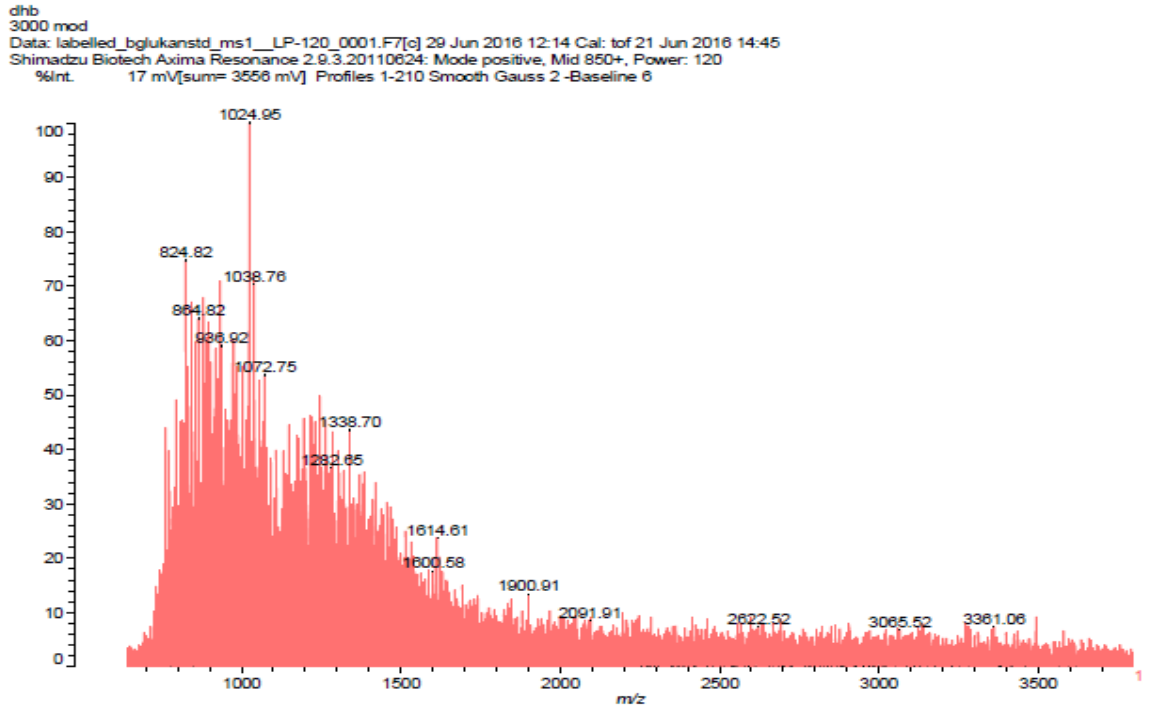


Şekil 4.26. *S. cerevisiae* (bira mayası)'dan elde edilen (1-3)-(1-6)- β -glukan.

-MALDI Spektrumları

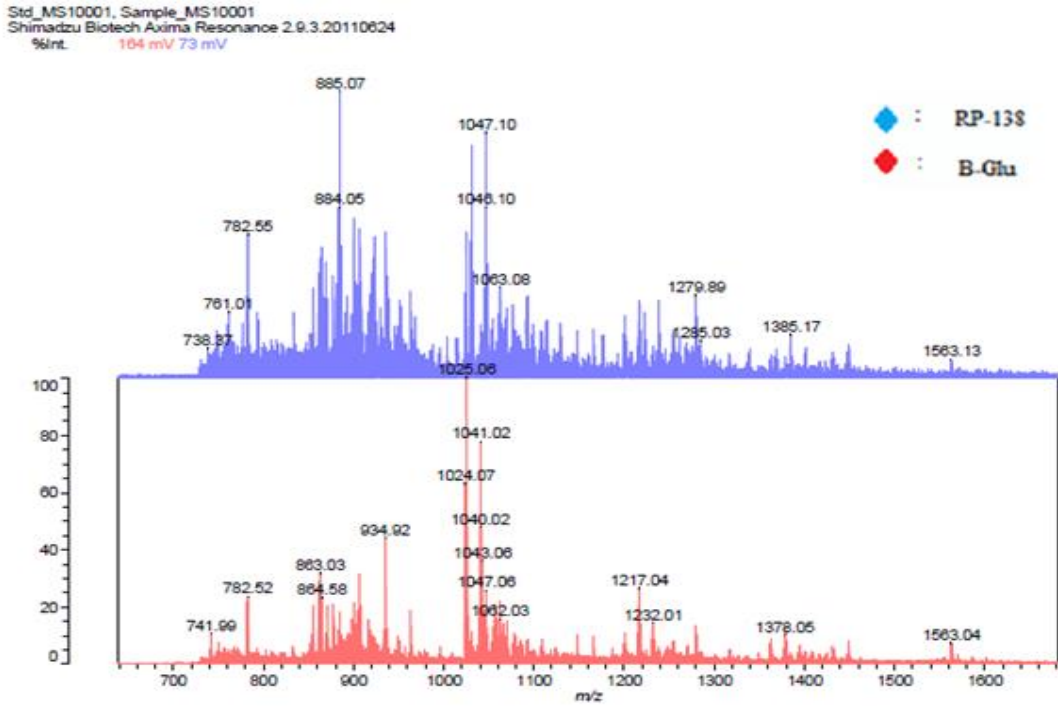


Şekil 4.27. RP-138 numunesine ait MS¹ spektrumu ve parçalanmaları.

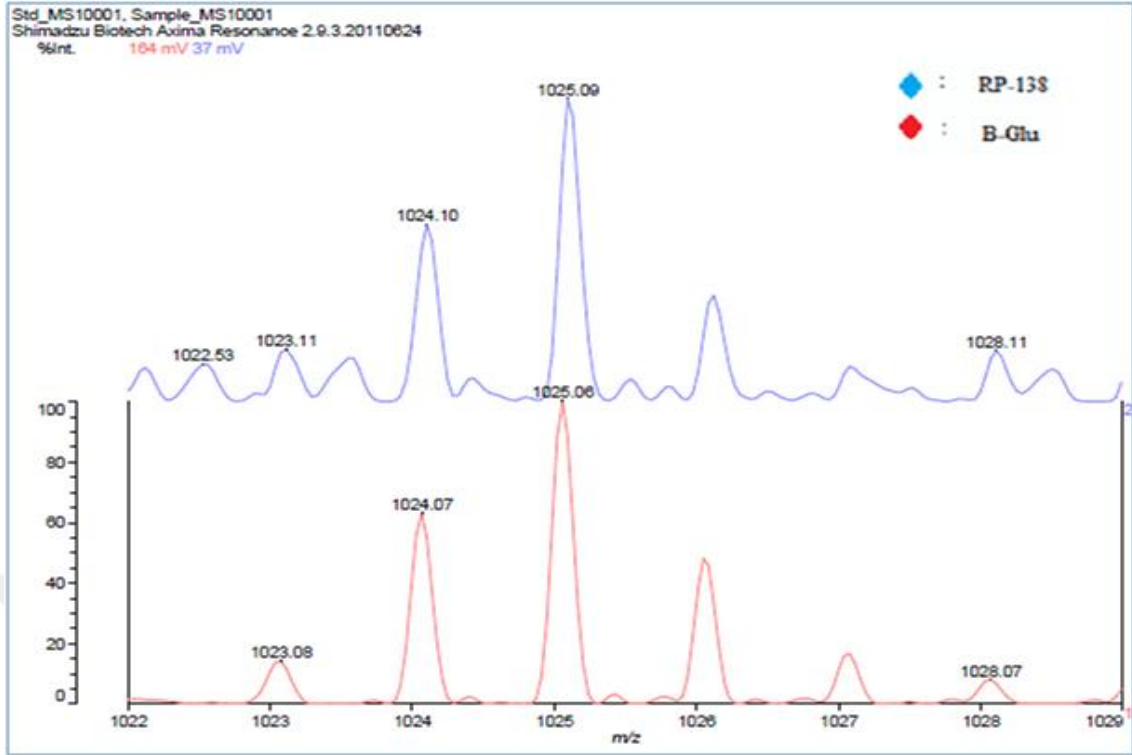


Şekil 4.28. Glukan standartına ait MS¹ spektrumu ve parçalanmaları.

RP-138 fraksiyonu ve glukan standartına ait MS¹ parçalanma iyonlarına ait spektrum (Şekil 4.27, Şekil 4.28) 4000 da 'a kadar olan spektrum alındı. Her ikisinde de büyük moleküler yapıda iyon pikleri gözlemlendi. Spektrumlar parmak izi gibi birbirlerine benzer yapıda bulundu.

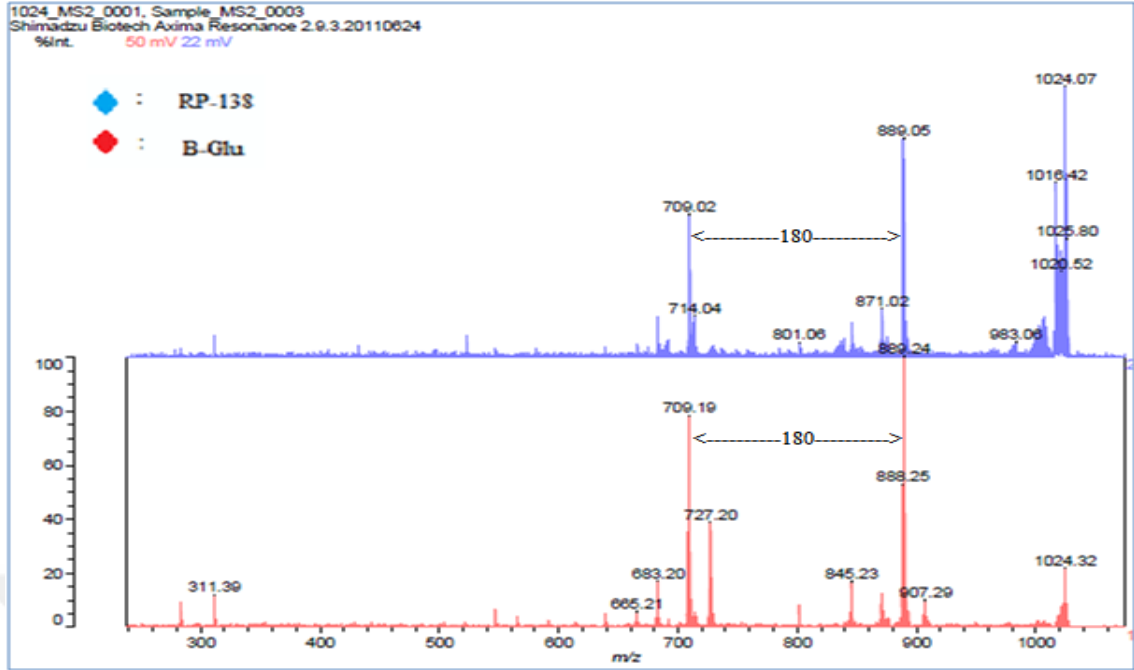


Şekil 4.29. RP-138 numunesi ve glukan standartına ait MS¹ spektrumu ve parçalanmaları. RP-138 numunesi ve glukan standartına ait MS¹ spektrumları üst üste çakıştırıldığında benzer iyon piklerinin ortak bulunduğu gözlemlendi. Bu pikler 1563 m/z, 782 m/z iyon pikidir.



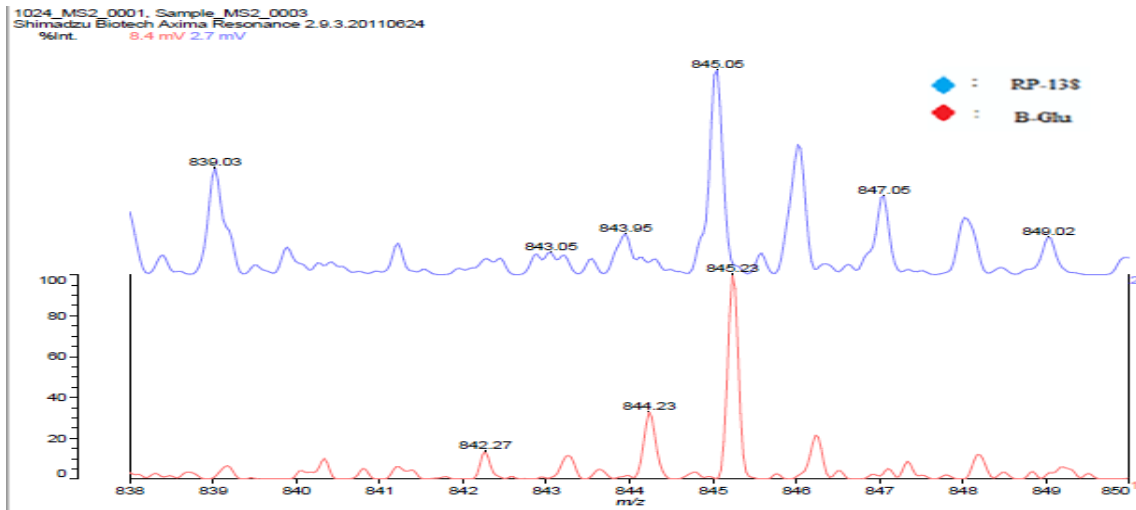
Şekil 4.30. RP-138 numunesi ve glukun standartına ait MS¹ spektrumunun (Şekil 4.29) büyütülmüş hali. 1024 m/z iyon pikleri görülmektedir.

RP-138 numunesi ve glukun standartına ait MS¹ spektrumları üst üste çakıştırılıp büyütüldüğünde 1024 m/z ve 1025 m/z güçlü iyon piklerine rastlanmıştır.



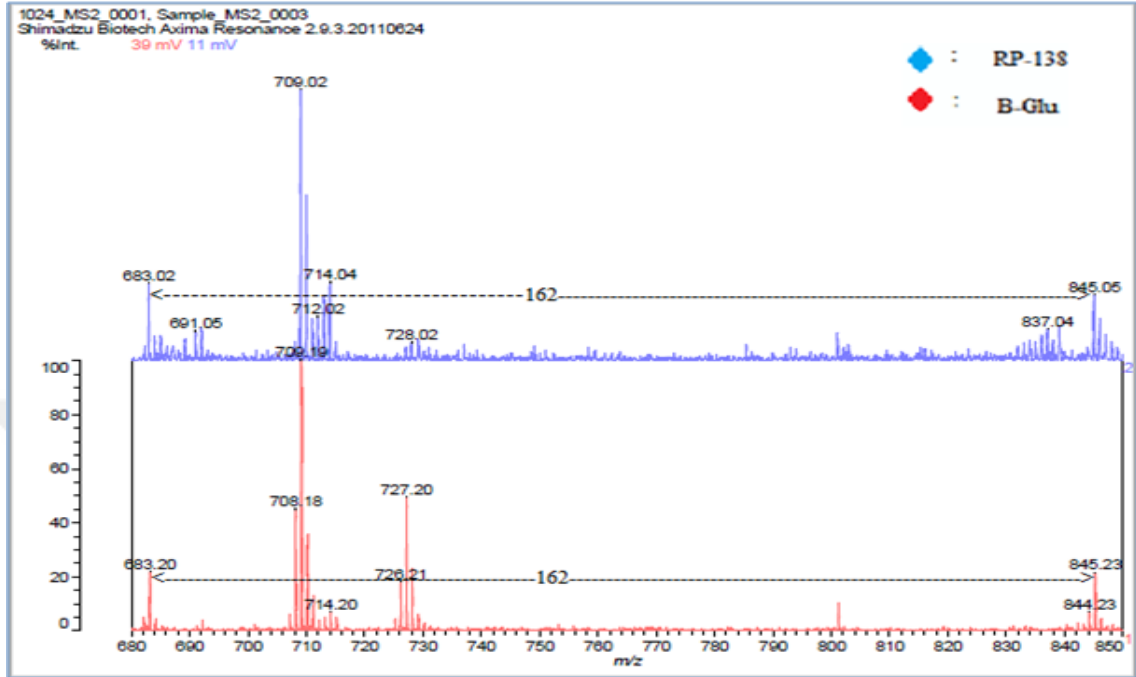
Şekil 4.31. 1024 m/z iyon pikine sahip bileşiğe ait MS² spektrumu ve parçalanmaları.

Şekil 4.30'da gözlenen 1024 m/z iyon pikine ait bileşik seçilerek MS² uygulanmıştır. Burada parçalanmalar olarak 889-709 m/z iyon pikleri gözlenmiştir. Bu iki pik arasındaki kayıp {180} 889 m/z iyon pikini oluşturan yapıdan bir glukoz molekülün koptuğunu göstermektedir.



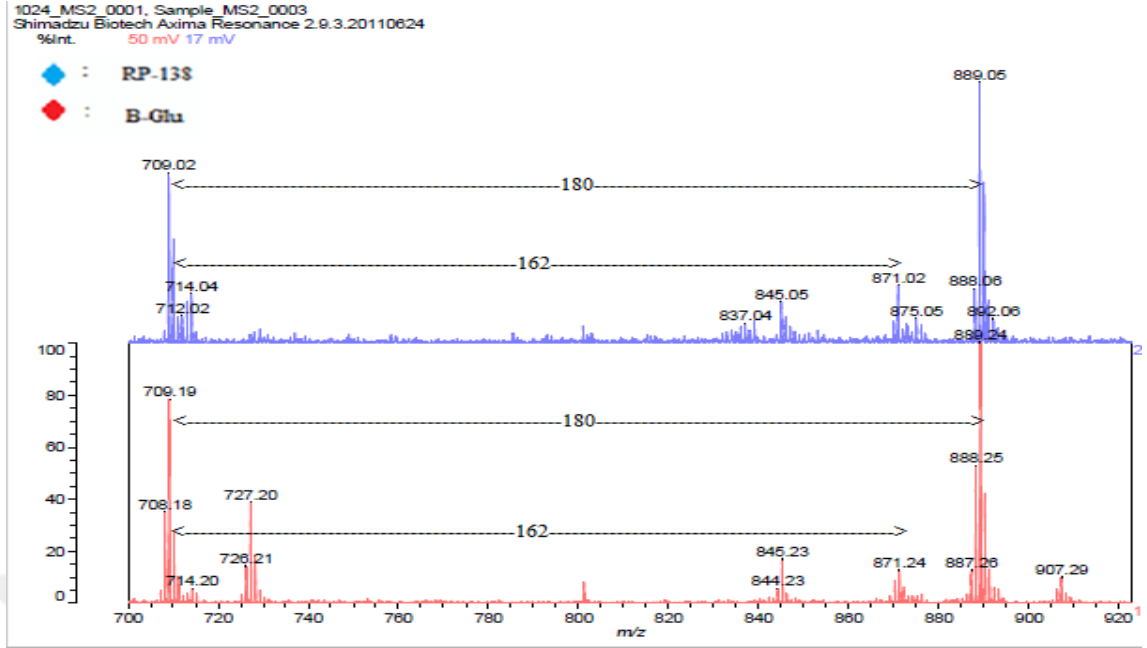
Şekil 4.32. RP-138 numunesi ve glukoz standartına uygulanan MS² spektrumunun (Şekil 4.31) büyütülmüş hali. 845 m/z iyon piki görülmektedir.

Şekil 4.31’de gözlemlenen 845 m/z iyon pikinin büyütülmüş spektrumu gözlenmiştir. Bu iyon pikine sahip bileşiğe MS² uygulanmıştır.



Şekil 4.33. 845 iyon pikine sahip bileşiğe ait MS² spektrumu ve parçalanmaları.

845 m/z iyon pikine ait bileşiğe MS² uygulanmıştır. Parçalanma ürünü olarak 683 m/z iyon pikleri gözlemlenmiştir. Bu iki pik arasındaki kayıp {162} ana yapıdan bir glukoz molekülün koptuğunu göstermektedir.

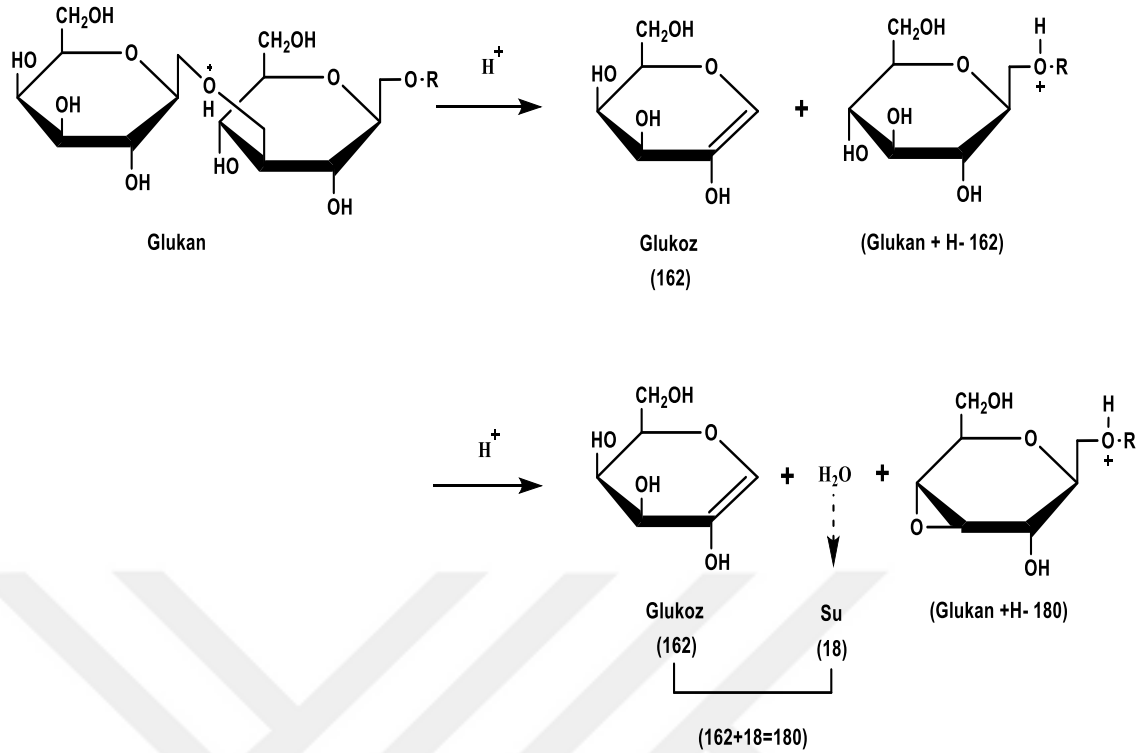


Şekil 4.34. 889 m/z iyon pikine sahip bileşiğe ait (Şekil 4.31) ait MS² spektrumu ve parçalanmaları.

Şekil 4.31’de gözlenen 889 m/z iyon pikine sahip bileşiğe MS² uygulanmıştır. Parçalanma ürünü olarak 709 m/z iyon pikleri gözlemlenmiştir. İyon pikleri arasındaki farklar {180}, {162} burada da ana yapıdan bir glukoz molekülünün ve bir glukoz molekülüne ilaveten bir su molekülünün ayrıldığını göstermektedir.

Değerlendirme

Karbonhidratlara ait sistematik kütle spektrometrisi fragmantasyon nomenklaturüne göre glukanlar pozitif modda iyonize olduklarında protonize olarak $\{M+H-162\}^+$ veya $\{M+H-180\}^+$ iyonlarını oluştururlar. Yani ilk madde protonize olarak yapıdan {162} bir glukoz molekülü kopar veya $\{180=162+18\}$ veya yapıdan glukoz molekülüne ek olarak bir su molekülü kopar. Bu da zincir şeklindeki yapıdan iyonizasyonla birlikte glukoz monomerlerinin teker teker koptuğunu göstermektedir (117). *Ganoderma lucidumun* β -glukan içeriğinin iskelet yapısının MALDI kütle spektrometrisi ile analiz edildiği diğer bir çalışmada da yapıdan kopan moleküller benzer bir şekilde tanımlanmıştır (118).



Şekil 4.35. β -1-3 glukan türevlerinin pozitif mod MS Fragmentasyonu (117).

Genel Değerlendirme

Örneğimiz ve standartımıza ait MS¹ spektrumları incelendiğinde benzer parçalanma ürünlerine ait iyon piklerinin çakışım gösterdiği spektrumlar görülmektedir (Şekil 4.27, 4.28, 4.29).

MS² spektrumlarında ise örnek ve standart için ortak seçilen iyonlara ait parçalanmalarda yapılardan bir molekül glukoz veya glikoza ek olarak bir molekül su koştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.31, 4.33, 4.34).

Bu bilgiler ışığında standartımız olan (1-3)-(1-6)- β -glukan ile RP-138 fraksiyonunun içerik olarak birbirlerine benzedikleri söylenebilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışması kapsamında *T. anaticum* H.H. Doğan & Intini mantarı üzerinde ekstraksiyon çalışmaları, elde edilen ekstreler üzerinde kompozisyon analiz çalışmaları *in vitro* antioksidan etkinlik tayinleri, kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* antikanser etkinlik çalışmaları, polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi üzerinde fraksiyonlama çalışmaları ve antikanser etkinliği en güçlü bulunan fraksiyonun yapısını aydınlatmaya yönelik monosakkarit analizi ve spektrometrik çalışmalar yapılmıştır.

T. anaticum, teşhisi ilk kez ülkemizde yapılan, Akdeniz ve Ege Bölgesi'nde ormanlık alanlarda sedir ağaçları (*Cedrus libani*) altında yetişen özel bir mantar türüdür (10). Yetiştiiği bölgelerde yaşayan halk tarafından toplanılarak gıda olarak tüketilmekte veya Japonya başta olmak üzere Asya ülkelerine yüksek getiri ile ihraç edilmektedir (11).

Bu çalışmada kullanılan tür Japonların Matsutake olarak adlandırdıkları bir mantar ailesine dahildir (19, 20). Bu mantar ailesine ismini veren *T. matsutake* ile ilgili literatürlerde (54, 119-121) ve *Tricholoma* cinsine ait diğer türlerle ilgili literatürlerde (51, 53, 55-57) çok sayıda antikanser etkinlik çalışması yapıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *T. anaticum*'la ilgili antikanser etkinlik çalışmaları yapılarak türün bu anlamda değeri anlaşılmaya çalışılmış; ileride ilaç formuna dönüşebilecek yapılar araştırılmış ve literatürde bu türle ilgili eksikliklere katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

T. anaticum fruktifikasyonlarından 2 adet polisakkaritçe zengin ekstre ve bir adet etanol ekstresi elde edilmiştir. Polisakkaritçe zengin ekstreler; sıcak su ile ekstraksiyon yöntemiyle (39) ve ultrasonik etkiyle su ekstraksiyon yöntemiyle (90) elde edilmiştir. Polisakkaritçe zengin ekstreleri saflaştırmak için ayrıca deproteinizasyon işlemi uygulanmıştır. Etanolik ekstre %85'lik etanol ile hazırlanmıştır (57). Ekstre verimleri en yüksek etanolik ekstre (EE) için %20.6, polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi (PS) için

için %5, ultrasonik etkiyle elde edilen polisakkaritçe zengin su ekstresi (PSU) %1.5 bulunmuştur. Polisakkarit verimi açısından sıcak su ekstraksiyonu daha avantajlıdır.

Elde edilen ekstreler üzerinde kompozisyon çalışmaları yapılmıştır. Toplam fenol, flavonoit ve flavonol ölçümlerinde; flavonol her üç ekstrede, flavonoit ise PS ve EE de tespit edilememiştir. PSU'da tespit edilen flavonoit miktarı ise 0.58 ± 0.44 mg_{CAE}/g_{ekstre} bulunmuştur. Ekstrelerde bulunan toplam fenolik madde miktarları PSU > PS > EE şeklinde sıralanmıştır. Tespit edilen en yüksek miktar olan PSU'ya ait fenolik madde miktarı 10.36 ± 0.53 mg_{GAE}/g_{ekstre} bulunmuştur. Aynı türe ait başka bir çalışmada metanol ekstresinde toplam fenolik madde miktarı 0.265 mg/ml GAE bulunmuştur (68).

Mantarların ana bileşenleri olan protein ve karbonhidratların tespiti ise tüm ekstrelerde toplam şeker ve toplam protein analiziyle saptanmıştır. Toplam şeker içeriği en yüksek PS'de 567.46 ± 26.19 mg_{GE}/g_{ekstre} bulunmuştur. Ekstrenin yarıdan fazlası şeker olarak tespit edilmiştir. Toplam protein miktarı ise en yüksek PSU'da bulunmuş ve 698.03 ± 9.36 mg_{B_{SAE}}/g_{ekstre} olarak tespit edilmiştir. PSU eldesinde PS'ye göre bir fazla basamak deproteinizasyon uygulanmasına rağmen protein içeriği yüksek çıkmıştır. Polisakkarit ekstreleri mümkün olduğunca proteinlerinden ayrılmalı ve saflaştırılmalıdır. Polisakkarit eldesinde; ekstresinde en yüksek şeker içeriğinin tespit edilmesi ve ekstre protein içeriğinin diğer yöntemlere göre daha az olması sebebiyle sıcak su ekstraksiyon yöntemi daha avantajlı bulunmuştur. Yapılan bir çalışmayla *T. matsutake*'den elde edilen polisakkarit ekstrelerinin şeker içeriği ekstreler için %82.13 - %90.76 aralığında protein içeriği ise %0.17 - %1.82 aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen ekstre (PS) göre protein içeriği düşük, şeker içeriği yüksek olan bir polisakkarit ekstresi elde edilmiştir (39). Literatür çalışmasında elde edilen ekstrenin proteinlerinden daha fazla arınmış ve polisakkarit oranı daha yüksek bir ekstre olma sebebinin; tez çalışmasındaki ekstraksiyon prosedürüne ek olarak literatürdeki çalışmada DEAE-Selülöz kolon ile fraksiyonlama yapılması ve Sevag yöntemiyle deproteinizasyon işleminin ardından ekstredeki protein içeriğinin UV spektroskopisi ile kontrol edilerek protein sinyali alınmayana kadar Sevag yöntemiyle deproteinizasyonun tekrar edilmesi olduğu düşünülmektedir.

Antioksidan etkinlik çalışmalarında yine her üç ekstre de çalışılmıştır. Ekstrelerin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme gücü yapılan çalışmayla belirlenmiştir. Her üç ekstre de

çalışılan standartlara göre çok zayıf bir etki göstermiştir. Demir indirgeme güçleri sırasıyla PS, PSU ve EE için 0.055, 0.053 ve 0.038 mmol/g bulunmuştur.

DPPH• radikalini süpürücü etki deneyinde de sonuçlar benzer ve her üç ekstre için zayıf çıkmıştır. IC₅₀ değerleri tüm ekstreler için 6 mg/mL nin üzerindedir. Standartların en düşük etkili bulunan askorbik asittir (AA). AA standardı için IC₅₀ 0.1271 mg/mL tespit edilmiştir.

ABTS⁺• radikalini süpürücü etki deneyi sonuçlarına göre ise standartlar için çalışılan konsantrasyonlar olan 0.1- 0.2 mg/mL için en düşük standart olan rozmarinik asit için sonuçlar 0.38-1.32 mmol/L/troloks iken ekstreler için çok yüksek konsantrasyonlarda çalışılmasına rağmen (3-6 mg/mL) tüm ekstreler için sonuçlar en düşük etkili bulunan rozmarinik asit kadar dahi yüksek bulunamamıştır.

Serbest radikaller tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonu hücrenin yapıtaşı olan lipitlere zarar vererek vücutta istenmeyen etkiler çıkmasına yol açar (122). Ekstrelerin lipid peroksidasyonunu önleyici gücü lipit peroksidasyonunun inhibisyonu deneyiyle ölçülmüştür. Düşük IC₅₀ yüksek etkiyi göstermektedir. Standartlar BHA ve BHT için IC₅₀ 'ler sırayla 0.0236 ve 0.0853 mg/mL aralığındadır. Tüm ekstreler için IC₅₀ değerleri 1 mg/mL'nin üzerinde ve zayıf etkili bulunmuştur.

Spesifik olmayan hidroksil radikali ile yönlendirilmiş 2- deoksiriboz bozunması deneyi sonuçlarına göre polisakkaritçe zengin ekstrelerin IC₅₀ leri 6mg/mL den yüksek ve zayıf etkili EE ise 10 mg/mL 'den yüksek ve daha zayıf etkili çıkmıştır. Başka cinslere ait mantarlarla yapılan hidroksil radikali deneyinde IC₅₀ değerleri o deneylerde kullanılan BHT' ye yakın değerlerde bulunmuştur (123). Literatürde kullanılan ekstreler etanol ekstresi olması sebebiyle çalışmamızdaki EE ile benzerlik göstermektedir. Ancak cinsleri farklı olduğu için bu etkinin çalışmamızda kullanılan EE'de bulunmadığı söylenebilir.

Antioksidan parametreyi gösteren belirteçlerden birisi de fenolik madde miktarıdır (112). Toplam fenol, flavonoit ve flavonol gibi fenolik madde analizlerinde çalışılan ekstrelerin nerdeyse tamamının bu maddelerce çok fakir olduğu görülmektedir. Bu maddelerin fazlaca bulunması antioksidan etkiyi de artıracaktır. Sonuç olarak tüm antioksidan deneylerinin zayıf etkili çıkması ekstrelerde bu içeriklerin olmamasına veya

az miktarda bulunmasına bağlı olabilir. Antioksidan aktivite çalışmaları yönünden literatürde *T. anatolicum*'a ait bir (68), farklı türlere ait (48, 60) iki çalışma vardır. Bu çalışmalarda metanol, diklorometan vb. zclerle veya ham su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstrelerin antioksidan aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Tez çalışmasında ise elde edilen ekstrelerin bazıları (PS, PSU) polisakkaritçe zengin ekstreler olması yönüyle literatürlerdeki ekstrelerden ayrılmaktadır. Aynı türle yapılan çalışmada (68), toplam fenolik madde miktarı 0.265 mg/ml GAE bulunmuştur. Tez çalışmasında elde edilen ekstrelerde ise nerdeyse yok denecek kadar az fenolik bileşik bulunmuştur. Ekstraksiyon zcs farklılığı fenolik maddelerin ekstreye geçmesini etkileyebilir. Bunun sonucu olarak da antioksidan etkinlik dşm olabilir.

Ham ekstrelerin sitotoksik etkinliği kanser hücre hatlarında incelenmiştir. Ham ekstrelerle yapılan deneylerde ortaya çıkan sitotoksik etki zayıf bulunmuştur. Daha güçlü sitotoksik etki görebilmek için polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi fraksiyonlandırılmıştır. Polisakkarit fraksiyonlama işlemleri için literatür gözönüne alındığında, kullanılan kromatografik teknikler iyon değiştirme, jel filtrasyon ve affinite kromatografileridir (104). İyon değiştirme kromatografisi için DEAE-selüloz kolon ve affinite kromatografisi için Con-A Toyopearl I kolon, jel filtrasyon için ise Toyopearl I HW kolon gerekmektedir. Ancak bu kolonların maliyetinin yüksek olması ve proje harcamaları kapsamında temin edilememesi sonucu olarak laboratuvar bünyesinde bulunan maddeler ve kolonlarla ayırım yapılması planlanmıştır. Fraksiyonlama işlemi için kullanılan ilk yöntem Sephadex-LH-20 Kolon Kromatografisidir ve literatürde bulunan yöntemle jel filtrasyon tekniği açısından benzerlik göstermektedir. Partisyon kromatografisi esaslı Ters Faz RP-18 Kolon Kromatografisi ise fraksiyonlandırma için kullanılan başka bir yöntemdir. Bu teknik, oligosakkaritlerinin ayırımının yapıldığı literatürdeki yöntemle partisyon kromatografisi esası sebebiyle benzerlik göstermektedir (105).

Sephadex-LH-20 Kolon kromatografisinin çalışma esası jel filtrasyon olduğu için ekstre içinde bulunan bileşiklerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıldığı düşünülmektedir. Ters Faz RP-18 kolon kromatografisiyle polarite farkı üzerinden ayırım yapıldığı dşnlmştir. Jel filtrasyon tekniğiyle fraksiyonlandırılan ekstreye ait tüplerin ayırım için okumaları YBSK'da, incelenilen madde şeker yapısında olduğu için refraktif indeks dedektörle (RID) yapılmıştır. Ham ekstreye (PS) ait kromatogram ile fraksiyonlara ait

kromatogramlar karşılaştırılarak fraksiyonel ayırım gerçekleştirilmiş ve JEL-6 ve JEL 44 isimli iki fraksiyon elde edilmiştir. Diğer teknik olan Ters-Faz RP-18 kromatografisiyle yine ham ekstre kromatogramı şahitliğinde aynı prosedürle RP-25 ve RP-138 isimli iki fraksiyon daha elde edilmiştir. Ham ekstre (PS) ile gluklan standartına ait kromatogramlar karşılaştırıldığında gluklan standartında gözlenen tek pik olan ve 3. dk.'ya doğru gözlenen pikin ham ekstreya ait kromatogramda gözlenen 3. pik ile hemen hemen aynı zamanda gözlendiği tespit edilmiştir. Bu bilgi ışığında ham ekstredeki 3. pik ile standarta ait pikin aynı zamanda gözlenmesi maddelerin benzeştiğini düşündürmektedir. Ayrıca bahsedilen 3. pik RP-138 fraksiyonuna ait kromatogramda en güçlü şekilde gözlenmiştir.

Ham ekstreler, fraksiyonlar ve gluklan standartı kanser hücre hatlarına uygulanarak 24 saat sonunda MTT sitotoksosite testi uygulanmıştır. HEPG-2 hücre hattı için ekstrelerden ikisi (polisakkaritçe zengin sıcak su ekstresi, etanol ekstresi) proliferasyona sebep olduğu için ölçüm sonuçları değerlendirilmemiştir. Ham ekstrelerle yapılan deneylerde hiç bir ekstre çalışılan hiç bir konsantrasyonda (100, 500, 1000 µg/mL) canlılığı %50'nin altına düşürememiştir. İnhibisyon gözlenen tüm hücre hatları için IC₅₀ değerlerinin 1000 µg/mL'nin üzerinde olduğu öngörülmektedir. Ham ekstrelerde sonuçları genellemek gerekirse en yüksek etkinlik MCF-7 hücre hattında ardından A-549 hücre hattında gözlemlenmiştir. PSU haricinde ekstreler bazı dozlarda COLO-205 hücre hattında proliferasyona yol açmıştır. *T. anatolicum* ile ilgili yapılan başka bir çalışmada vinkristine ve paklitaksele dirençli MCF-7 hücre hatlarına su, metanol ve etanol ekstreleri uygulanmış XTT sitotoksosite testi sonucu olarak vinkristine dirençli hücre hatlarında IC₅₀ 1.08-1.80 mg/mL, paklitaksele dirençli hücre hatlarında ise IC₅₀ 1.11-2.83 mg/mL bulunmuştur (69). Literatürdeki çalışmada IC₅₀ değerleri tez çalışmasında öngörülen IC₅₀'ler gibi 1000 µg/mL'nin üzerinde bulunmuştur. Tez çalışması ve literatürdeki çalışmadaki benzerlik her ikisinin de etanol ekstresi ile çalışılmış olmasıdır. Literatürdeki çalışmada en güçlü etkinlik etanol ekstresinde gözlemlenmiştir. Literatür çalışmada kullanılan ekstrelerin hiçbiri polisakkarit ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanmamıştır. Başka bir çalışmada ise *T. matsutake* misellerinden sıcak su ekstraksiyonuyla elde edilen polisakkaritler B16 insan melanoma hücre hattında 24 saat sonunda 8 mg/mL dozda yaklaşık %51 inhibisyon sağlamıştır. Tez çalışmasında ise 1 mg/mL dozlarda yüksek inhibisyon görülmemiştir. Tez

çalışmasında daha yüksek dozlarda çalışılırsa bu çalışmada tespit edildiği gibi bir etkinlik gözlenebileceği öngörülmektedir (121).

Glukan standartı ile sitotoksisite deneylerinde çalışılan maksimum konsantrasyon 100 mg/mL olmuştur. Bunun sebebi glukan standartının suda çözünürlüğünün az olması dolayısıyla DMSO'da çözülmesi, DMSO'nun fazlasının ise hücre hattında olumsuz sitotoksik etkiler oluşturmasıdır. Çalışılan maksimum konsantrasyon olan 100 mg/mL'de glukan standartı COLO-205 hücre hattı için yaklaşık %43, MCF-7 hücre hattı için %35 inhibisyon sağlamıştır. Yapılan diğer bir çalışmada *S. cerevisia*'den izole edilen β -glukan ekstresi AMN-3 murin (bir sıçan çeşidi) meme adenokarsinom hücrelerinde benzer dozlarda yakın sitotoksik etkinlikler göstermiştir (124). Tez çalışmasında kullanılan glukan standartı da *S. cerevisia* kökenlidir.

Polisakkaritçe zengin ekstre fraksiyonlanırken sitotoksik etkiyi artırmak hedeflenmiştir. Fraksiyonların sitotoksik etkinlik deneyleri fraksiyonlama işleminin büyük oranda sitotoksisiteyi artırdığını göstermektedir. Deney sonuçlarına göre Ters Faz RP-18 kolon kromatografisi fraksiyonu olan RP-138 için sitotoksisite değerleri ilk kez inhibisyon açısından % 50'nin altına düşmüştür. Sonuç olarak canlılıkta A-549 hücre hattı için 1000 mg/mL dozda yaklaşık % 88 inhibisyon, COLO-205 hücre hattı için 500 mg/mL dozda yaklaşık %90, MCF-7 hücre hattı için ise 500 mg/mL dozda yaklaşık %88 inhibisyon sağlanmıştır. RP-138 haricinde diğer fraksiyonların hiçbiri çalışılan hiçbir konsantrasyonda canlılığı % 50'nin altına düşürememiştir. Fraksiyonlama işleminin ham ekstreya göre sitotoksik etkinliği artırdığını gösteren *T. giganteum* ekstre ve fraksiyonları ile ilgili *in vivo* çalışmada tez çalışmasına benzer olarak fraksiyonların bazıları ham ekstrele göre daha etkin bulunmuştur. Ancak fraksiyonlama yöntemi olarak jel filtrasyon ve iyon değiştirici kolonlar kullanılmıştır, tez çalışmasında etkin bulunan fraksiyonun eldesinde kullanılan yöntem ise Ters Faz RP-18 kolon kromatografisidir (55).

Etkin bulunan RP-138 fraksiyonunun yapısını aydınlatmaya yönelik çalışmalardan ilki içerdiği monosakkaritlerin analiz edilip, glukan standartı ile karşılaştırılmasıdır. RP-138 hidroliz edilerek monomerlerine ayrılarak YBSK'da monosakkarit standartları şahitliğinde RID dedektör ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak karşılaştırılan şeker standartlarından %99'dan fazla olarak glukoz, %1'den az olarak fruktoz tespit

edilmiştir. Bu da polisakkarit yapısının büyük çoğunluğunun glukoz monomerlerinden oluşturduğunu gösterebilir. Standart için bu deney tekrarlanmamıştır. Zira standarta ait spesifikasyonlarda sadece glukoz moleküllerinden oluştuğu kayıtlıdır. Standart ve RP-138 fraksiyonu monomerler yönünden benzerlik göstermektedir. *T. matsutake* fraksiyonlarının monosakkarit analizi sonucunda fraksiyonlarda glukoz haricinde galaktoz, mannoz ve fukoz tespit edilmiştir (54). Tez çalışmasında kullanılan fraksiyonlama yönteminin farklılığının veya mantarların tür farklılığının monosakkarit analiz sonuçlarına etki ettiği söylenebilir.

RP-138 fraksiyonuna ait yapı aydınlatma ile ilgili son olarak MALDI-QIT-TOF kütle spektrometrisi ile gluklan standartı (Sigma) ile ve RP-138 kıyaslanmıştır. Bu çalışmalar Ege Üniversitesi ARGEFAR laboratuvarlarında yapılmıştır. Kütle spektroskopisi sonucu elde edilen RP-138 ve gluklan standartı spektrumları karşılaştırılmıştır. Spektrumların parmak izi olarak birbirine benzediği görülmüştür. Spektrumlarda her iki yapıdan da lazer vuruşlarıyla glukoz monomerlerinin ve bazen de buna ek olarak bir molekül H_2O 'nun koptuğu görülmüştür. Burdan yola çıkarak gluklan standartı (Sigma) ile RP-138' in benzerlik gösterdiği RP-138' in bir gluklan türevi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak bu sonucu etkileyebilecek bir etken vardır. O da ham ekstrede (PS) bulunan proteinlerin bu yapıda da bulunma veya polisakkarit ile kompleks yapabilme olasılığıdır. Ham ekstrelerde görülen proteinler fraksiyonlara da geçmiş olabilir. Sitotoksik etki bu proteinlerin varlığından etkilenmiş olabilir. Ancak bunun net bir şekilde değerlendirilmesi için fraksiyonun toplam şeker ve toplam protein analizi yapılmalıdır. Tez çalışması aşamasında elde edilen etkin fraksiyon miktarı çok az olduğu için bu iki deney yapılamamıştır. Ancak literatürde incelenilen çalışmaların çoğunda asıl etkinin polisakkarit yapılardan kaynaklandığı görülmektedir. Ayrıca fraksiyonlandırma aşamasında ham ekstrede bulunan proteinlerin bu yapılardan fraksiyonlama işlemleri sırasında çoğunlukla ayrıldığı düşünülmektedir. Sitotoksik etkinin; karşılaştırılan gluklan standartında da gözlenmesi ve birçok faktörün etkisiyle fraksiyonda bulunan polisakkarit yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ekstre ve fraksiyonların sitotoksik etkinliklerini kanser hücre hatlarında hangi mekanizmalar üzerinden gösterdiği de önemlidir. Bu bağlamda literatürdeki genel bilgidir hareketle kanser hücre hatlarında; polisakkaritlerin apoptozisi indükleyerek veya hücrenin proliferasyonu engelleyerek etkinlik gösterdiği, hayvan deneyleri veya

linik çalışmalarda ise bu etkilere ek olarak immün sistem hücreleri üzerinden veya anjiyonezi engelleyerek etki edip etmediği incelenabilir (36, 86, 87). Tez alışması için kullanılan model hücre hattı modeli olduğu için ekstre veya fraksiyonların apoptozisi indükleyerek veya hücrenin proliferasyonu engelleyerek etkinlik gösterdiği düşünülmektedir. *In vitro* hücre kültüründe *Poria cocos* F.A. Wolf mantarı ile yapılan çalışmada mantardan izole edilen β -glukan türevi bir polisakkaritin apoptozisi, antiapoptotik Bcl-2 genini tketererek indüklediği aynı zamanda hücre proliferasyonunu G1 fazında siklusu durdurarak bitirdiği dolayısıyla bu mekanizmalar üzerinden antikanser etkinlik gösterdiği saptanmıştır (139). Bir polisakkarit ekstresi olan şizofilanın MCF-7 hücre hattında hücre siklusunda G2/M noktasında duraksamayı indükleyerek hücre proliferasyonunu azalttığı bulunmuştur (126). Tez çalışmasında etkin bulunan fraksiyonun da bir glukan türevi olduğu düşünülürse bu mekanizmalar aracılı etki gösterdiği düşünebilir. Bu tarzda bir çok çalışma vardır (127, 128). Ancak fraksiyonun hangi mekanizmalar üzerinden etkinlik gösterdiği bu antikanser etkinlik mekanizmalarını ortaya çıkaran özel deneylerle belirlenebilir.

Ayrıca etkin fraksiyonun yapı tayini ile ilgili daha ileri deneyler yapılarak moleküler yapının tamamen aydınlatılması hedeflenmelidir. Bu alışmalar için ise mali gücü yüksek projelere ihtiyaç bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Keaton WT, Gould G. Genel Biyoloji, Demirsoy A, Türkan I, Gündüz E (Çev. Eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 2004: 647.
2. Sümer S. Genel Mikoloji, Nobel Yayın Dağıtım, İstanbul, 2006: 1-61.
3. Graham LE, Graham JM, Wilcox LW. Bitki Biyolojisi, Işık K (Çev. Edt), Palme Yayıncılık, Ankara, 2008: 143,145-147.
4. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2007: 52.
5. Oyetayo OV. Medicinal uses of mushrooms in Nigeria: towards full and sustainable exploitation. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2011; 8(3): 267-274.
6. Dutta AK, Acharya K. Traditional and ethno-medicinal knowledge of mushrooms in West Bengal, India. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2014; 36-41.
7. Hilszczańska D. Medicinal properties of macrofungi. Forest Research Papers 2012; 73(4), 347-353.
8. Öztürk A, Çopur ÖU. Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. Bahçe 2009; 38(1): 19-24.
9. Tuncer, M. Kanserin ülkemiz ve dünyadaki önemi, hastalık yükü 2. ve kanser kontrol politikaları. In: Tuncer AM (Edt), Türkiye'de Kanser Kontrolü, Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 2009: 5-8.

10. Doğan HH, Akata I. Ecological features of *Tricholoma anatolicum* in Turkey. African Journal of Biotechnology 2011; 10(59): 12626-12638.
11. Allı H, Şen I. *Tricholoma* Türlerinin Yenilebilirliği Üzerine Notlar. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 2016; 4(3): 178-181.
12. Ekşi A. Mantarın gıda teknolojisinde başlıca değerlendirme alanları ve konserveye işlenmesi. Gıda 1980; 5(1-2): 17-23.
13. Kibar B, Pekşen A. Ektomikorizanın tarım ve ormancılık bakımından önemi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2007; 22(2): 232-238.
14. WEB_1. (2016). Naire Çıkayeva Anadolu web site. http://nairecikayeva.anadolu.meb.k12.tr/meb_iys_dosyalar/16/05/964258/dosyalar/2013_12/04104609_bitkilerdebeslenmebymevehareket.pdf (27.12.2016).
15. Steve T. The genus *Tricholoma* in North America. Fungi 2013; 5(5): 23-31.
16. Sánchez-García M, Matheny PB, Palfner G, Lodge DJ. Deconstructing the Tricholomataceae (Agaricales) and introduction of the new genera *Albomagister*, *Corneriella*, *Pogonoloma* and *Pseudotricholoma*. Taxon 2014; 63(5): 993-1007.
17. Kalmış E, Eltem R, Işıloğlu M ve ark. Muğla İlindeki *Tricholoma caligatum* popülasyonlarının belirlenmesi ile *in vivo* ve *in vitro*da kültürel özelliklerinin açığa çıkarılması, TÜBİTAK Projesi, Proje No: 105T128T, İzmir, 2010: 9-49.
18. Bessette AE, Bessette AR, Roody WC, Trudell SA. Tricholomas of North America: a mushroom field guide, University of Texas Press, 2013: 1.
19. Yamada A, Kobayashi H, Murata H, et al. *In vitro* ectomycorrhizal specificity between the Asian red pine *Pinus densiflora* and *Tricholoma matsutake* and allied species from worldwide Pinaceae and Fagaceae forests. Mycorrhiza 2010; 20(5): 333-339.
20. Murata H, Ota Y, Yamaguchi M, et al. Mobile DNA distributions refine the phylogeny of “matsutake” mushrooms, *Tricholoma* sect. *Caligata*. Mycorrhiza 2013; 23(6): 447-461.

21. WEB_2. (2016). Catalogue of Life web site. <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree?6922c09c720816031f6176fa094a686c> (27.12.2016).
22. Duran C, Taşkın H, Büyükalaca S. Adana İli Feka İlçesinde Bulunan Sedir Mantarı (*Tricholoma anatolicum* Doğan&Intini)'nın Ekolojik İsteklerinin Belirlenmesi. Alatarım 2011; 10(1): 42-49.
23. Şen I, Alli H. Conservation of *Tricholoma* species in Turkey. Fungal Conservation 2014; 4: 40-44.
24. WEB_3. (2016). Index Fungorum web site. <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=550062> (25.12.2016).
25. Çavdar H. Bazı *Tricholoma* Türlerinin Besinsel Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 2013: 4-48.
26. Yin X, Feng T, Li ZH, et al. Highly oxygenated meroterpenoids from fruiting bodies of the mushroom *Tricholoma terreum*. J Nat Prod 2013; 76(7): 1365-1368.
27. Tsukamoto S, Macabalang AD, Nakatani K, et al. Tricholomalides A– C, New Neurotrophic Diterpenes from the Mushroom *Tricholoma* sp. J Nat Prod 2003; 66: 1578.
28. Sakai S, Tomomura Y, Yoshida H, Inoue S, Kawagishi H. Orirubenones D to G, novel phenones from the *Tricholoma orirubens* mushroom. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2005; 69(8): 1630-1632.
29. Diez VA, Alvarez A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. Food Chemistry 2001; 75(4): 417-422.
30. Yildiz A, Yeşil ÖF, Yavuz Ö, Karakaplan M. Organic elements and protein in some macrofungi of south east Anatolia in Turkey. Food Chemistry 2005; 89(4): 605-609.
31. Tuzen M, Sesli E, Soylak M. Trace element levels of mushroom species from East Black Sea region of Turkey. Food Control 2007; 18(7): 806-810.

32. Yamaç M, Yıldız D, Sarıkürkcü C, Çelikkollu M, Solak MH. Heavy metals in some edible mushrooms from the Central Anatolia, Turkey. *Food Chemistry* 2007; 103(2): 263-267.
33. Vaz JA, Barros L, Martins A, et al. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT- Food Science and Technology* 2011; 44(1): 343-346.
34. Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira IC. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry* 2010; 119(4): 1443-1450.
35. Liu G, Wang H, Zhou B, Guo X, Hu X. Compositional analysis and nutritional studies of *Tricholoma matsutake* collected from Southwest China. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(12): 1222-1227.
36. Lemieszek M, Rzeski W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemporary Oncology* 2012; 16(4): 285-289.
37. Cheng H, Jia Y, Wang L, et al. Isolation and structural elucidation of a novel homogenous polysaccharide from *Tricholoma matsutake*. *Natural Product Research* 2016; 30(1): 58.
38. Wang H, Liu G, Zhou B, Hu X. Monosaccharide compositional analysis of purified polysaccharide from *Tricholoma matsutake* by capillary gas chromatography. *Journal of Medicinal Plant Research* 2012; 6(10): 1935-1940.
39. Ding X, Feng S, Cao M, et al. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake*. *Carbohydrate Polymers* 2010; 81(4): 942-947.
40. Chen Y, Li XH, Zhou LY, et al. Structural elucidation of three antioxidative polysaccharides from *Tricholoma lobayense*. *Carbohydrate Polymers* 2017; 157: 484-492.
41. Wood WF, Lefevre CK. Changing volatile compounds from mycelium and sporocarp of American matsutake mushroom, *Tricholoma magnivelare*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2007; 35(9): 634-636.

42. Cho IH, Namgung HJ, Choi HK, Kim YS. Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry* 2008; 106(1): 71-76.
43. Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 2004; 25(4): 621-627.
44. Wang HX, Ooi VEC, Ng TB, Chiu KW, Chang ST. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 1996; 79(6): 318-323.
45. Wang HX, Ng TB. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochem Biophys Res Co* 2004; 315(2): 450-454.
46. Guo Y, Wang H, Ng TB. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 2005; 26(4): 575-580.
47. Mallick S, Dutta A, Dey S, et al. Selective inhibition of *Leishmania donovani* by active extracts of wild mushrooms used by the tribal population of India: an *in vitro* exploration for new leads against parasitic protozoans. *Exp Parasitol* 2014; 138: 9-17.
48. Smolskaitė L, Venskutonis PR, Talou T. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology* 2015; 60(1): 462-471.
49. Giri S, Biswas G, Pradhan P, Mandal SC, Acharya K. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research* 2012; 4(4): 1554-1560.
50. Zhao S, Guo YX, Liu QH, Wang HX, Ng TB. Lectins but not antifungal proteins exhibit anti-nematode activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009; 28(2): 265-268.

51. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VEC, Chang ST. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology* 1996; 31(2): 205-211.
52. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VEC, Chang ST. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci* 1995; 57(3): 269-281.
53. Pachón-Peña G, Reyes-Zurita FJ, Deffieux G, et al. Antiproliferative effect of flavomannin-6, 6'-dimethylether from *Tricholoma equestre* on Caco-2 cells. *Toxicology* 2009; 264(3): 192-197.
54. You L, Gao Q, Feng M, et al. Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. *Food Chemistry* 2013; 138(4): 2242-2249.
55. Mizuno T, Kinoshita T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi Y. Antitumor-active heteroglycans from Niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1995; 59(4): 568-571.
56. Liu, F, Ooi VEC, Liu WK, Chang ST. Immunomodulation and antitumor activity of polysaccharide-protein complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. *Gen Pharmacol* 1996; 27(4): 621-624.
57. Chatterjee S, Biswas G, Chandra S, Saha GK, Acharya K. Chemopreventive effect of *Tricholoma giganteum* against benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in Swiss albino mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2014; 26(2): 189-196.
58. Patra P, Bhanja SK, Sen IK, et al. Structural and immunological studies of hetero polysaccharide isolated from the alkaline extract of *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc. *Carbohydrate Research* 2012; 362: 1-7.
59. Lim HW, Yoon JH, Kim YS, et al. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry* 2007; 103(4): 1337-1342.

60. Wang J, Zhao Y, Li W, Wang Z, Shen L. Optimization of polysaccharides extraction from *Tricholoma mongolicum* Imai and their antioxidant and antiproliferative activities. *Carbohydrate Polymers* 2015; 131: 322-330.
61. Ooi VEC. Hepatoprotective effect of some edible mushrooms. *Phytotherapy Research* 1996; 0(6): 536-538.
62. Zhang G, Huang Y, Bian Y, et al. Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006; 72(6): 1152-1156.
63. Chodorowski Z, Waldman W, Sein AJ. Acute poisoning with *Tricholoma equestre*. *Przegl Lek* 2001; 59(4-5): 386-387.
64. Kim SY, Go KC, Song YS, et al. Extract of the mycelium of *T. matsutake* inhibits elastase activity and TPA-induced MMP-1 expression in human fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine* 2014; 34(6): 1613-1621.
65. Ding Q, Yang D, Zhang W, et al. Antioxidant and anti-aging activities of the polysaccharide TLH-3 from *Tricholoma lobayense*. *Int J Biol Macromol* 2016; 85: 133-140.
66. Kalmış E, Yıldız H, Ergönül B, Kalyoncu F, Solak MH. Chemical composition and nutritional value of a wild edible ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma anatolicum*. *Turkish Journal of Biology* 2011; 35(5): 627-633.
67. Deveci E. Yenilebilir Bazı Mantarların Aroma Bileşenlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 2012: 57
68. Uslu U. *Tricholoma anatolicum* Doğan & Intini ve *Cantharellus cibarius* Fr.' un Antioksidan, Antimikrobiyal Etkilerinin ve Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2007: 42-53.

69. Özdemir Ö, Demirel KM, Doğan HH, Gündüz U. Determination of Anticancer and Modulation Effects of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Tricholoma anatolicum* H. H. Dogan & Intini On Breast Cancer Cells. BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium with Exhibition Prague, s 106, 11-14 Haziran 2014, Prag, Çek Cumhuriyeti.
70. Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, 1992; 14-30. 70
71. Hejmadi, M. Introduction to cancer biology. Bookboon 2009: 6-7.
72. Cooper MC, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım (3). Sakızlı M, Atabey N (Çev. Edt.), İzmir Tıp Kitabevi 2006: 636-638.
73. Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. Genel Tıp Derg 2009; 19(3): 138-143.
74. WEB_4. (2016). Bikifi.com web site. [https://bikifi.com/biki/hucre-bolunmesi-ve-ureme-mitoz-bolunme\(19.01.2017\)](https://bikifi.com/biki/hucre-bolunmesi-ve-ureme-mitoz-bolunme(19.01.2017)).
75. Cooper MC, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım (3). Sakızlı M, Atabey N (Çev. Eds), İzmir Tıp Kitabevi 2006: 647.
76. Aliustaoğlu M. Temel Kanser Fizyopatolojisi. Klinik Gelişim 2009; 22(3): 46-49.
77. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiojenezis ve anti-anjiojenik tedavi. Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi 2005; 37(1): 1-6.
78. Akbulut H. Tümör İmmünolojisi ve İmmünoterapi. In: İçli F (Edt), Tıbbi Onkoloji, Antıp Yayınları, Ankara, 1997: 90-95.
79. Yee C. Tumor Immunity and Immunotherapy. In: Pelengaris S, Khan M (Eds), The Moleculer Biology of Cancer A Bridge From Bench to Bedside (2), Wiley-Blackwell, UK, 2013: 411.
80. Canpolat F. Hücre Siklüsü ve Apoptoz. Güncel Dermatoloji Dergisi 2016; 1(1): 11-17.

81. Yardım N, Mollahaliloğlu S, Başara BB. Türkiye'de Kanser Durumu ve Uluslararası Göstergeler İle Uyumunun Değerlendirmesi. In: Tuncer AM (Edt), Türkiye'de Kanser Kontrolü, Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 2009: 51-63.
82. zelik H, Fadıloğlu . Kanser hastalarının tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanım nedenleri. Türk Onkoloji Dergisi 2009; 24(1): 48-52.
83. De Silva DD, Rapior S, Fons F, Bahkali AH, Hyde KD. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. Fungal Diversity 2012; 55(1): 1-35.
84. Ferreira ICFR, Vaz JA, Vasconcelos MH, Martins A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents) 2010; 10(5): 424-436.
85. Altınoy B, elik GY. Fungal Polisakkaritlerin Bazı Biyoaktivite zellikleri. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2016; 25: 53-57.
86. Martinho DJMDF. Effect of mushroom polysaccharides and olive phenolic compounds on human carcinoma cells. Doktora Tezi, Lizbon Üniversitesi Bilimler Fakültesi Hayvan Biyoloji Blm, Lizbon, 2012: 9.
87. Meng X, Liang H, Luo L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. Carbohydrate Research 2016; 424: 30-41.
88. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation, structural characteristics and antitumor activity. Trends in Food Science & Technology 18: 4-9.
89. Sevag MG, Lackman DB, Smolens J. The Isolation of the Components of Streptococcal Nucleoproteins in serologically Active Form. J Biol Chem 1938; 124: 425-36.

90. Zhao L, Dong Y, Chen G, Hu Q. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers* 2010; 80(3): 783-789.
91. Lin CL, Wang CC, Chang SC, Inbaraj BS, Chen BH. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. *Int J Biol Macromol* 2009; 45(2): 146-151.
92. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2007; 2(4): 875-877.
93. Karatoprak G. Tedavide Kullanılan Güney Afrika Kaynaklı *Pelargonium sidoides* Yerine Kullanılabilecek Yeni Bir Bitkisel İlaç: *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2015: 51- 61.
94. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 1999; 64(4): 555-559.
95. Abdel-Hameed ESS. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry* 2009; 114(4): 1271-1277.
96. Safářik IVO, Šantrůčková H. Direct determination of total soil carbohydrate content. *Plant and Soil* 1992; 143(1): 109-114.
97. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1): 265-275.
98. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 1986; 44: 307-315.
99. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 1999; 32(6): 661-667.

- 100.Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9): 1231-1237.
- 101.Aruoma OI, Spencer JP, Warren D, et al. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry* 1997; 60(2): 149-156.
- 102.Ertürk S. *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2013: 46.
- 103.Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165(1); 215-219.
- 104.Smith JE, Rowan N, Sullivan R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *Cancer Research UK, London*, 2002: 91.
- 105.Xiaoli X, Liyi Y, Shuang H, et al. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 2008; 111(1), 215-219.
- 106.Demirpolat E. Potansiyel mPGES-1 İnhibitörlerinin Antikanserojen Etkilerinin A549 Hücrelerinde Araştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2014: 49-50.
- 107.Xu DJ, Xia Q, Wang JJ, Wang PP. Molecular weight and monosaccharide composition of *Astragalus polysaccharides*. *Molecules* 2008; 13(10): 2408-2415.
- 108.Yang B, Jiang Y, Zhao M, et al. Structural characterisation of polysaccharides purified from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Food Chemistry* 2009; 115(2): 609-614.

109. Dallies N, Francois J, Paquet V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14(14): 1297-1306.
110. Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin* 2014; 13(5).
111. Boşgelmez II. Alkol Kullanım Bozukluklarında Proteomik Göstergelerin Tanımlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009: 59-61.
112. Büyüktünel E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2013; 17: 93-103.
113. WEB_5. (2015). Oksante web site. <http://oksante.com.tr/Oksantest.pdf> (25.02.2017).
114. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası* 1995; 48: 253-262.
115. Çaylak, E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2011; 9(1): 73-83.
116. Jacob JP, Pescatore AJ. Barley β -glucan in poultry diets. *Annals of Translational Medicine* 2014; 2(2): 20.
117. Domon B, Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* 1988; 5(4): 399-402.
118. Hung WT, Wang SH, Chen CH, Yang WB. Structure determination of β -glucans from *Ganoderma lucidum* with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Molecules* 2008; 13(8): 1538-1550.

119. Shin J, Kim JS, Hong IS, Cho SD. Bak is a key molecule in apoptosis induced by methanol extracts of *Codonopsis lanceolata* and *Tricholoma matsutake* in HSC-2 human oral cancer cells. *Oncology Letters* 2012;4(6): 1379-1383.
120. Ren, M, Ye L, Hao X, et al. Polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and *Lentinus edodes* enhance 5-fluorouracil-mediated H22 cell growth inhibition. *J Tradit Chin Med* 2014; 34(3): 309-316.
121. Yang S, Ren X, Sheng J, et al. Preparation and the antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from *Tricholoma matsutake*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010: 26(3), 497-503.
122. Mercan, U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 15(1-2): 91-96.
123. Oyetayo VO. Free radical scavenging and antimicrobial properties of extracts of wild mushrooms. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; 40(2): 380-386.
124. Jabber AJ, Mahdi NR, Yaseen NY. The effect of beta glucan extract of *Saccharomyces cerevisiae* on cancer cell growth *in vitro*. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics* 2011; 4: 53-58.
125. Zhang M, Chiu LC, Cheung PC, Ooi VE. Growth-inhibitory effects of a beta glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: Cell-cycle arrest and apoptosis induction. *Oncology Reports* 2006; 15(3): 637-644.
126. Aleem E. The mushroom extract schizophyllan reduces cellular proliferation and induces G2/M arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Life Science Journal* 2011; 8(4): 777-784.
127. Lee SH, Hwang HS, Yun JW. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytotherapy Research* 2009; 23(12): 1784-1789.
128. Youn MJ, Kim JK, Park SY, et al. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 121(2): 221-228.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Çağlayan KOCAKAYA

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 02 Ağustos 1983, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 505 354 46 42

Email: ckocakaya@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi TOKİ Konutları, C3/5 Blok, Daire No: 32

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Ankara, 2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2005-2017	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Eczanesi	Kurum Eczacısı

YABANCI DİL

İngilizce, Arapça.