



**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ MANTAR TÜRLERİNİN ANTI KANSER ETKİLERİNİN**  
**İN VİTRO DA BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞERİFE CAN**

**DANIŐMAN**

**Prof. Dr. RUHİ UYAR**

**ŞUBAT-2010**



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Şerife Can'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Çeşitli Mantar Türlerinin Anti Kanse Etkilerinin In-Vitro da Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih  
28.02.2011

Üye : Prof.Dr. Ziya Kaygısız



Üye : Prof.Dr. Rubi Uyar



Üye : Prof.Dr. Nilüfer Erkasap



Üye : Doç.Dr. Mustafa Yamaç



Üye : Doç.Dr. Selda Kabadere



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04/03/2011 tarih ve 869/4015... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr. Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## 1. ÖZET

Kanser, dünyada ölümcül hastalıklardan biridir ve glial tümörler santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubudur. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler uygulanır. Ancak, çoğu tedavi konakçının normal hücrelerine de zarar verir. Bu yüzden, kanser tedavisinde doğal ürünlerin kullanılmasına izin verilmiştir. Mantarlar, yüzyıllar boyunca yiyecek olarak tüketildiği gibi birçok hastalığın tedavisi için ilaç olarak kullanılmışlardır. Çalışmamızda altı adet yenilebilir mantar türünden (*Coprinus comatus*, *Fistulina hepatica*, *Lentinus strigosus*, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus squamosus* ve *Lenzites betulina*) elde edilen özütlerin sıçan glioma hücre dizisi (C6) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. C6 hücreleri 37 °C’de, % 5 CO<sub>2</sub> bulunan in vitro ortamda çoğaltıldı. Hücreler daha sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL ekzopolisakkarit dozları ile inkübe edildi. 24 ve 48 saat sonunda ekzopolisakkaritlerin etkisi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, (MTT) yöntemi ile belirlendi. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) ardından Tukey’in çoklu karşılaştırma yöntemi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre, 0.4 µg/mL dozunda etki gözlenmemiştir. Ancak, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozlarının glioma hücrelerini % 35’den % 80’ e kadar öldürdüğü bulunmuştur. Sonuç olarak, ekzopolisakkaritlerin glioma hücrelerini zamana ve doza bağlı olarak öldürdüğü tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcük:** Glioma, in vitro, kanser, mantar.

## 2. SUMMARY

Cancer is one of the major worldwide fatal diseases and glial tumors are the largest group of central nervous system tumors. Chemotherapeutic, radiotherapeutic and surgical methods exist for the treatment of cancer in modern medicine however, most cancer therapeutic methods severely affect the host normal cells. Hence, the use of natural products now has been contemplated of exceptional value in the control of cancer. Mushrooms have been used for many centuries, not just as a food, but also to treat many illnesses. In this study the effects of exopolysaccharides from edible mushroom species (*Coprinus comatus*, *Fistulina hepatica*, *Lentinus strigosus*, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus squamosus* and *Lenzites betulina*) were investigated on the rat glioma cell line (C6). C6 cells were cultured in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C in flasks. The C6 cells were then seeded in 96 well plates and exposed to 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL fungal exopolysaccharides doses. After 24 or 48 hours, the action of each exopolysaccharides dose was measured by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, (MTT) assay. All statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and followed by Tukey's multiple comparison tests. According to our results 0.4 µg/mL was not effective, but 1, 2, 4 and 6 µg/mL doses killed glioma cells about % 35 to % 80. As a result, these mushroom exopolysaccharides were time and dose dependently toxic to glioma cells.

**Key words:** Cancer, glioma, in vitro, mushroom.

## İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	V
2. SUMMARY.....	VI
3. ÇİZELGE DİZİNİ.....	IX
4. ŞEKİL DİZİNİ.....	X
5. SİMGE VE KISALTMALAR.....	XI
6. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
7. GENEL BİLGİLER.....	3
8. Mantarlar Hakkında Genel Bilgi.....	3
8.1.Çalışmada Kullanılan Mantar Türlerinin Kısa Tanımları.....	4
8.1.1. <i>Coprinus comatus</i> .....	6
8.1.2. <i>Fistulina hepatica</i> .....	7
8.1.3. <i>Lentinus strigosus</i> .....	8
8.1.4. <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	8
8.1.5. <i>Polyporus squamosus</i> .....	9
8.1.6. <i>Lenzites betulina</i> .....	10
9. Kanser .....	14
9.1.Glia Hücreleri.....	14
10. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
11. Mantar Ekzopolisakkaritinin Elde Edilmesi.....	18
12. Glia Hücre Kültürünün Yapılması.....	20
12.1. Kültür Öncesinde Yapılan Hazırlıklar.....	20
12.2. C6 Hücrelerinin Ekimi.....	20
12.3. C6 Hücrelerinin Deneye Alınması.....	21
12.4. Mantar Dozlarının Hazırlanması.....	21
13. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	22
14. BULGULAR.....	24
15. TARTIŞMA.....	30
16. SONUÇ.....	33
17. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	34

18. ÖZGEÇMİŞ.....	39
-------------------	----



### 3. ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1: Kullanılan mantarların sistematığı ve toplama bölgeleri	5
--	---

#### 4. ŐEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Coprinus comatus</i> mantarının dış görüntüsü	6
Şekil 2: <i>Fistulina hepatica</i> 'nın dış görüntüsü	7
Şekil 3: <i>Lentinus strigosus</i> mantarının dış görüntüsü	8
Şekil 4: <i>Laetiporus sulphureus</i> mantarının dış görünüşü	9
Şekil 5: <i>Polyporus squamosus</i> 'un dış görüntüsü	10
Şekil 6: <i>Lenzites betulina</i> mantarının dış görüntüsü	11
Şekil 7: Beta-(1-3) ve �-(1-4) glukan bağlardan oluşmuş polisakkarit yapı	12
Şekil 8: Potato Malt Medium içeren erlenlerde üreyen misel hücreleri	19
Şekil 9: Filtre kağı yardımı ile misel ve s�z�nt� olarak ayrılan sıvı besiyeri	19
Şekil 10: <i>Coprinus comatus</i> mantarının 24 veya 48 saatte C6 hücrelerine etkisi	24
Şekil 11: <i>Fistulina hepatica</i> mantarının C6 hücrelerine 24 ve 48 saatte etkisi	25
Şekil 12: <i>Lentinus strigosus</i> mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi	26
Şekil 13: <i>Laetiporus sulphureus</i> mantarının 24 ve 48 saat sonra C6 hücrelerine etkisi	27
Şekil 14: <i>Polyporus squamosus</i> mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi	28
Şekil 15: <i>Lenzites betulina</i> mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi	29

## 5. SİMGE ve KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
PSP	Polisakkaropeptid
PSK	Polisakkarit-K
GD	Grifon-D
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
GFAP	Glial fibriller asidik protein
NGF	Sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor)
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor)
GDNF	Glia kökenli nörotrofik faktör (Glial-derived neurotrophic factor)
CTNF	Siliar nörotrofik faktör (Clary Nerotrophic factor)
EGF	Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
HGF	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
GBM	Glioblastoma multiforme
PDA	Patato dekstroz agar

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FCS	Fetal calf serum
DMSO	Dimetil sulfoksit
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
UACC-62	Melanoma kanseri
MCF-7	Meme kanseri
TK-10	Böbrek kanseri
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
SMMC-7721	İnsan hepatoma hücreleri
RINm5F	Pankreas kanseri
LNCaP	Prostat kanseri
(IL)-1 $\beta$	İnterlökin-1 $\beta$
(TNF)- $\alpha$	Tümör nekrozis faktör alfa
IL-6	İnterlökin- 6
(IFN)- $\gamma$	İnterferon-gama
GLme	<i>Ganoderma lucidum</i> mantarına ait terpenoid
GLpme	<i>Ganoderma lucidum</i> mantarına ait asidik terpenoid
p38 MAPK	p38 MAP Kinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells





## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarının başında yer alan kanser dünya çapında kabul edilemeyecek kadar fazla sayıda bireyi ilgilendiren bir hastalıktır. Kanserli hücreler radyoterapi ya da kemoterapi gibi tedavi yöntemleriyle engellenmeye çalışılsa da yan etkilerinden dolayı doğal ürünler ya da bitkisel ilaçlarla yapılan çalışmalar gün geçtikçe daha çok tercih edilmektedir (44). Bu nedenle son yıllarda insan sağlığının çeşitli hastalıklar ve özellikle de kansere karşı duyarlılığından dolayı alternatif tıbbın gittikçe ilerlediğini görüyoruz.

Yapılan literatür çalışmalarında alternatif tıbbın küçük oranda bile olsa etkili olabildiği ancak bu konuda yeterli çalışmanın olmadığı belirtilmektedir (2). Mantarlar ile insanlar arasındaki ilişki çok eski zamanlara dayanmaktadır (50). Günümüzde doğal ürünler arasında sıkça tercih edilen mantarlar Çin, Japonya ve diğer Asya ülkelerinde yıllarca hem yiyecek hem de tedavi edici olarak kullanılmışlardır (61). Farmakolojik olarak önemli doğal ürünler arasında düşünülen mantarların (52), hücre duvarındaki kitin, hemiselüloz, mannoz ve beta glukun gibi bileşenlerinden dolayı kan şekeri ve kolesterolü düşürdüğü, bakteri, virüs ve parazitik enfeksiyonlara karşı direnç oluşturduğu, ayrıca antikanser etkisinin olduğu belirtilmektedir (6). Örneğin, *Polyporaceae* familyasına ait bir Basidiyomycetes üyesi olan *Phellinus linteus*' dan elde edilen polisakkaritin antitümör etkisi ilk kez 1968' de rapor edilmiştir. Farklı mantar türlerini konu alan araştırmalar, bu tarihten sonra oldukça yoğunlaşmıştır (23). Çin' de ve diğer Asya ülkelerinde yaşam süresini uzatıcı olarak bilinen *Ganoderma lucidum*, antikanser etkisi olan polisakkarit yapısıyla dikkat çekmektedir. Deney hayvanları kullanılarak, *Ganoderma lucidum*' un ham veya kısmi olarak saflaştırılmış polisakkaritlerinin, lokal olarak yerleşmiş karaciğer kanserli hücrelerin çoğalmasında önemli oranda baskılayabileceği ve farelerde tümör metastazlarını azaltabileceği gösterilmiştir. Antitümör etkinin mekanizması tam olarak açık değildir ancak *Ganoderma*' nın polisakkaritlerinin *in vivo* antitümör aktivitesinin, konakçının immun yanıt sağlaması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (32).

Hayvan beyin tümörlerinin, insan beyin tümör modelleri ile olan benzerliklerinden dolayı sıçan glioma modeli deneysel çalışmalarda sık kullanılmaktadır. Primer beyin tümörlerinin % 60 kadarını oluşturan gliomalar merkezi sinir sisteminde nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açan bir kanser türüdür (15). C6 glioma hücrelerinin hızla bölünebilme ve tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma özelliklerine sahip olmalarından dolayı ilaç etkileşimi çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (16).

Besin içeriği, doğal işlevleri ve tıbbi etkileri gibi çok yönlü özellikleri olan mantarların, insanlık için en iyi düzeyde faydalanılması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca ülkemizde bulunan mantarların antikanser aktivitesi hakkındaki çalışmaların az sayıda olduğunu görmekteyiz. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda kullandığımız mantarların antikanser özelliklerini araştırmak ve bulgularımızın daha sonraki çalışmalara bir başlangıç olması amaçlanmıştır.



## 7. GENEL BİLGİLER

### 7.1. Mantarlar Konusunda Genel Bilgiler

Mantarlar organik madde ve nemin bulunduğu hemen her yerde yaşayabilen organizmalardır. Toprakta yaşayan bazı mantar türleri organik maddeleri parçalayarak toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısına katılarak ekolojik dengenin sürdürülmesinde katkıda bulunurlar. Ayrıca, ekmeğin kabarması ile bira ve şarabın mayalanmasında mantarlardan yararlanılır. Bitki, insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara, zehirlenmelere ve alerjiye neden olabildikleri gibi birçok yararları da bulunmaktadır. Örneğin bazı mantarlar besin maddesi olarak tüketilirken bazıları antibiyotik ve diğer ilaçları üretmek için kullanılırlar (5).

Mantarların çoğu çok hücreli organizmalardır, fakat genel beslenme şekilleri, yapıları ve üremeleri açısından diğer çok hücrelilerden farklıdırlar. Klorofilsiz ve besinlerini emilim ile kazanan heterotroflardır. Besinini, ekzoenzim olarak adlandırılan enzimler sayesinde hücre dışında sindirirler. Bu güçlü hidrolitik enzimleri besin üzerine salgılayarak, karmaşık molekülleri kullanabileceği daha basit bileşiklere parçalarlar. Emilim ile gerçekleştirilen beslenme şekli mantarlara ayrıştırıcı (saprofit), parazit ya da ortaklık (mutualistik) özellik kazandırır. Saprofitik mantarlar besinlerini yere düşmüş ağaç gövdeleri, hayvan ölüleri ve canlı organizma artıkları gibi cansız organik maddelerden alırlar. Mutualistik ve parazitik mantarlar besinlerini canlı konakçısının hücrelerinden emerler. Ancak, mutualistik mantarlar ilişki kurdukları organizmaya bazı yararlar sağlar (5).

Mantarların vejetatif yapısı hif olarak adlandırılan ince iplikçiklerden oluşur. Hifler büyüyerek dallanır, bazıları diğerleri ile kaynaşma yapar ve sonuçta hif yığınları olan “misel” yapısını oluşturur. Miselyumun ipliksi yapısı mantarlara geniş yüzey alanı sağlayarak emilim yoluyla beslenmelerine yardımcı olur. Mantarlar eşeyli yada eşeysiz olarak çok sayıda üretilen sporları çevrelerine salarak ürerler. Rüzgar ya da su ile taşınan sporlar, besin içeren nemli ortamlara yerleşince misel oluşturmak için çimlenerek mantar türlerinin geniş alana yayılmasını sağlarlar (5).

Mantarlar şeker, protein, vitamin (B, C, D, K) ve mineraller (kalsiyum, potasyum, fosfor ve bakır gibi) içermelerinden dolayı önemli bir besin maddesi olarak düşünülmektedirler (8). Ayrıca, geleneksel doğu halk tıbbında tarih boyunca tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Örneğin; kronik bronşit, hepatit, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, tümör hastalıkları ve bağışıklık sistemiyle ilgili hastalıklardan tıbbi amaçla kullanılan mantarların daha çok yenilebilen türler olduğu belirtilmektedir (30). Bu tip mantarlar ile yapılan çalışmalar, mantarların antitümör, antimikrobiyal, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğunu göstermektedir (48). Fakat yenilebilir mantarların sadece yüzde ondan az bir oranının antitümör etkisi olduğu kanıtlanmıştır (18).

#### **7.1.1. Çalışmada Kullanılan Mantar Türlerinin Kısa Tanımları**

Çalışmamızda kullandığımız 6 adet mantar türünün kısa tanımları ve toplandığı bölgeler Çizelge I'de verilmiştir. Örnekler toplandıktan sonra laboratuvarında uygun koşullar altında kurutularak saklanmıştır.

Çizelge I: Kullanılan mantarların sistematığı ve toplama bölgeleri.

Cins ve Tür	Aile	Takım	Sınıf	Toplandığı Bölge	Kod Adı
<i>Coprinus comatus</i>	Coprinaceae	Agaricales	Agaricomycetes	Eskişehir, Merkez	OBCC 1014
<i>Fistulina hepatica</i>	Fistulinaceae			Eskişehir, Merkez	OBCC 1035
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Fomitopsidaceae	Polyporales		Eskişehir, Merkez	OBCC 1012
<i>Lentinus strigosus</i>	Polyporaceae			Sakarya, Gevye	OBCC 5004
<i>Polyporus squamosus</i>				Sakarya, Gevye	OBCC 5003
<i>Lenzites betulina</i>				Eskişehir, Sarıcakaya	OBCC 2001

#### 7.1.1.1. *Coprinus comatus*

Büyüklüğü ve pullu şapkası ile kolayca tanınan ve çok çabuk büyüyen bir mantardır (Şekil 1). Bahçelerde, parklarda, yeni inşa edilmiş yolların kenarlarında, ekilmiş tarlalarda, çöplüklerde ve yerleşim yerlerine yakın olan zengin topraklarda yetişir. Büyük kümeler halinde mayıs ayından kasım ayına kadar görülebilir. Kokusu ve tadı hoştur. Yazın ve sonbaharda özellikle yağmurdan sonra çok fazla miktarda ortaya çıkar. Genç ve henüz büyümemiş örnekler kapalı halde çayırlar arasında saklanmış yumurta gibi görünür. Şapkasının yüksekliği 6-20 cm ve genişliği 3-6 cm olabilir. Renkleri beyazdan kahverengiye kadar değişik tonlarda olabilir. Şapkanın merkezi düz yapıda ve kenarları çizgilidir, yaşlanıp sıvı haline gelirken leylak renginden siyaha dönüşür. Kiremit gibi birbirinin üzerine sıralanan ve geriye kıvrılan kaba tüyleri vardır. Lameller genç halde sık, renkleri ise başlangıçta beyazdan kahverengiye, daha sonra olgunlaşan sporlardan dolayı siyaha döner. Sapının kalınlığı 1-2 cm ve boyu 8-25 cm kadardır. Sapın içi boş ve lifli, dip kısmı ise şişkindir. Etli kısmı beyaz, ince, yumuşak ve suludur. Spor içi siyahımsıtrak mordur (51).



Şekil 1: *Coprinus comatus* mantarının görünümü (63).

### **7.1.1.2. *Fistulina hepatica***

Yenilebilen bir mantar türüdür. Dikkat çekecek kadar renkli ve göze çarpacak kadar büyük olduğu için kolayca tanınır (Şekil 2). Ağaçların ve kütüklerin üzerinde bol bulunurlar. Özellikle kestane ve meşelerin gövdesi üzerinde gelişirler ama dişbudak, ceviz, söğüt, gürgen ve karaağaç da yaşam ortamlarındandır. Ağustos ayından kasım ayına kadar görülebilirler ve yaklaşık bir yıllık ömrü vardır. Lezzetli tadına rağmen tomik asit içerdiğinden dolayı ağız buruşturucu etkisi vardır. Gençken krem renginde ciğer, dil veya yarım daire şeklinde görülür. Bu nedenden halk arasında biftek, öküzdili veya ciğer mantarı olarak da adlandırılır. Olgunlaşınca at tırnağına benzeyebilir ve kümelenmiş tüylerinden dolayı pürüzlü ve kadifemsi görünümü vardır. Üst yüzeyi yumuşak ve jelatin gibi yapışkan olup, renk bakımından morumtrak kırmızı veya kahverengidir. Kalınlığı 2-6 cm ve büyüklüğü 5-50 cm kadar olabilir. Sapı 3-7 cm uzunluğunda ve 2-4 cm kalınlıktadır. Etili kısmı kırmızımsı, yumuşak, lifli ve damarlı yapıdadır. Kesildiği veya kırıldığı zaman kan kırmızısı bir sıvı çıkar. Sporları beyaz renktedir. Alt yüzeyde yer alan delikçikler, önceleri krem renkli sonraları sarı rengini alırlar. Eğer ezilirlerse renkleri koyulaşır. Ağızları soluk et renginde ve yuvarlaktır (51).



Şekil 2: *Fistulina hepatica* 'nın dış görüntüsü (67)

### **7.1.1.3. *Lentinus strigosus***

Yenebilir bir mantar türüdür. Canlı ve ölmüş ağaç gövdelerinde kümeler halinde bulunurlar (Şekil 3). Sap kısmı 1-2 cm uzunluğunda, şapkası ise 2,5- 7,5 cm genişliğindedir. Şapkasının ters açılmış şemsiye benzeri bir şekli vardır. Alt yüzeyleri açık kahverengidir. Sporlarının dış yüzeyi beyazdan krem renge kadar değişiklik gösterir. Mayıs ayından Kasım ayına kadar görülebilir (9).





Şekil 3: *Lentinus strigosus* mantarının dış görüntüsü (70).

#### **7.1.1.4. *Laetiporus sulphureus***

Yaygın olarak görülen yenilebilir bir mantar türü olup, kükürt mantarı olarak da bilinmektedir (Şekil 4). Meşe, kiraz, kestane, söğüt, porsuk, ladin ve köknar ağaçlarında yaşar. Ömrü bir yıl kadardır. Şapkası 10-40 cm genişliğinde, birbirlerinin üzerinde katmanlar halindedirler. Genç halde iken etli, yumuşak, nemli ve üst kısmı açık portakal kırmızısı renge, kenarları daha açık renktedir. Alt yüzü parlak kükürt sarısı rengindedir. Olgunlaşınca sert ve gevrek bir yapıda olup kirli beyaz ya da tebeşir rengine dönmektedir (51).



Şekil 4: *Laetiporus sulphureus* mantarının dış görünüşü (69).

#### **7.1.1.5. *Polyporus squamosus***

Büyüklik, renk ve şekil bakımından dikkat çekecek kadar değişkendir. Peri semeri mantarı ya da pullu mantar olarak da adlandırılır (Şekil 5). Mevsim sonuna kadar böcek kurtçukları tarafından istila edilirler. Sporları beyazdır. Mayıs ve eylül ayları arasında yaygın görülür. Kayın, söğüt, ceviz, kavak, ıhlamur ve diş budak ağaçlarının gövdeleri ile kütüklerinde tek tek veya birbirleri üzerine sıralanmış katlar halinde bulunurlar. Bir yıllık ömrü vardır. Karanlık yerlerde geliştiği zaman şapka meydana gelmez. Sapı dallanır ve geyik boynuzumsu gibi oluşumlar halinde uzar. Yağmurdan sonra çok çabuk büyür ve birkaç kilogram ağırlığa ulaşabilir. Genç örnekler çok lezzetlidir. Şapkası 10-50 cm büyüklükte, böbrek şeklinde, yatay ve yassıdır. Sap kısmı kalın, kısa ve uç tarafı beyazdır. Orta kısmı soluk krem renkli ağ gibidir fakat dip tarafa doğru kahve renkli veya siyahtır. Şapkaya yandan birleşiktir. Etli kısmı krem renkli veya beyazdır (51).





Şekil 5: *Polyporus squamosus*'un dış görüntüsü (64,65).

#### **7.1.1.6. *Lenzites betulina***

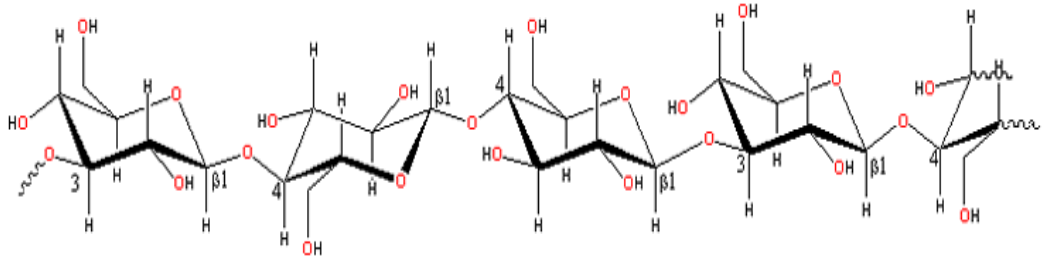
Kadifemsi yapıda olup kenarları keskindir. Yaprak döken ağaçların ölü dal parçaları üzerinde tüm yıl boyunca görülebilir (Şekil 6). Krem renginden toprak kırmızısına, griden kahverengi tonlarına kadar çeşitli renklerde olabilir. Üst yüzeyi radial dalgalı ve oyuktur. Aynı noktadan başlayan dar tabakalar vardır. Sporları yarı yuvarlak, yelpaze veya rozet şeklindedir. Santimetrede 12-15 adet lamel bulunur. Lamellerin kalınlığı yaklaşık 1 cm ve kenarları hafifçe tırtıklıdır (51).



Şekil 6: *Lenzites betulina* mantarının dış görüntüsü (66).

Mantarların ürettikleri ve büyüme ortamına salgıladıkları eksopolisakkaritlerin birçok farklı yapılarının olduğu belirtilmektedir (50). Doğada yaygın olarak bulunan polisakkaritler, monosakkarit polimerlerinin birbirlerine glikozidik zincirlerle bağlanmalarıyla oluşmaktadırlar. Bazen de kovalent zincirler ve aralarında pek çok çift karbon atomlarından meydana gelmektedirler. Bu moleküllerin yapısı oldukça karmaşıktır (61). Prokaryotik mikroorganizmaların çoğu hücre yüzeylerine cıvık ya da yapışkan materyal salgılayabilir. Farklı polisakkarit ve proteinlerden oluşan bu yapılar kapsül veya “slime layer” (cıvık tabaka) olarak adlandırılır. Daha genel bir terim olarak, “glikokaliks” terimi de kullanılmaktadır (3). Polisakkaritler yapısal değişkenlik bakımından mükemmel bir potansiyele sahip olmalarından dolayı makromoleküller arasında biyolojik etkisi en yüksek olanlardır. Nükleotidlerdeki nükleik asitler ve proteinlerdeki aminoasitler birbirlerine tek bir yolla bağlanabilirken, polisakkaritler çok sayıda farklı formlardaki bağlardan ya da düz yapılardan oluşmaktadırlar. Örneğin, dört aminoasit sadece 24 farklı yolla birbirine bağlanabilirken, farklı dört monomer şeker  $35560^7$  a kadar değişik yapı oluşturarak tetrasakkaritler ile eşsiz bir şekilde bağlanabilir. Polisakkarit yapılarındaki bu değişkenlik özelliği gelişmiş organizmalarda çeşitli hücrelerin birbiri ile etkileşimlerinin düzenlenmesi için gerekli olan esnekliği

sağlamaktadır (21). Mantarlardaki polisakkaritlerin küçük bir kısmı aspartik ve glutamik asitce zengin olmasına rağmen çoğunlukla glukulardan meydana gelmektedir (34). Glukan yapısı beta-(1-3), (1-6) ve alfa-(1-3) glikozidik zincirlerin birbirine bağlanmasından oluşmaktadır. Heteroglukanların yan zincirlerinde glukuronik asit, galaktoz, mannoz, arabinoz veya ksiloz farklı değerlerde bulunmaktadır (61) (Şekil 7).



Şekil 7: Beta-(1-3) ve  $\beta$ -(1-4) glukan bağlarından oluşmuş polisakkarit yapısı (68).

Mantarlar tarafından üretilen ve antitümör etkisi olan lentinan schizophyllan ve krestin ticari olarak üretimi ve satışı yapılan eksopolisakkaritlerdir (39). *Lentinus edodes* tarafından üretilen ve dünyada bolca tüketilmekte olan lentinan, hücre duvarı yapısına katılan saf polisakkarittir. Lentinan karbon, hidrojen ve oksijen atomlarından oluşmuş, suda çözünebilir ve ısıya dayanıklı bir bileşiktir. Biyolojik etkinliği tam olarak bilinmeyen lentinanın kanserli hücreye karşı doğrudan etkisinin olmadığı fakat hastanın bağışıklık sistemini güçlendirerek antikanser etkinlik gösterdiği vurgulanmıştır. Özellikle Japonya’da kemoterapi esnasında, bağışıklık sistemini güçlendirici ve kemoterapinin neden olduğu saç dökülmesi, ağrı vb. yan etkileri azaltmak amacıyla ile kemoterapik ajanlarla birlikte hastalara verilmektedir (7, 49, 62). Kanser tedavisinde kullanılmasının yanında günümüzde hazır yiyecek maddesi olarak karşımıza (örneğin; Shiitake-çikolatası) çıkmaktadır. Ayrıca güneş yanıklarına ve kazanılmış immun eksikliği hastalığı (Acquired Immunodeficiency syndrome, AIDS) kadar pek çok farklı hastalıkta kullanım alanı bulunmaktadır (37). Schizophyllan eksopolissakkaridi suda eriyebilir, yüksek stabiliteye sahip, yapışkan ve  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6 )-yapıda bir glukandır. Schizophyllan maddesinin geleneksel kemoterapide kullanılmasına ilişkin hastalar üzerinde yürütülen çalışmada, tedavisi olmayan mide kanserinde ortalama yaşam süresinde önemli artışlara neden olduğu belirtilmiştir (12).

Schizophyllan yakın zamanda yapılan birçok çalışmada gırtlak kanseri hastalarında da önemli iyileşmeler sağlamıştır. Düzenli yapılan çalışmalarda Schizophyllan' ın radyoterapiyle birlikte kullanımlarında, ikinci seviye kanser vakalarında önemli iyileşmeler sağladığı fakat üçüncü seviye vakalarda etkisinin olmadığı görülmüştür (42, 43). Krestin ise *Trametes versicolor* mantarının misellerinden elde edilen proteine bağlı bir polisakkarittir. Polisakkaropeptid (PSP) olarak da bilinmektedir. Polisakkarit-K (PSK) ve PSP'nin fizyolojik aktiviteleri benzer olmasına rağmen yapısal yönden farklılıklar bulunmaktadır. PSP az miktarda galaktoz, ksiloz, arabinoz ve ramnoz içermektedir, fakat fukoz içermez, ancak fukoz PSK' da vardır. PSK' da ise arabinoz ve ramnoz yoktur. Her ikisinin de antitümör etkiye sahip oldukları belirtilmektedir (11, 20, 46). Yapılan bu çalışmaların yanı sıra *Grifola frondosa* türünden elde edilen  $\beta$ -D-glukanın (Grifon-D, GD) güçlü antitümör etkiye sahip olduğu görülmüştür. *Grifola frondosa*' dan elde edilen polisakkaritin kimyasal yapısı ve bu maddelerin antitümör etkileri çalışılmıştır. Bu glukanın ve suda çözünebilir fraksiyonlarının farelerde sarkoma180' e karşı güçlü antitümör etki gösterdiği ortaya konmuştur (53). Ayrıca kan basıncını ve kan plazmasındaki yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranını değiştirmeden düşürdüğü belirtilirken, Amerika Birleşik Devletlerinde insanlar üzerinde yapılan klinik denemelerde AIDS ve meme kanseri tedavisinde, Çin' de ise akciğer, mide ve lösemi hastalıklarında umut verici sonuçlar alınmıştır (13).

Son yıllarda mantarlardan elde edilen eksopolisakkaritlerle ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu eksopolisakkaritlerin kanser, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklara karşı kullanılabileneceğini gösteren çeşitli bulgulara rastlanmıştır. Çin ve Japonya gibi doğu ülkelerinde eksopolisakkaritler üzerine önemli çalışmalar bulunmaktadır. Ülkemizde ise mantarlardaki eksopolisakkaritlerin etkileri üzerine yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Türkiye' de yetişen bazı mantarların ürettikleri eksopolisakkaritlerin glioma kanserine karşı bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## **7.2. Kanser**

Kısaca kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde hızlı çoğalmasdır. Kanserli hücrelerin kaynağı normal hücreler olmasına rağmen aralarında morfolojik olarak birçok farklılıklar vardır. Bir dokuyu oluşturan normal hücrelerdeki düzenli sıralanışın, kanserli hücrelerde kaybolduğu gözlenirken bu hücrelerin ilkel hücre fazına dönüştüğü gözlenir (1). Organ ve dokular ancak bazı gelişme kuralları çerçevesinde gelişir ve büyür. Yani, normal dokuların gelişmesi sınırlı olup, alacakları şekil belirlidir. Normal dokuların bu özellikleri genetik yapıları gereğidir, ama tümör hücrelerinde çoğalma sınırsızdır ve gelişme devam eder (4). Kanserli hücrelerin gelişiminde devamlı çalışan uyarıcılara gerek yoktur. Ayrıca kanserli hücrelerin birden fazla, büyük ve hiperkromatik çekirdeklerinin olması bu hücrelerin belirgin özelliklerindedir. Kanser oluşmasına yol açan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında kimyasal maddeler, ultraviyole ışınlar ve iyonize radyasyon gibi fiziksel etkenler, virüsler, genetik faktörler ve beslenme biçimi vardır (1).

### **7.2.1. Glia Hücreleri**

Sinir sisteminde sinir hücreleri ve glia hücreleri olmak üzere iki temel hücre türü bulunmaktadır. Glia kelimesi köken olarak Yunanca 'glue' sözcüğünden gelmektedir. Sinir sisteminin vazgeçilmez hücreleri olan bu hücreler destekleyici görevi üstlenmişlerdir (19, 24). Glia sayısı nöron sayısından 10 ile 50 kat daha fazladır (5). Merkezi sinir sisteminde genel olarak 3 tip glia hücresi bulunmaktadır (18, 23, 35). Bunlar mikroglia, oligodentrosit ve astrositlerdir.

Mikroglialar, makrofajlardan köken alan fagositik hücrelerdir. Sinir sistemindeki diğer hücre tipleriyle embriyolojik ya da fizyolojik olarak ilişkili değildirler. Bu hücrelerin dinlenme durumunda nasıl davrandıkları çok fazla bilinmemektedir, fakat enfeksiyon, hasar ve travma sırasında aktive oldukları ve durumu iyileştirme yönünde çalıştıkları bilinmektedir. Ayrıca bu hücrelerin birçok hastalıkta aktive oldukları düşünülmektedir. Bunlar arasında multiple skleroz, AIDS, AIDS ilişkili demans, çeşitli kronik nörodejeneratif hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer sayılabilir (24,54).

Oligodentrositler ve astrositler daha küçük hücre tipleridir. Bu hücreler aksonun etrafını sararak çevresinden izole ederler. Bir tür astrositler olan Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde yalnızca bir aksonun internodunu sararken, bir oligodentrosit merkezi sinir sisteminde ortalama 15 aksonal internodu sarar (24,36).

Glia hücrelerinin sayıca en fazla olanı astrositlerdir. Bu hücrelerin gövdeleri düzensiz ve yıldız biçimindedir. Adlarını bu özelliklerinden almışlardır (24,54). Astrositlerin en yaygın olarak bilinen görevi destekleyici eleman olmalarıdır, fakat bu göreve ek olarak başka görevleri de bulunmaktadır (24). Örneğin, glial fibril asidik protein (GFAP) astrositler ve diğer glia hücrelerinde bulunduğu bilinen aracı bir filamenttir (34). Ayrıca, bazı astrositler omurilik ve beyinde kılcal damarların duvarını oluşturan hücreler arasında sıkı bağlantı bölgelerinin oluşmasını uyarır. Bunun sonucunda kan-beyin engelini oluştururlar. Bu yapı birçok maddenin beyine geçişini kısıtlar (5). Astrositler aynı zamanda nöronlar arası alandaki K iyon düzeyinin korunmasına yardım ederler. Bu hücreler potasyuma yüksek derecede geçirgendir ve artmış potasyum miktarını içlerine alarak komşu nöronları fazla potasyumdan korurlar (35). Bununla birlikte sinaptik bölgeden salınan nörotransmitterleri tutabilirler ve bu çevredeki transmitterleri uzaklaştırarak sinaptik aktiviteleri düzenlemeye yardımcı olurlar (24,54). Bu nörotransmitterlere glutamat ve dopamin örnek verilebilir (33). Ayrıca, astrositler nöronal metabolizmanın bir merkezi olup bazı aminoasitlerin beyindeki sentez yeridir (19,35). Astrositler enerji metabolizması için gerekli glukozu laktik asite dönüştürerek nöronlara verirler ve nöronlar da enerji metabolizması için pirüvata çevirirler. Astrositler bulundukları karbonik anhidraz enzimiyle asit-baz dengesini düzenler (35).

Gliaların farklı yaşamsal görevleri aşağıdaki gibi özetlenebilir (19, 24, 36):

1. Nöronları destekleyerek beyin dokusunu oluştururlar. Bununla birlikte nöron gruplarını ve sinaptik bağlantıları birbirinden ayırırlar.
2. Oligodentrositler ve Schwann hücreleri sinir hücre aksonlarını izole eden miyelin tabakayı oluşturarak elektriksel iletimin daha hızlı olmasını sağlarlar.
3. Bazı glia hücreleri süpürücü olup hasar ya da nöronal ölümlerden sonra kalan artıkları uzaklaştırırlar.

4. Glia hücreleri nöronlar arasındaki uyarıları kolaylaştırırlar. Örneğin, bazı glialar sinaptik ileti sırasında nöronlardan salınan kimyasal transmitterleri alarak ortamdan uzaklaştırırlar.
5. Beyinin gelişimi sırasında radial glia gibi belirli glia hücre çeşitleri nöron göçüne rehberlik ederler ve akson büyümesine yol gösterirler.
6. Bazı durumlarda, omurgalıların sinir kas kavşağında olduğu gibi, glia hücreleri presinaptik uçtaki özellikleri aktif olarak düzenler.
7. Bazı glia hücreleri örneğin astrositler, kan beyin engelinin oluşumuna katkıda bulunarak kandan beyine toksik maddelerin girişini engellemiş olurlar.
8. Sinaps oluşumu ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen büyüme faktörleri ile nöromodülatörleri salarak glia hücrelerinin sinapslarla ilişkisini sürdürmesini sağlarlar ve sinir hücrelerinin beslenmesine yardım ederler. Bu nörotrofik faktörler arasında, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF), siliar nörotrofik faktör (CNTF), glia kökenli neksin, epidermal büyüme faktör (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) bulunmaktadır.

Bedende oluşan tümörler merkezi sinir sistemini üç yolla etkileyebilirler. Bunlardan ilki beyin, omurilik veya çevre yapılarında gelişen primer tümörlerdir. İkincisi, bedenin başka bir yerindeki primer tümörün merkezi sinir sistemine yayılmasıyla oluşan metastatik tümörlerdir. Üçüncü bir yol ise bedenin başka bir bölgesinde bulunan bir tümör dolaylı olarak merkezi sinir sisteminde hasar yaratabilir (14). Merkezi sinir sisteminde oluşan tümörlerin en geniş grubu glial tümörlerdir (15). Glial tümörlerin oluşumunda genetik faktörlerin önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Genetik yapıya ait değişikliklerin iki tanesi ön plandadır. Bunların biri hücre bölünmesini ortaya çıkaran onkogenlerin varlığı diğeri ise tümör baskılayıcı genlerini kaybetmiş hücrelerin ortaya çıkmasıdır. Tümör baskılayıcı genler astrositomaların 10. ve 17. kromozomlarında yerleşmişlerdir (47). Bazı kimyasallar ve bedenin baş kısmının röntgen ışınlarına maruz kalmasının hücre genetiğini bozduğu ve astrositoma oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. Organizmanın zayıf immun yanıtı da tümör oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Glial tümörlerinin içerisinde en sık görüleni ise glioblastoma multiformedir (GBM). Glioblastoma multiforme, hücrelerin merkezi sinir sistemine

yayılması sonucu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonrasında ölüme yol açan bir kanser türüdür (16). Malign astrositoma olarak da bilinen GBM hücreleri fusiform, yuvarlak ve kromatince zengindir. Malign asrositomalar anjiogenesisi önemli derecede uyarırlar. Bu değişikliğin hücre genetiğiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (25).

C6 hücreleri, kanserli sıçan glia hücre dizisidir ve yüksek bölünme hızına sahiptir. Malign glioblastoma özellikleri olan endotel çoğalması, hücre göçü, hücre çekirdeklerindeki farklılık, tümör nekroz odakları ve tümör içi kanama gibi özellikler C6 hücrelerinde de görülür (16). Hayvan beyin tümörlerinin insan beyin tümörleriyle olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından yol göstericidir. C6 sıçan glioma tümör modeli insan glioblastomasına benzerliğinden dolayı deneysel çalışmalarda sık kullanılmaktadırlar (16).



## 8. YÖNTEM ve GEREÇ

### 8.1. Mantar Ekzopolisakkaritinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan makrofungus kültürleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Mustafa Yamaç ve çalışma arkadaşları tarafından toplanmış, isimlendirilmiş ve vejetatif misel formunda izole edilmiştir.

Mantarlardan ekzopolisakkaritin elde edilmesi için gerekli olan kültür, stok kültürden alınıp Potato Dekstroz Agar ve Malt Agar besiyeri içeren petrilere ekilerek 27 °C' de 7 gün süre ile inkübe edildi (26). Gelişen misellerden steril bistüri yardımı ile eşit büyüklükte parçalar kesilerek alındı. Çıkarılan parçalar, 100 mL Potato Malt Medium (PMP) içeren 250 mililitrelik erlenlere aktarıldı. Erlenler 27 °C' de 100 devir/dakika hızındaki çalkalamalı etüve yerleştirildi. Dört günlük inkübasyon süresi sonunda çoğalan hücreler (28) Heidolph model homojenizatör yardımı ile karıştırıldı (Şekil 8). Daha sonra 500 mL PMP içeren 1000 mililitrelik erlenlerin her birine 20 mL karışım aktarılarak 27 °C ve 100 devir/dakikalık çalkalamalı etüve yerleştirildi. Yedi günlük inkübasyon süresi sonunda erlenler içindeki kültürler süzülerek çökelti ve süzüntü olarak iki kısma ayrıldı (Şekil 9). Her süzüntü, hacminin 4 katı kadar % 96'lık alkol eklenerek çalkalandı ve 1 gece boyunca 4 °C' deki buzdolabında bekletildi. Ertesi gün bu sıvı 7500 devir/dakikada 10 dakika çevrildi. Santrifüjleme işlemi sonucunda dibe çöken ekzopolisakkarit küçük kaplara aktarıldı ve bir gece boyunca eksi 80 °C' deki derin dondurucuda bekletildi. Daha sonra liyofilizatörde liyofilize edilen ekzopolisakkarit toz haline getirilerek sonraki çalışmalarımızda kullanıldı (26, 27, 38).



Şekil 8: Potato Malt Medium içeren erlenlerde büyüyen miseller.



Şekil 9: Filtre kağıdı yardımı ile çökelti ve süzüntü olarak ikiye ayrılan besiyeri

## **8.2. Glia Hücre Kültürünün Yapılması**

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, sinyal mekanizmalarının açıklanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu hücre kültürleri % 95 O<sub>2</sub> ve % 5 CO<sub>2</sub> ile temel olarak hiperoksit bir ortamdır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağladığı sürece gelişir ve çoğalırlar.

### **8.2.1. Kültür Öncesinde Yapılan Hazırlıklar**

Toz halinde steril şişelerde bulunan Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) bir litrelik steril ve deiyonize su içine eklenerek besi ortamı hazırlandı. Bu besi ortamı, önceden steril edilmiş şişelere 0,22 mikrolitrelik filtrelerden enjektör yardımı ile geçirilerek sterilize edildi ve buzdolabında 4 °C' de muhafaza edildi. Fetal dana serumu (FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) küçük hacimlere bölünerek eksi 20 °C buzdolabında saklandı.

### **8.2.2. C6 Hücrelerinin Ekimi**

Önceden eksi 80 °C sıvı nitrojen içerisinde konularak saklanmış olan sıçan glioma hücreleri (C6) nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra DMEM, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C de 5 dakika döndürüldü. Üstteki sıvı atılarak dondurma işleminde kullanılan dimetil sülfoksit (DMSO) uzaklaştırılmış oldu. Dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekilerek 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak şartıyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin büyümeleri gözlemlendi. Eskiyen besiyerleri içeriği pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1mL penisilin + streptomisin, 1mL FCS ve 8.9 mL DMEM bulunan besiyerle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı (58).

### 8.2.3. C6 Hücrelerinin Deneye Alınması

Flaskların tabanını kaplayan hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{+}$  içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırılır. Flaskta kalan hücreler 5 dakika % 0,25 tripsin-EDTA (Sigma) ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve  $4^{\circ}C$ 'de 1200 devir/dakikada 5 dakika döndürüldü. Üstte kalan sıvı atıldı ve altta kalan hücre çöktisinden bir damla pipet yardımı ile alınarak thoma lamında 1 mililitrede bulunan hücre sayısı belirlendi. Her bir kuyucuğa  $2 \times 10^4$  hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekildi ve 24 saat sonra hücreler mantar ekzopolisakkaritleriyle muamele edildi.

### 8.2.4. Ekzopolisakkarit Dozlarının Hazırlanması

Kullandığımız bütün çözeltiler her deneyden önce taze olarak hazırlandı. Çalışmamızda kullandığımız mantar türlerinden toz halinde elde edilen ekzopolisakarit DMEM içerisinde çözüldü ve seyreltilerek 0.4, 1, 2, 4 ve 6  $\mu g/mL$  dozları hazırlandı.

#### Deney Grupları:

Her bir deney grubu en az üç kere tekrar edildi.

1. **Kontrol grupları:** C6 hücrelerine sadece besi yeri uygulandı.
2. ***Laetiporus sulphureus* grubu:** C6 hücrelerine 0.4, 1, 2, 4 ve 6  $\mu g/mL$  dozlarındaki *Laetiporus sulphureus*'a ait ekzopolisakaritin bir grup için 24 ve diğer bir grup için 48 saat uygulandı.
3. ***Coprinus comatus* grubu:** İki grup olarak 0.4, 1, 2, 4 veya 6  $\mu g/mL$  dozlarında *Coprinus comatus*'un ekzopolisakariti 24 ve 48 saat süreyle C6 hücrelerine uygulandı.
4. ***Polyporus squamosus* grubu:** C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle bu mantarın ekzopolisakariti 0.4, 1, 2, 4 ve 6  $\mu g/mL$  dozlarından ayrı ayrı uygulandı.

5. ***Lentinus strigosus* grubu:** C6 hücrelerine 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL *Lentinus strigosus* ekzopolisakaritinin dozları bir grup için 24 ve diğeri için 48 saat uygulandı.
6. ***Lenzites betulina* grubu:** Her iki grup için 0.4, 1, 2, 4 veya 6 µg/mL dozlarında *Coprinus comatus* ekzopolisakariti 24 ve 48 saat uygulandı.
7. ***Fistulina hepatica* grubu:** C6 hücrelerine 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL *Fistulina hepatica* 'nın ekzopolisakarit dozları her grup için 24 ve 48 saat uygulandı.

### 8.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi, hücrelerin canlılığını gösteren başarılı bir yöntemdir (40). Bu yöntem genellikle daha hızlı çoğalan ve mitokondrial aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur. Özellikle kanserli hücreler üzerinde yapılan ilaç denemelerinde ve doz ayarlanmasında hücre canlılığının tespit edilmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir.

MTT hücrelere aktif olarak girebilen, mitokondriye bağlı bir dizi reaksiyonla mor renkli, suda çözülmeyen ürün olan formazan indirgenen bir maddedir. Oluşan formazan hücre zarını geçemediği için hücrenin içinde toplanmaktadır. DMSO veya diğeri uygun çözücü ilavesi ile ürün çözülüp serbest kalabilir ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçüsü olarak alınabilir ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir.

MTT her deneyden önce taze olarak 5 mg/L PBS içinde çözülerek hazırlandı ve 0.22 mikrolitrelik filtre kullanılarak steril edildi. Hücrelere 24 saatlik ekzopolisakarit uygulanmasının ardından her bir kuyucukta bulunan 250 µL besi ortamı içine 25 µL MTT çözeltisi eklenerek 37 °C de 4 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklarda bulunan tüm besi ortamı alındı ve her kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi. Kültür kapları ışıktan korunarak ve çalkalanarak 3-5 dakika bekletildi. Oluşan formazan boya absorbansı 550 nm'de kültür kabı okuyucusunda (BioTek) okundu (10). MTT

ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile ilişki gösterdiğinden, ekzopolisakkarit verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı.

Her bir kuyucuktaki ekzopolisakkarit verilen hücre absorbansı X 100

---

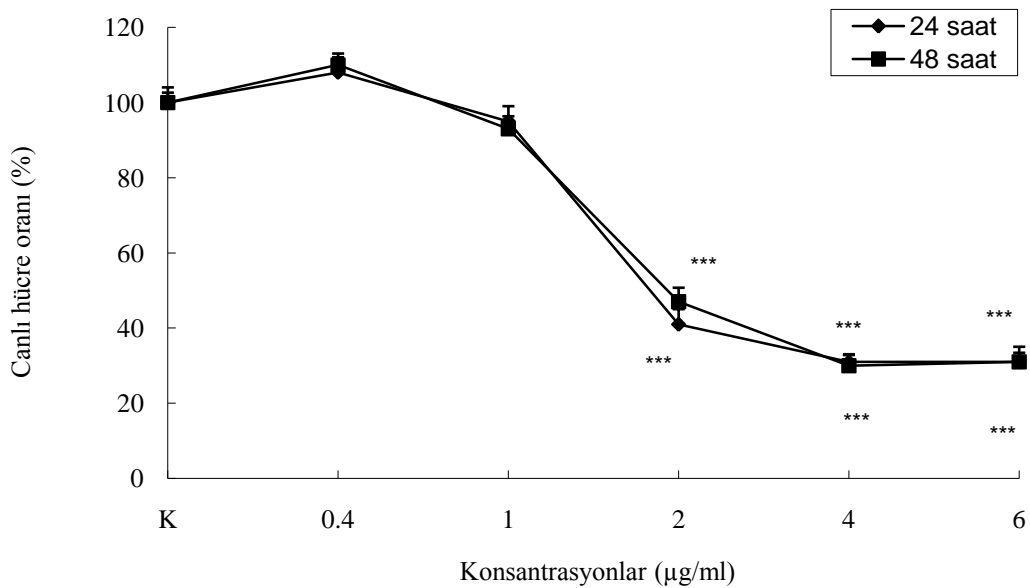
Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı

Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak  $p < 0.05$  kabul edildi.

## 9. BULGULAR

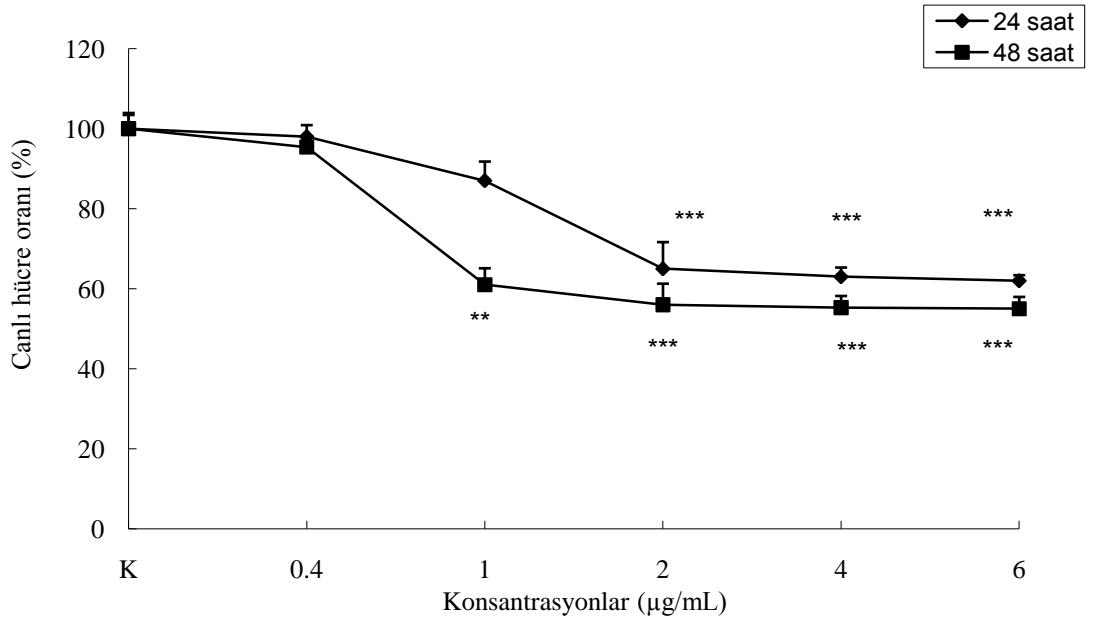
Her bir mantar türünden elde ettiğimiz ekzopolisakkarit 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozlarında glioma hücrelerinin in vitro yaşam ortamına ayrı ayrı eklenerek etkileri araştırılmıştır.

*Coprinus comatus* mantarından elde edilmiş olan ekzopolisakkarit 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozları C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubu %100 olarak kabul edildiğinde 0.4 ve 1 µg/mL dozları canlı hücre oranında zamana ve doza bağlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Diğer 2 µg/mL, 4 µg/mL ve 6 µg/mL dozları kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmuş, fakat bu gruplar kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir fark göstermemişlerdir. İki µg/mL dozun 24 saat sonra glioma hücrelerini % 59 oranında, 4 ve 6 µg/mL dozlarının her ikisi de 24 saat sonra hücreleri % 69 oranında öldürdüğü saptanmıştır. İki, 4 ve 6 µg/mL dozlarının 48 saat sonra yaşayan hücre oranını sırasıyla % 53, % 70 ve % 70 dolayında öldürmesine rağmen, zaman farkı göstermemiştir. İki µg/mL dozu ile 4 ve 6 µg/mL dozları arasında azda olsa doz farkı oluşmuştur (\*\* : p<0.01, \*\*\*: p<0.001, Şekil 10).



Şekil 10: *Coprinus comatus* mantarının 24 veya 48 saatte C6 hücrelerine etkisi.

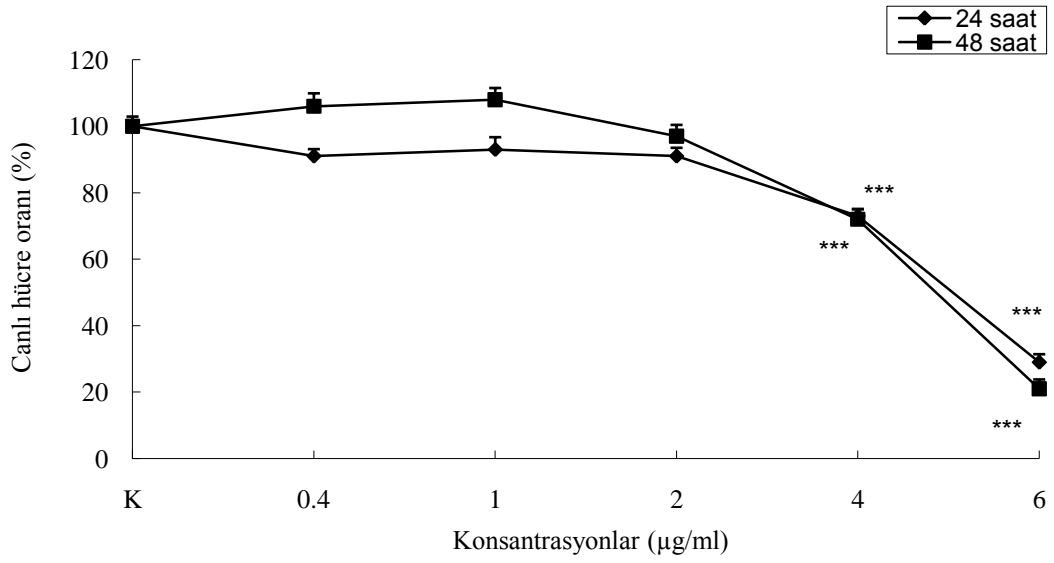
*Fistulina hepatica* mantarının 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozları C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulandı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 0.4 µg/mL dozu 24 ve 48 saat sonra hücre sayısında bir değişiklik göstermemiştir, fakat 1 µg/mL dozu 24 saat sonra glioma hücrelerini % 13 oranında, 48 saat sonra ise % 39 oranında ( $p < 0.001$ ) öldürmüştür. İki, 4 ve 6 µg/mL dozları kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Fakat bu grupların kendileri arasında zamana ve doza bağlı bir fark bulunamamıştır. İki, 4 ve 6 µg/mL dozları 24 saat sonra glioma hücrelerini sırasıyla % 35, % 37 ve % 38 oranında; 48 saat sonra ise 2 µg/mL dozunun % 44, 4 ve 6 µg/mL dozlarının % 45 oranında glioma hücrelerini öldürdüğü tespit edilmiştir. Uygulama süresi uzatıldığında 1 µg/mL dozu zamana bağlı belirgin bir etki göstermiştir, fakat *Fistulina hepatica* mantarının 2, 4 ve 6 µg/mL dozları arasında zamana ve doza bağlı olarak bir değişiklik saptanamamıştır (Şekil 11).



Şekil 11: *Fistulina hepatica* mantarının C6 hücrelerine 24 ve 48 saatte etkisi.

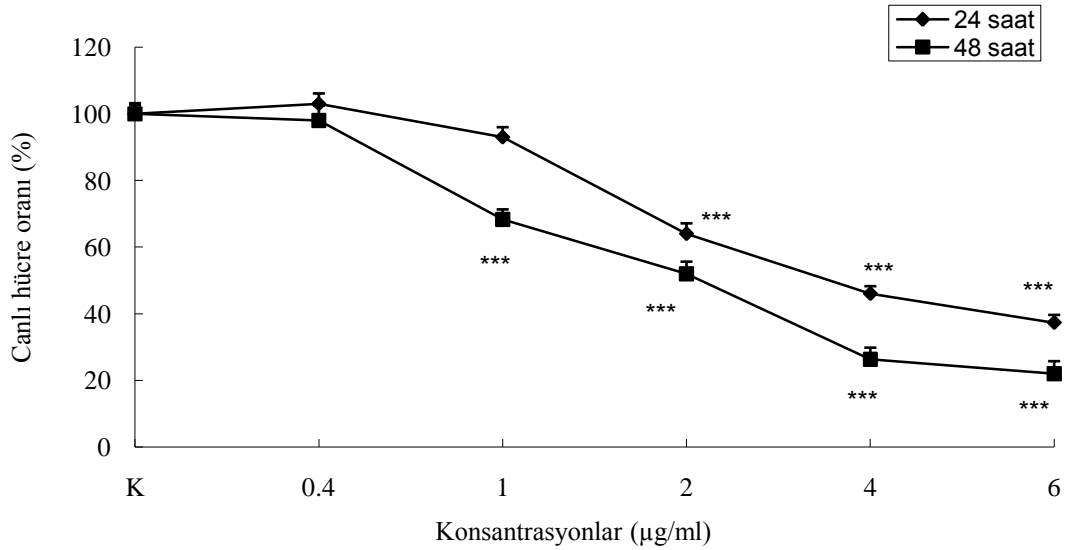


Kontrol grubunu % 100 olarak kabul ettiğimizde *Lentinus strigosus* mantarının 0.4, 1 ve 2 µg/mL dozları C6 hücre sayısında istatistiksel olarak zamana ve doza bağlı anlamlı bir fark göstermemiştir. Fakat 4 µg/mL ve 6 µg/mL dozları, kontrol grubu, 0.4 µg/mL, 1 µg/mL ve 2 µg/mL dozlarıyla kıyaslandığında anlamlı oranda bir hücre ölümüne neden olmuşlardır. Sadece 4 µg/mL dozu glioma hücrelerini 24 saat sonra % 27 oranında (p<0.001) ve 48 saat sonra % 28 oranında (p<0.001) öldürdüğünden zamana bağlı bir farklılık gözlenmemiştir. Tek başına 6 µg/mL dozu 24 saat sonra % 71 ve 48 saat sonra % 79 oranında yaşayan hücre sayısını azaltmıştır (p<0.001). Burada 4 ve 6 µg/mL dozları arasında doza bağlı olarak yaklaşık % 50 oranında önemli bir fark vardır (Şekil 12).



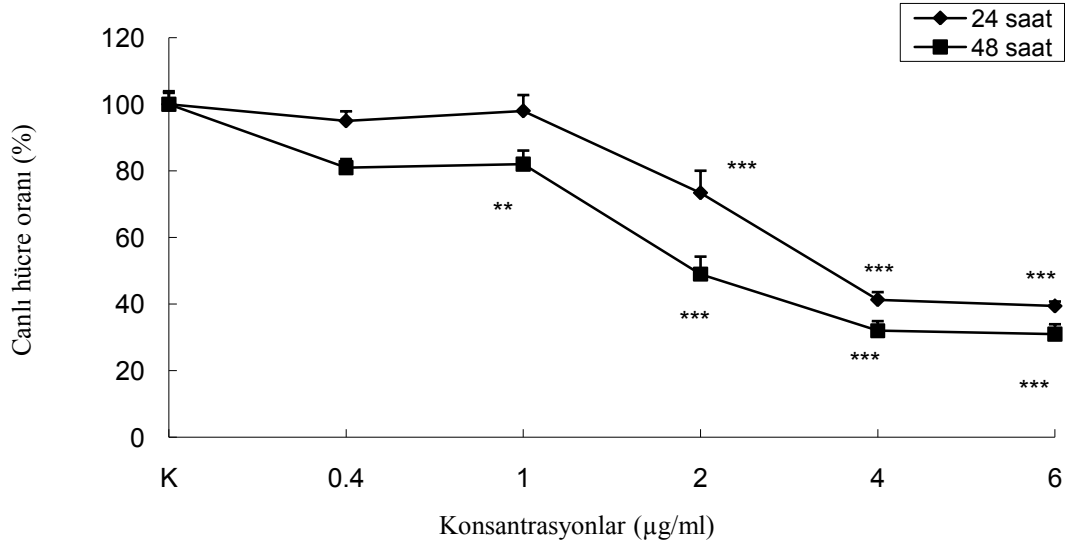
Şekil 12: *Lentinus strigosus* mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi.

*Laetiporus sulphureus* mantarından elde edilen ekzopolisakkarit, 0.4 µg/mL dozunun 24 ve 48 saatlik uygulamalarını kontrol grubuyla kıyasladığımızda hücre ölümüne neden olmamıştır. Benzer şekilde 1 µg/mL dozunun 24 saatlik uygulamasında da anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat 1 µg/mL dozunun 48 saat sonraki hücre öldürme oranında kontrol grubuyla kıyaslandığında % 35 farklılık saptanmıştır (p<0.001). İki, 4 ve 6 µg/mL dozları kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir. İki, 4 ve 6 µg/mL dozlarının 24 saat sonra glioma hücrelerinin % 36, % 54 ve % 63 oranında (p<0.001) ; 48 saat sonra sırasıyla % 48, % 74 ve % 78 oranında (p<0.001) ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak 1 µg/mL dozunun 24 saatlik uygulaması etkisiz kalırken, aynı dozun 48 saatlik uygulaması % 35 oranında hücre ölümüne neden olmasıyla en belirgin şekilde ortaya çıkmıştır. Toksik etkinin doza bağlılığı, doz 1 µg/mL' den 6 µg/mL'e çıkınca öldürücü etkinin 48 saat sonra % 35'den % 78'e ulaşmasıyla belirginleşmiştir (Şekil 13).



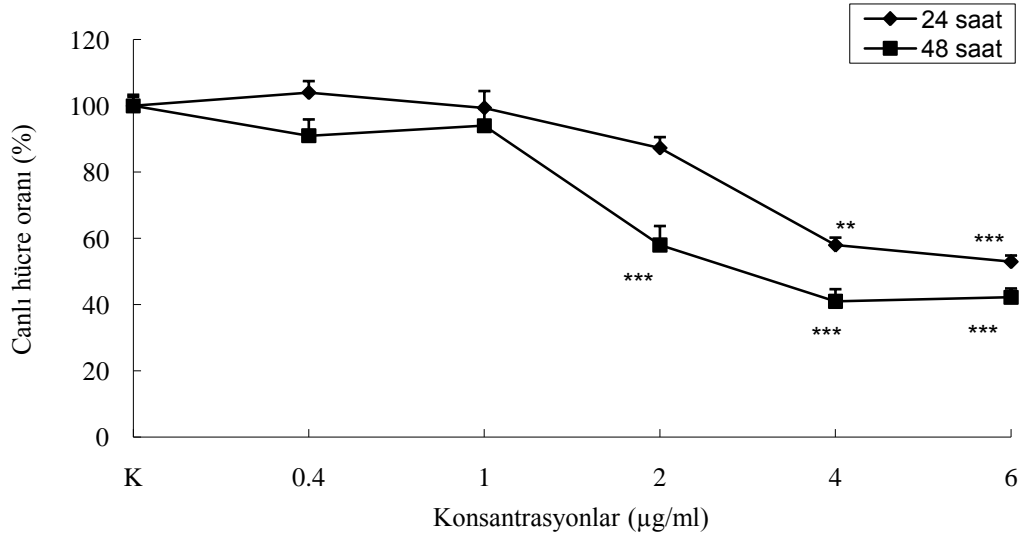
Şekil 13: *Laetiporus sulphureus* mantarının 24 ve 48 saat sonra C6 hücrelerine etkisi.

C6 hücrelerine *Polyporus squamosus* mantarına ait ekzopolisakkarit 24 ve 48 saat süreyle 0.4, 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozlarında uygulandı. Kontrol grubunu % 100 olarak kabul ettiğimizde 0.4 ve 1 µg/mL dozundaki salgı 24 saat uygulama sonunda hücre yaşam oranını zamana ve doza bağlı olarak değiştirmemiştir. Fakat 1 µg/mL dozunun inkübasyon süresi 24 saatten 48 saate uzatıldığında hücreleri % 18 oranında ( $p<0.01$ ) öldürdüğü tespit edilmiş ve kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu değişim, etkinin zamana bağlılığının açık göstergelerinden birisidir. Ayrıca 2, 4 ve 6 µg/mL dozları kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur ( $p<0.001$ ). İki, 4 ve 6 µg/mL dozlarının 24 saat sonra glioma hücrelerini sırasıyla % 27, % 59 ve % 61; 48 saat sonra ise % 51, % 68 ve % 69 oranında öldürdüğü saptanmıştır. Dört ve 6 µg/mL dozları arasında zamana ve doza bağlı değişiklik gözlenmemiştir. Doza bağımlılığı en belirgin olarak dozun 1 µg/mL'den 6 µg/mL düzeyine çıkartılınca öldürücülüğün % 18'den % 69'a çıkarılmasıyla gösterilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: *Polyporus squamosus* mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi.

*Lenzites betulina* mantarının 0.4 ve 1 µg/mL dozları zamana ve doza bağlı bir etki göstermemiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 2 µg/mL dozu 24 saat sonra glioma hücrelerini % 13 oranında öldürmüştür, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). Aynı doz 48 saat sonra glioma hücrelerini % 42 oranında öldürerek istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ( $p<0.001$ ) ve zaman bağımlılığının belirginleşmesine neden olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 4 ve 6 µg/mL dozları kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmıştır fakat bu dozların değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında zamana ve doza bağlı bir fark tespit edilmemiştir. Dört ve 6 µg/mL dozlarının 24 saat sonra glioma hücrelerini sırasıyla % 42 ( $p<0.01$ ) ve % 47 ( $p<0.001$ ); 48 saat sonra sırasıyla % 59 ve % 58 oranında ( $p<0.001$ ) öldürdüğü tespit edilmiştir. Bu mantara ait ekzopolisakkaritin hücre öldürme etkisinin % 13'ten % 59'a çıkması doz bağımlılığının açık belirtisidir (Şekil 15).



Şekil 15: *Lenzites betulina* mantarının 24 ve 48 saatte C6 hücrelerine etkisi.

## 10. TARTIŞMA

En düşük doz olan 0.4 µg/mL hariç 1, 2, 4 ve 6 µg/mL dozlarında uyguladığımız altı farklı mantar türünün ekzopolisakkariti kontrol grubuna göre glioma hücrelerinin yaşam oranında zamana ve doza bağlı olarak anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Mantar ekzopolisakkaritlerinden *Lentinus strigosus*'un 6 µg/mL dozu 48 saat sonra en fazla % 79 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Brezilya'da yapılan bir çalışmada *Lentinus strigosus*'un CCB 162 ve CCB 178 kodlu mantarın melanoma kanseri (UACC-62), meme kanseri (MCF-7), böbrek kanseri (TK-10) ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) üzerine etkisi araştırılmıştır. *Lentinus strigosus* mantarı melanoma, meme, böbrek kanserleri ve PBMC hücrelerinin tamamını baskıladığı, fakat CCB 178 kodlu mantarın bunların ancak % 33'nü baskıladığı bulunmuştur (45). *Lentinus strigosus* ile aynı cinsten olan *Lentinus edodes*'in ekzopolisakkariti in vitro ortamda insan hepatoma (SMMC-7721) hücreleri ve in vivo ortamda S-180 tümör hücreleri aşılana farelerde etkisi araştırılmıştır. SMMC-7721 hücreleri 50 mg/L mantar ekzopolisakkaritiyle, S-180 tümörü verilmiş farelere 24 mg/ kg 15 gün boyunca aşılana ağırıkları ölçülmüş ve sonuçta hücre bölünmesinin azaldığı tespit edilmiştir (47). Yapılan başka bir çalışmada ise bu mantar türünden elde edilen ekzopolisakkaritin 50-150 mg/kg dozları diabetli sıçanlara verilmiştir. Yedi gün boyunca ağızdan verilen mantar ekzopolisakkariti 150 mg/kg dozunun serum glikoz oranını % 21.1 azalttığı tespit edilmiştir (57).

Kullandığımız *Coprinus comatus* mantarının ekzopolisakkaritin glioma hücrelerini zamana ve doza bağlı olarak öldürdüğünü saptadık. Çalışmamızı destekleyen bir çalışmaya göre *Coprinus comatus* mantar türünden elde edilen ekzopolisakkarit meme kanserine karşı yeni bir ajan olarak tanımlanmıştır. Bu antikanser aktiviteye göre; hem östrojen reseptörü bağımlı hem de östrojen reseptör bağımsız meme kanser hücrelerinin çoğalması baskılanmış, hem östrojen reseptörü bağımlı ve reseptör bağımsız hücrelerin apoptozunu hızlandırmıştır. Ayrıca, MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturmasını baskılamıştır. Bu çalışmada mantar ekzopolisakkaritinin doza bağlı olarak hücre ölümüne neden olduğu vurgulanmıştır (17). Yapılan diğer bir çalışmada ise *Coprinus comatus* ve *Ganoderma lucidum*

mantarlarının, kanserli prostat hücrelerine (LNCaP) etkisi araştırılmıştır. Bu mantarların IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 28.3 ve 44.8 µg/mL olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek konsantrasyondaki *C. comatus* salgısının hücrelerin % 50' den fazlasını öldürdüğü belirtilmektedir. *C. comatus* ve *G. lucidum* ile muamele edilen hücrelerin yüksek konsantrasyondaki salgılarda % 69 ve % 77 oranında G1 fazında biriktiği, konsantrasyon miktarı azaldığında S fazındaki oranın % 10 ve % 3 olduğu tespit edilmiştir (59).

Çalışmamızda kullandığımız mantar türlerinin ekzopolisakkariti glioma kanseri üzerine etkileriyle ilgili veriler az sayıdadır. Fakat Polyporacea sınıfında yer alan *Laetiporus*, *Lenzites* ve *Polyporus* cinsi mantarları sarkoma 180 solid kanserine karşı % 70-90; ehrlich solid kanserine karşı % 70-100 öldürücü etki göstermiştir (31). *Fistulinaceae* sınıfından *Fistulina* cinsi mantar sarkoma 180 kanserine karşı % 80; ehrlich solid kanserine karşı % 90 öldürücü aktivite göstermiştir (41, 56). Polyporacea sınıfı örneklerinden olan fakat çalışmamızda kullanmadığımız *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen mantar salgısının insan meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) yaşam döngüsü üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen ekzopolisakkaritlerin 100-500 µg/mL dozlarında 12, 24, 36 ve 48 saat hücrelere uygulanmıştır. Mantar salgısının zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin çoğalmasını engellemiştir. 500 µg/mL 48 saatte hücrelerin hemen hemen % 70'ini baskılamıştır. Bu çalışmada ayrıca hücrelerin G1 fazında biriktiği ve 12-48 saatlik muameleden sonra G1 fazının arttığı ayrıca birçok hücrenin S ve G2/M fazında azaldığı belirtilmiştir (22). Yapılan diğer bir çalışmada bu mantar türünden izole edilen % 95'i polisakkarit ve % 5' i proteinden oluşan yapının interleukin (IL)- 1β, tümör nekrosis faktör (TNF)-α, insan monosit ve makrofaj hücrelerindeki IL-6 ve T lenfositlerindeki interferon (IFN)-γ uyardığı bulunmuştur (60). Yine bu mantardaki polisakkarit yapının sinir hücrelerini uyarak olgunlaşmaya teşvik ettiği, IFNγ, granzim B ve mRNA ekspresyonunu artırdığı, sinir hücrelerinin aktivitesini NF-κB ve p38 MAPK yoluyla artırdığı belirtilmektedir (31). *G. lucidum* ile yapılan başka bir çalışmada bu mantarın sıçan hepatoma, sarkoma S-180 ve retükülosit sarkoma L-II hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre üç kanser türünde de doza bağlı olarak hücrelerin % 80- 90 oranında baskılandığı bulunmuştur (32).

Yapılan literatür taramalarında C6 glioma hücreleri ile çalışmamızda kullandığımız altı farklı mantar türüne ait çalışma bulunamamıştır, fakat farklı örneklerin bulunduğu tespit edilmiştir. *G. lucidum* mantarına ait terpenoid (GLme) ve asidik terpenoidleri (GLpme) içeren salgıların sıçan melanoma hücrelerini baskıladığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak GLme'nin hem fare fibrosarkoma (L929) hem de sıçan astrositoma (C6) hücrelerine karşı antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir (55).

Çalışmalarımızda kullandığımız altı farklı mantar türünün salgıları glioma hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak zamana ve doza bağlı olarak anti-kanser etki göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler kanseri önleme konusunda umut verici olsa da ülkemizde bu çalışmalarla ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

## 11. SONUÇ

Yapılan literatür çalışmalarında özellikle Doğu ülkelerinde çeşitli mantar türlerinin kanser tedavisinde kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız farklı mantar türleri glioma hücrelerinin çoğalmasını zamana ve doza bağlı olarak etkilemiştir. Özellikle *Lentinus strigosus*' un 6 µg/mL dozunun % 79 oranında hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir.



## 12. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Alican, F.,1993, Kanser, Afa Matbaacılık
2. Barnes, J., Abbot, NC., Harkness, EF., et al, 1999, Articles on complementary medicine in the mainstream medical literature, Archives Internal Medicine, 159: 1721-1725 p.
3. Brock, T.D. and Madigan, M. T., 1994, Biology of Microorganisms, Seventh Edition, Prenitce - Hall International Inc, 899,1054 p.
4. Bulay O. M., 1995, Tümör Bilimi Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp A.Ş. yayınları.
5. Capbell, N. A., and Reece J. B., 2008, Biology, (Gündüz, E., Demirsoy, A. ve Türkan, İ.), Palme yayıncılık, Ankara.
6. Cheung, P. C. K., 1998, Functional properties of edible mushrooms, Journal of Nutrition, 128, 1512-1516 p.
7. Chihara, G., 1992, Immunopharmacology of Lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinula edodes*: its application as a host defence potentiator, International Journal of Oriental Medicine, 17, 67-77 p.
8. Chye, F. Y., Wong, J. Y. and Lee, J. S., 2008, Nutritional quality and antioxidant activity of selected edible wild mushrooms, Food Science and Technology International, Volume 114, No 4. 375-884 p.
9. Demir, M. S., 2007, Çeşitli Makrofunguslara Ait Fruktifikasyon, Vejetatif Misel ve Eksopolisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi.
10. Durmaz, R., Deliorman, S., Işıksoy, S., Uyar, R., Erol, K. and Tel, E., 1999, Antiproliferation properties of the Lazaroids U-83836E and U- 74389G on Glioma Cells in vitro, Pathology Oncology Research, Volume 5, No 3, 223-228 p.
11. Fisher, M. and Yang, L. X., 2002, Anticancer effects and mechanisms of polysaccharides-k (PSK); implications of cancer immunotherapy, Anticancer Research, 22, 1737-1754 p.
12. Furne, H., 1985, Clinical evaluation of Schizophyllan (SPG) in gastric cancer-randomised control studies, International Journal Immunopharmacology,7, 333-336 p.
13. Ger, E., Angelucci, J. and Coleman, P., 1997, Activity of Shiitake and Maitake Mushrooms, Delaware Medical Journal, 69, 149-151 p.
14. Gilroy, J., Temel Nöroloji, 2002, (Çeviri: Rana Karabudak), Güneş Kitapevi, Ankara.
15. Graham, A. C. and Cloughesy, T.F., 2004, Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments, Seminars Oncology Nursing; 20: 260-272 p.
16. Grobber, B., De, Deyn, P.P. and Slegers, H., 2002, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, Cell Tissue Research; 310: 257-270 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

17. Gu, Y-H. and Leonard J., 2005, In vitro effects on the proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER- dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species, *Oncology Reports* 15: 417-423 p.
18. Hawkswort, DL., 2001, Mushrooms: The extent of the unexplored potential, *International Journal Medicinal Mushrooms*, 3: 333-340 p.
19. He, F. and Sun, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 661-665 p.
20. Hobbs. C. R., 2004, Medicinal value of Turkey Tail fungus *Trametes versicolor* (L:Fr) Pilat (Aphyllorphoromycetidae) (Review), *International Journal of Medicine Mushrooms*, 6, 195-218 p.
21. Hodgson, 1991, *Journal Biotechnology*, 9, 609-613 p.
22. Hu, H., Ahn, N-S., Yang, X., Lee, Y-S. and Kang, K-S., 2002, *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 Human breast cancer cell, *International Journal Cancer*: 102, 250-253 p.
23. Hwang, H-J., Kim, S. W., Choi, J-W. and Yun, J-W., 2003, Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 309-319 p.
24. Kandel, E. R., Scwartz, J.H. and Jessell, T. M., 2000, *Principles of Neural Science*, fourth edition, 20-21, United States of America.
25. Kemerli, Ç., Taşkın, M. M., Sütpideler, N., Ethemoglu, B., 2005, Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model, *Turkish Neurosurgery*, 13,5, 109-115 p.
26. Kim, H.O., Lim, J. H., Joo, Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W. and Yun, J. W., 2005, Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*, *Bioresource Teechnology*, 96, 1175-1182 p.
27. Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H. and Yun, J. W., 2002, Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 56-61 p.
28. Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W., 2003, Biological activites of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 6274, 1-8 p.
29. Lin, YL., Liang, YC., Lee, SS. and Chiang, BL., 2005, Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- $\kappa$ B ve p38 mitogen-activated protein kinase pathways, *Journal of Leukocyte Biology*, 78: 533-543 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

30. Lin, Z.B., 2001, Modern research of *Ganoderma Lucidum*, Ed. Beijing: Beijing Medical University Press, 219-309 p.
31. Lin, Z-B., 2005, Mechanisms of Immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*, Journal of Pharmacological Science, 99,144-153 p.
32. Liu, X., Yuan, JP., Chung, CK., Chen XJ., 2002, Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*, Cancer Letters,182 (2): 155-161 p.
33. Lopez, M. V. N., Cuadrado, M. P. G. S., Ruiz-Poveda, O. M. P., Del Fresno, A. M. V. and Accame, M. E. C., 2007, Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary Culture, Biochimica at Biophysica Acta (BBA), 1770, 9, 1308, 1316 p.
34. Lun Lee, C., Yang, X., Man-Fan Wan J., 2004, The culture duration affects the immunomodulatory and anticancereffect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*, Enzyme and Microbial Technology, 38, 14–21 p.
35. Maragakis, N. J. and Rothstein, D., 2006, Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease, Nature Clinical Practice Neurology, 2, 10, 679-689 p.
36. Markiewicz, I. and Lukomska, B., 2006, The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system, Acta Neurobiol Experimentalis, 66, 343-358 p.
37. Mayell, M., 2001, Maitake Extracts and Their Therapeutic Potential – A Review, Alternative Medicine Review - Volume 6, Number 1: 48-60 p.
38. Maziero, R., Cavazzoni, V. and Bononi, V., 1999, Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture, Revista de Microbiologia, 30, 77-84 p.
39. Mizuno, T.,1995, Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: Medicinal and dietary effects, Food Reviews International, 11, 167–172 p.
40. Mossmann, T., 1983,Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immun Method, 65, 55-63 p.
41. Ohtsuka, S., Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Ohmura, Y., Wada, T., Fujii, T. and Takahashi, E., 1977, Polysaccharides and method for producing same, US Patent 4051314.
42. Okamura, K., Kinukawa, T., Tsumura, Y., Otani, T., Itoh, T., Kobayashi, H., Matsuura, O., Kobayashi, M., Fukutsu, T. and Ohshima, S., 1986, Clinical evaluation of Schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer: A randomized controlled study, Cancer 58: 865 –872 p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

43. Okamura, K., Kinukawa, T., Tsumura, Y., Otani, T., Itoh, T., Kobayashi, H., Matsuura, O., Kobayashi, M., Fukutsu, T. and Ohshima, S.,1989, Adjuvant immunochemotherapy: two randomized controlled studies of patients with cervical cancer, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 43, 17 p.
44. Reddy, L., Odhava, B. and Bhooblab K.D., 2003, Natural products for cancer prevention: A global perspective, *Pharmacol Therapeutics*, 99, 1–13 p.
45. Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Rabello, A. L. T., Souza-Fagundes, E. M., Correa-Oliveira, R., Rosa, C. A. and Zani, C. L., 2009, Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil, *Antonie van Leeuwenhoek*, 95:227-237 p.
46. Rowan, N. J., Smith, J. E. and Sullivan, R., 2003, Immunomodulatory activities of mushrooms glucans and polysaccharide- protein complexes in animals and humans (Review), *International journal of medical mushrooms*, 5, 95-110 p.
47. Sav, A., 2006, Beyin tümörlerinin tanı ve evrenmesinde genetik yöntemler, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, Cilt: 16, Sayı: 1, 2-5 s.
48. Sliva, D., 2003, *Ganoderma lucidum* ( Reishi) in Cancer Treatment, *Integrative Cancer Therapies*, 2 (4); 358-364 p.
49. Smith, J. E., Sullivan, R. and Rowan, N. J., 2003, The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: Current perspectives (Review), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5, 217-234 p.
50. Smith, J. E., Sullivan, R. and Rowan, N., 2005, Mushrooms and cancer therapy, *Biologist*, 52 (6), 328-336 p.
51. Sümer, S., 1987, *Türkiyenin Yeneni Mantarları*, İstanbul Ünversitesi, Ersu Matbaacılık.
52. Staments, P., 2002, Novel antimicrobials from mushrooms, *HerbalGram*, 54, 28-33 p.
53. Suzuki, I., Itani, T., Ohno, N., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T., 1985, Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice, *J Pharmacobiodyn.*, 8(3): 217-226 p.
54. Temburni, M. K. and Jacob, M. H., 2001, New functions for glia in the brain, *Proceeding National Academy Sciences*, 98, 7, 3631-3632 p.
55. Trajković, L. M. H., Mijatović, S. A., Maksimović-Ivanić D. D., Stojanović, I.D., Momčilović, M. B., Tufegdžić, S. J., Maksimović, V. M., Marjanović. Z. S. and Stosić-Grujčić S. D., 2009, Anticancer properties of *Ganoderma lucidum* methanol extracts in vitro and in vivo, *Nutr Cancer.*,61(5):696-707 p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

56. Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Omura, Y., Fujii, T., Ohara, M. and Matsunaga, K., 1978, Preparation of anti-tumor polysaccharides, Japanese Patent 53109915.
57. Yamac, M., Kanbak, G., Zeytinoğlu, M., Bayramoğlu, G., Sentürk, H., Uyanoglu, M.,2008, Hypoglycemic Effect of *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. Crude Exopolysaccharide in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Journal of Medicinal Food. 11(3): 513-517 p.
58. Yaz, G., Kabadere, S., Öztopçu, P., Durmaz, R. and Uyar, R., 2004, Comprasion of the Antiproliferation properties of antiestrogenic drugs (Nafoxidine and Clomiphene) on glioma cells in vitro, Amarian Journal of Clinical Oncology, 27: 384- 388 p.
59. Zaidman, B-Z., Wasser, S,P, Nevo, E., Mahajna, J.,2008, *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cell, Moleculer Biology Reports, 35:107–117 p.
60. Wang, SY., Hsu ML., Hsu, HC., Lee, SS., Shiao, MS., Ho CK, 1997, The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. Int J Cancer, 70 (6): 699-705 p.
61. Wasser, S. P., 2002, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, Applied Microbiology Biotechnology, 60, 258-274 p.
62. Wasser, S. P., 2005, Shiitake (*Lentinus edodes*) Encyclopaedia of Dietary Supplements DOL 10.10817E-EDS-120024880, Marcel Dekker, 653-664 p.
63. [http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/mushrooms/mushrooms\\_index.html](http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/mushrooms/mushrooms_index.html)
64. [http://en.wikipedia.org/wiki/Portal:Fungi/Selected\\_picture](http://en.wikipedia.org/wiki/Portal:Fungi/Selected_picture)
65. [http://uk.ask.com/wiki/Polyporus\\_squamosus](http://uk.ask.com/wiki/Polyporus_squamosus)
66. [http://www.cegep-sept-iles.qc.ca/raymondboyer/champignons/Images/Lenzites\\_betulinus.jpg](http://www.cegep-sept-iles.qc.ca/raymondboyer/champignons/Images/Lenzites_betulinus.jpg)
67. <http://www.geograph.org.uk/photo/265913>
68. <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html>
69. [http://www.mushroomexpert.com/laetiporus\\_sulphureus.html](http://www.mushroomexpert.com/laetiporus_sulphureus.html)
70. [http://www.pilzfotopage.de/Aphyllos/slides/Lentinus\\_strigosus.html](http://www.pilzfotopage.de/Aphyllos/slides/Lentinus_strigosus.html)

## ÖZGEÇMİŞ

### **Bireysel Bilgiler**

Adı- Soyadı: Şerife Can

Doğum tarihi: 11.01. 1986

Doğum yeri: Köşklüçiftlik/ Lefkoşa

Uyruğu: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi: can.serife@hotmail.com

### **Eğitim Durumu:**

1997, Gönyeli İlkokulu, K.K.T.C

2000, Şehit Hüseyin Ruso Ortaokulu, K.K.T.C

2003, Lefkoşa Türk Lisesi, K.K.T.C

2008, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

2011, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fiziyojji Anabilim Dalı

### **Bilimsel Etkinlikler:**

20-21 Aralık 2008, TSNE-ISO 22000 Belgesi, Eskişehir

27 Şubat 2009, TSN-ISO IEC 17025 Labaratuvar Akreditasyon Semineri, İstanbul

4-6 Şubat 2009, Tıpta Araştırma ve Veri Analizi Yöntemleri Kursu, Eskişehir

5 Mart 2009, Erciyes Üniversitesi 1. Uluslar arası Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi ve Uygulamalı Mezenkimal Kök Hücre Kursu, Kayseri

7-18 Eylül 2009, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Eskişehir

20-23 Ekim 2009, Türkiye Atom Enerji Kurumu DNA Komet Analiz Yöntemi,  
Ankara

14- 17 Eylül 2010, Türkiye Fizyoloji Bilimler Derneği 36. Uluslar arası Katılım  
Belgesi, Edirne