



**BAZI MAKROMANTAR EKSTRELERİNİN ANTİ KANSER  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Murat ŞEBİN**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
Prof. Dr. Necmettin YILMAZ  
TOKAT 2019**

**Her hakkı saklıdır.**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

BAZI MAKROMANTAR EKSTRELERİNİN ANTI KANSER AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ

Murat ŞEBİN

TOKAT

Ağustos - 2019

Her hakkı saklıdır.



**Bu tez çalışması;**

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi Koordinatörlüğü tarafından 2015/56 nolu proje ile desteklenmiştir.**

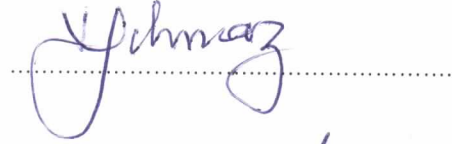
**MURAT ŞEBİN tarafından hazırlanan “Bazı Makromantar Ekstrelerinin Anti Kanser Aktivitelerinin Belirlenmesi”** adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.08.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

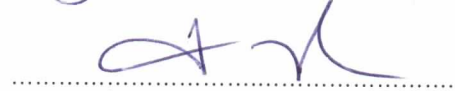
Danışman

Prof. Dr. Necmettin YILMAZ  
Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi



Üye

Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL  
Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi



Prof. Dr. İsa GÖKÇE  
Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi



Üye

Prof. Dr Murad Aydın ŞANDA  
Muş Alparslan Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Sedat BOZARI  
Muş Alparslan Üniversitesi



ONAY  
  
Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
22/08/2019

## TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

  
**Murat ŞEBİN**

**28 Ağustos 2019**

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### BAZI MAKROMANTAR EKSTRELERİNİN ANTI KANSER AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

MURAT ŞEBİN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. NECMETTİN YILMAZ

Bu tez çalışmasında *Lactarius zonarius*, *Laetiporus sulphureus*, *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* *Ramaria flava* makromantar türlerinin ekstralarının HeLa (insan serviks karsinoma hücre hattı), HT29 (insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı), A549 (insan akciğer adenokarsinoma), Hep3B (insan hepatocellular carcinoma), MCF7 (meme kanseri hücresi ve FL (insan normal amniyon epitel hücre hattı) hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkisini farklı moleküler teknikler kullanarak araştırıldı. Makromantar ekstralarının hücre proliferasyonuna olan etkileri ölçmek amacıyla MTT testiyle hücre proliferasyon ölçümü yapıldı. Makromantar ekstralarının hücre sitotoksik aktiviteleri LDH yöntemi ile belirlendi. Migrasyon testiyle; hücre göçleri, DNA bantlaşma testiyle; DNA zincirinde kırılmalar tespit edildi. Makromantar ekstralarının orta ve yüksek konsantrasyonlarda (45.0 – 99.6 µg/mL) etkili biçimde antiproliferatif etki gösterdiği belirlendi. Makromantar ekstralarının 60 µg/mL ve üstündeki konsantrasyonlarda hücre membranı üzerinde %20 – 30 oranında sitotoksik etki yapabildiği tespit edildi. *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* ekstralarının kanser hücreleri üzerine antiprolatif etkisinin olduğu, sitotoksik etkilerinin ise düşük olduğu belirlendi.

2019,66 sayfa

**ANAHTAR KELİMELELER:** Antikanser aktivite, sitotoksik aktivite, Hep3B, HT29, Makromantar, MCF7, FL

**ABSTRACT**  
**PH. D. THESIS**  
**MURAT ŞEBİN**  
**DETERMINATION OF ANTI-CANCER ACTIVITIES OF EXTRACTS**  
**OF SOME MUSHROOMS**  
**TOKAT GAZIOSMANPAŞA UNIVERSITY GRADUTE SCHOOL OF**  
**NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**  
**SUPERVISOR: PROF. DR. NECMETTİN YILMAZ**

In this study, the cytotoxic and antiproliferative effects of extracts obtained from *Lactarius zonarius*, *Laetiporus sulphureus*, *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* and *Ramaria flava* were investigated by using different molecular techniques on HeLa (human cervical carcinoma cell line), HT29 (human colorectal adenocarcinoma cell line), A549 (human lung adenocarcinoma), Hep3b (human hepatocellular carcinoma), MCF7 (breast cancer cell) and FL (human normal amniotic epithelial cell line) cell lines. Cell proliferation was measured by MTT test. Cytotoxic effect by LDH test, cell migrations by migration test, breaks in DNA chain by DNA banding test were detected. It was determined that all the extracts of macrofungi showed effective antiproliferative impact at medium and high concentrations (45.0 - 99.6 µg / mL). It was determined that the extracts of macro mushrooms had a cytotoxic effect of 20%-30% on the cell membrane at concentrations higher than 60 µg / mL. *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus*, antiprolative effects against cancer cells but their cytotoxic effects were low.

**2019,66 PAGES**

**KEYWORDS:** Anticancer activiti, cytotoxic effect FL, Hep3B, HT29, Mushroom, MCF7

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince fikirleriyle beni yönlendiren, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Necmettin YILMAZ'a, tezin yazım sürecinde örnek makromantarların temini ve birçok konuda destek ve katkılarını sağlayan hocam Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL'a, tez çalışmamda önerileriyle katkıda bulunan destek ve ilgilerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ercan ÇAÇAN'na, laboratuvar çalışmalarında deneyim ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımlarını esirgemeyen ve meğri geçenbölümün tüm değerli elemanlarına, Dr. Ali AYDIN'a, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına şükranlarımı sunmayı borç bilirim.

Tez tasarımına katkılarından dolayı değerli okul müdürüm Mustafa SAKA'ya maddi ve manevi hep yanımda olan kıymetli kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Şahin PALTA'ya, tez çalışmam sırasında her türlü destek ve yardımlarıyla katkıda bulunan arkadaşlarıma buzorlu yolculukta beni motive eden kıymetli öğrencilerime hep ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim gerçekleştirmeyi düşlediğim hayallerimin peşinden giderken, fekadarlıkları, sevgisi, ilgisi ve desteğiyle her zaman varlığını hissettiğim değerli eşim Fatmanur ŞEBİN'e, oğlum Ahmet Emir'e ve kızım Zeynep Gökçe'ye sonsuz teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGE VEKISALTMALAR</b> .....	v
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Çalışmada Kullanılan Kanser Hücreleri ve Bazı Özellikleri .....	3
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	6
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	15
3.1. Materyal .....	15
3.1.1. Makromantarlar .....	15
3.1.2. Hücre hatları .....	20
3.1.3. Kullanılan araç ve gereçler .....	20
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. Ekstre yöntemi .....	22
3.2.2. Hücre poliferasyon ölçümü .....	22
3.2.3. Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksosite testi .....	23
3.2.4. Apoptotik potansiyel ölçümü .....	23
3.2.5. Migrasyon testi .....	24
<b>4. BULGULAR:</b> .....	25
4.1. Makromantar Ekstrelerinin FL Hücre Hatları Üzerinde Antiproliferative Etkisi .....	26
4.2. Makromantar Ekstrelerinin A549 Hücre Hatları Üzerinde Antiproliferative Etkisi .....	28
4.3. Makromantar Ekstrelerinin HeLa Hücre Hatları Üzerinde Antiproliferative Etkisi .....	30
4.4. Makromantar Ekstrelerinin Hp3B Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferative Etkisi .....	32
4.5. Makromantar Ekstrelerinin HT29 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferative Etkisi .....	34
4.6. Makromantar Ekstrelerinin MCF7 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferative Etkisi .....	36
4.7. Makromantar Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivitesi .....	39
4.8. Makromantar Ekstrelerinin DNA Bantlaştırma Potansiyelleri .....	44
4.9. Makromantar Ekstrelerinin Hücre Göçüne Etkisi .....	45
4.10. Makromantar Ekstrelerinin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi .....	49
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	57
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	61
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Kısatma</u>	<u>Açıklama</u>
HeLa	: Human cervical carcinoma cell line
HT29	: Human colorectal adenocarcinoma cellline
MCF7	: Meme kanseri
A549.	: Akciğer kanseri
Hep3B.	: Hepotoma
FL	: Normal amniyon hücresi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium, High
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz
SEM	: Standart hata
TUNEL	: Terminaldeoxynucleotidyltransferasemediatedd
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
LZM	: <i>Lactarius zonarius</i> Metanol
LZE	: <i>Lactarius zonarius</i> Etilasetat
LZH	: <i>Lactarius zonarius</i> Hekzan
PSM	: <i>Polyporus sguamosus</i> Metanol
PSE	: <i>Polyporus sguamosus</i> Etilasetat
PSH	: <i>Polyporus sguamosus</i> Hekzan
LSM	: <i>Laetiporus sulphureus</i> Metanol
LSE	: <i>Laetiporus sulphureus</i> Etilasetat
LSH	: <i>Laetiporus sulphureus</i> Hekzan
RFM	: <i>Ramaria flava</i> Metanol
RFE	: <i>Ramaria flava</i> Etilasetat
RFH	: <i>Ramaria flava</i> Hekzan
PAM	: <i>Pholiota adiposa</i> Metanol
PAE	: <i>Pholiota adiposa</i> Etilasetat
PAH	: <i>Pholiota adiposa</i> Hekzan
MTT	: Thiazolyl blue tetrazolium bromide

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 4.1. Etilasetat, metanol, hekzan ekstralarının hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri.....	38
Çizelge 4.2. Etilasetat, metanol, hekzan ekstralarının A549 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.....	39
Çizelge 4.3. Etilasetat, metanol, hekzan ekstralarının Hep3B ve HT29 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.....	41
Çizelge 4.4. Etilasetat, metanol, hekzan, ekstralarının MCF7 ve FL Hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.....	43



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. <i>Ramaria flava</i> 'nın basidiokarpları .....	15
Şekil 3.2. <i>Polyporus squamosus</i> 'un basidiokarpları .....	16
Şekil 3.3. <i>Lactarius zonarius</i> 'un basidiokarpları.....	17
Şekil 3.4. <i>Pholiota adiposa</i> 'nın basidiokarpları .....	18
Şekil 3.5. <i>Laetiporus sulphureus</i> 'un'un basidokarpları .....	19
Şekil 4.1. FL normal hücre hatları üzerine makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri .....	26
Şekil 4.2. A549 hücre hatları üzerine makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri .....	28
Şekil 4.3. Hela hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri.....	30
Şekil 4.4. Hep3B hücrehatları üzerinde makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri.....	32
Şekil 4.5. HT29 hücrehatları üzerinde makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri.....	34
Şekil 4.6. MCF7 hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının antiproliferatif etkileri.....	36
Şekil 4.7. Ekstrelerin A549 ve hela hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi .....	40
Şekil 4.8. Ekstrelerin Hep3B ve HT29 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.....	42
Şekil 4.9. Ekstrelerin MCF7 ve FL hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi. ....	44
Şekil 4.10. Makromantar ekstralarının DNA bantlaşma testi.....	45
Şekil 4.11. Makromantar ekstralarının hela hücre hattı üzerinde hücre migrasyonuna etkileri .....	47
Şekil 4.12. Makromantar ekstralarının hela hücre hattı üzerinde hücre migrasyonuna etkileri .....	48
Şekil 4.13. Makromantar ekstralarının (A) Hela, (hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	50
Şekil 4.14. Makromantar ekstralarının (A) Hela, hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	51
Şekil 4.15. Makromantar ekstralarının (B) HT29 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	52
Şekil 4.16. Makromantar ekstralarının (C) MCF7 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	53

Şekil 4.17.Makromantar ekstrelerinin (D) A549 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	54
Şekil 4.18.Makromantar ekstrelerinin (D) A549 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	55
Şekil4.19.Makromantar ekstrelerinin (E) Hep3B hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.....	56



# 1. GİRİŞ

Doğal ürünler, sağlıklı yaşamın teşvik edilmesi ve hastalıkların tedavisinin yanı sıra ilaçlarının üretilmesi ve geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Doğal ürün bazlı ilaç üretimi ve gelişiminin günümüzde kanser de olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasının önemi gittikçe artmaktadır. Kanser ve bulaşıcı hastalıklar alanında kullanılan ilaçların yarısından fazlası doğal orijinlidir (Baykara,2016). 1900'lü yıllarda ölümlerin çoğu bulaşıcı hastalık kaynaklı iken kanser nedeniyle ölümlerin oranı %10 seviyesinde olduğu belirtilmiştir (Hua,2011). Günümüzde enfeksiyon hastalıkları zorda olsa bir şekilde kontrol altına alınabildiği halde, aynı ilerleme kanser tedavisine yansımamıştır (Thurston, 2007).

Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de hastalıklar ve ölümler arasındaki yeri açısından gerçekçi bir rakam vermek olası değilse de kanserden ölümler kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Çevre kirliliği, sigara, alkol, radyasyon ve kimyasallara maruz kalmanın kanser insidansında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Anonymus, 2014). Bugün kanser tedavisinde bilinen üç önemli yöntem vardır; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi. Bunların dışında fotodinamik terapi antikor ve aşı ilişkili yaklaşım ve gen terapisi gibi yöntemler gelecek için önem arz etmektedir (Roscemberg, 2005).

Kemoterapi, seçici olarak bir tümörü yıkabilen ya da en azından büyümesini sınırlayan düşük molekül ağırlıklı ilaçların kullanıldığı bir yöntemdir. Kemoterapi olarak adlandırılan sentetik veya doğal yollarla elde edilen maddelerin kanser hücrelerini öldürmek üzere kullanılması -şeklindedir. Genellikle kanser kemoterapisinde kullanılan maddeler, kanser hücreleri ve normal hücreler arasında ayırım yapmaksızın etkili olmaktadır. Bu ajanların bir avantajı düşük molekül ağırlıklı olmalarıdır. Böylece bütün dokulara rahatça ulaşabilirler. Ancak bunlar sitotoksik ajan olduklarından kemik iliği baskılanması, GI lezyonları, saç dökülmesi, mide bulantısı ve ilaç direncinin hızlı gelişimi gibi istenmeyen yan etkiler gösterirler (Youniç, 2004).

Cerrahi yöntem ise uzun yıllardır kanseri tedavi etmek için kullanılan bir yöntemdir. Cerrahi aynı zamanda kanserin teşhisinde, ne kadar yayıldığını öğrenme aşamasında da önemli bir rol oynar. Cerrahi tekniklerdeki yeni gelişmelerle ameliyat ile tedavi

yaptığında o işleme invazif cerrahi denir. Artık tümör normal dokuya zarar verilmeden, daha az kesi içeren işlemler ile çıkarılıyor. Cerrahi, pek çok kanser türünün tedavisinde özellikle vücudun başka bölgelerine yayılmamış olanlar için büyük bir şans sunar. Radyasyon tedavisi, kanser ve diğer problemleri tedavi etmek için radyasyonun kullanımınıdır. Radyasyonun farklı türleri vardır; x-ray buna bir örnektir. X-ray gibi bir radyasyon türünün çok daha yüksek dozlardaki hali bazı kanser türlerinin tedavilerinde kullanılır. Özel teknolojilerle kanser hücrelerine ya da tümöre yüksek dozlarda radyasyon yollanır. Radyasyon tümörün yakınlarındaki normal hücreleri de etkiler ama normal hücreler kendilerini onarabilirken kanser hücreleri onaramazlar (Bhoolab,2003). Çağımızın en önemli hastalıklarından biri olarak görülen kanser, milyonlarca kişinin ölümüne neden olmaktadır (Sung, 2009). Kanser, ileri evrelerde vücuttaki fiziksel hasarlar yanı sıra psikolojik olarak da yıpratıcı etkilere neden olmaktadır (Whaiti,2008). Bu denli insan hayatını olumsuz etkileyen ve insanları ölüme sürükleyen bir hastalığın tedavisi için bilim adamları bu konuya yönelik çeşitli araştırmalar yapmaktadır. Çalışmaların daha çok kanserin tipi ve kanser gelişimini etkileyen faktörler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Oluştugu organ ve dokuya bağlı olarak, kanserin gelişimini ve proliferasyonunu tetikleyen birçok vücut içi ve dışı faktör bulunması nedeniyle tedavisi, kanser türüne göre değişiklik göstermektedir. Kemoterapik ajanların, normal hücreleri etkilememesi, sadece kanserli hücreleri ortadan kaldırması istenmektedir. Günümüzde birçok madde, hedefe yönelik olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla araştırılmaktadır. Ancak bu maddelerin çok azı günümüzde kanser tedavisinde kullanılabilir durumdadır (Sullivan, 2006).

Eski zamanlardan beri insanlar ilaç olarak çeşitli mantar ve bitkilerden faydalanır, hatta bugün bile insan nüfusunun yaklaşık %70'den fazlası tamamen çaresiz kaldığı zaman alternatif tıbbi tercih ederek çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkileri kullanmaktadır (Elgorashi, 2003). Hastalıkların tedavisinde önem kazanmaya başlayan doğal ürünler içlerindeki biyoaktif komponentlerin izolasyonu yoluyla tüm dünyada sağlıklı yaşama katkıda bulunmaktadır. Mantarlar sahip oldukları tıbbi özellikleri nedeniyle tarih boyunca çeşitli hastalıklara karşı kullanılmıştır. Penisilin keşfiyle beraber bilim insanları mantarların sahip olduğu biyo-aktif makromolekülleri ortaya çıkarmak için büyük emek harcamaya başlamıştır. Mantarlar bünyelerinde polisakkarit ve protein yapıda farklı biyolojik aktivitelere sahip çeşitli makromoleküller içermektedir (Reshetnikov ve Tan, 2001). Bu biyo-aktif makromoleküllerin antitümör, antibakteriyel

ve antifungal aktivitelerinin olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki değişik yöntemler kullanılarak çok yeni mantar kaynaklı bileşikler üretilebilmektedir. Örneğin polisakkaritler ve lentinan, terpenler, alkaloidler, lakkaz ve glukoz oksidaz gibi enzimler bunların arasında sayılabilir. Fakat yeni üretilen birçok mantar türevi bileşiklerinin antiproliferatif etkileri hakkında az çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla yeni ekstre edilecek mantar türevi bileşikler veya bunların karışımlarının da antikanser aktiviteye sahip olma potansiyeli bulunduğu yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır. Bu alanda yapılmış bazı çalışmalara ve elde edilen sonuçlarına bakıldığında makromantar ekstralarının antikanserojenik etkilerinin bulunduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca Tokat ve çevresinin zengin makromantar türlerine sahip olması bu çalışmanın yapılmasına teşvik edici bir unsur olmuştur. Tokat ve çevresinden toplanan mantarların (*Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus*, *Ramaria flava*) çeşitli çözücülerle ekstraları çıkarılarak hücre poliferasyon ölçümü, Laktat dehidrogenaz ile (LDH) sitotoksite testi, apoptotik potansiyel ölçümü, migrasyon testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bazı mantar türlerinin önemli seviyede antiprolatif etkisinin olduğu, sitotoksik etkilerinin ise düşük olduğu gözlenmiştir.

### **1.1. Çalışmada Kullanılan Kanser Hücreleri ve Bazı Özellikleri**

HeLa Hücreleri (Serviks adenokarsinomu):

HeLa hücreleri adheren olup insan kaynaklı kanser hücre hattıdır ve epitelyal morfoloji gösterirler. Serviks epitelyal adenokarsinom hücreleridir. 1952 yılında (Scherer ve ark., 1953) tarafından 31 yaşında zenci bir kadından alınmıştır. Bu hücrelerin immünoperoksidaz boyama ile keratin pozitif oldukları gösterilmiştir. Poliovirüslere duyarlı olup, human papilloma virus 18 (HPV-18) dizileri içerirler. P53 ifadeleri düşük, pRB ifadeleri normal bulunmuştur (Anonim, 2019a).

HT29 Hücreleri (Kolon kanseri):

HT29 hücreleri adheren özellikte olup insan kaynaklı kanser hücre hattıdır (44 yaşında Kafkas kökenli bir kadından izole edilmiştir) ve mikrovillus içerir. HT29 hücreleri ürokinaz reseptörlerine sahiptir. Ancak plazminojen aktivatör aktivitesi belirlenememiştir. HT29 hücreleri CD4 için negatiftir ancak hücre yüzeyi galaktoz seramid ifadesine sahiptir (HIV için alternatif reseptör olabilir). HT29 hücrelerinde c-



myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis ve fos onkogenleri ifade edilir. Bu hücrelerde p53 antijeni çok miktarda üretilir ve 273 nolu kodonda G>A mutasyonu olur, bunun sonucu Arg>His aminoasidine dönüşür. Kolorektal adenokarsinom olan HT29 hücreleri epitelyal morfolojigösterirler. HT29 hücreleri IgA (immüoglobülin A), CEA (karsinoembriyojenik antijen), TGF-binding protein (transforme edici büyüme faktörü-beta bağlayıcı protein) ve musin üretirler. HLA, Rh+, A kan grubu gibi antijenleri taşıyır (ATCC).

MCF7 Hücreleri (Meme kanseri):

MCF-7, 1970 yılında ilk kez 69 yaşında bir Kafkas kadının meme dokusundan izole edilen bir hücre dizisidir. Aldığı iki mastektomiden ilki, çıkarılan dokunun iyi huylu olduğunu ortaya çıkardı. Beş yıl sonra ikinci bir operasyon, sonunda MCF-7 hücre soyuna yol açacak olan dokudan alınan bir plevral efüzyonda bir malign adenokarsinom ortaya çıkardı. Verici radyoterapi ve hormonoterapi ile meme kanseri için tedavi edildi. Meme adenokarsinomundan türetilen, yaygın olarak çalışılan bir epitelyal kanser hücresi soyu olan MCF-7, farklı epitel epitel özelliklerine sahiptir. MCF7 hücreleri, PI3K ve MAPK tutulumunu tespit etmek için ERK ve Akt fosforilasyonunun kolayca saptanması ile birlikte kullanılabilir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri yoluyla, bu hücreler estradiolü işleme yeteneğine sahiptir.

Hep3B Hücreleri (Hepatoma):

Hep3B hücreleri adheren özellikte olup insan kaynaklı kanser hücre hattıdır. Hep3B olarak adlandırılan hücre dizileri Amerika Birleşik Devletleri'nden (1976) 8 yaşındaki bir siyah erkeğin lobektemisi sonucu olarak elde edildi. Hep3B olarak adlandırılan hücre dizisinin aşı kullanımını için HBsAg bileşenlerinin üretilmesi amacıyla kullanılırlar. Potansiyel karsinojenlerin ve mutajenlerin taranması, virüslerin yetiştirilmesi ve aşuların hazırlanması için metabolik çalışmalar için yararlı olan insan hepatoma hücre dizileridir.

A549 Hücresi (Akciğer adenokarsinom):

A549 hücresi, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücrelerdir ve ilk olarak 1972'de D.J. Giard ve diğ. 58 yaşında beyaz bir erkeğin eksplante tümöründe kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi yoluyla elde edildi. Hücreler, akciğer kanseri çalışması ve buna karşı ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için model olarak kullanılır. Akciğer dokusunda bulunan A549 hücresi, alveoller boyunca su ve elektrolitler gibi bazı maddelerin difüzyonundan sorumludur. A549 hücresi in vitro kültürlenirse, tek tabaka halinde büyür; kültür şişesine yapışır. Hücreler lesitini sentezleyebilir ve membran fosfolipitlerini korumak için önemli olan yüksek seviyelerde doymamış yağ asitleri içerebilir. A549 hücresi, ilaç metabolizması ve transfeksiyon konakçılığı için tip II pulmoner epitelyal hücre modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hücre kültüründe yeterli uzun süre büyütüldüğünde, çok katmanlı gövdelerin varlığıyla işaret edildiği üzere, A549 hücresi farklılaşmaya başlayabilir.

FL Hücresi (Normal amniyon hücresi):

Bu hattın başlangıçta normal amniyondan türediği düşünülür, ancak daha sonra HeLa hücre kontaminasyonu yoluyla kurulmuş olan izoenzim analizi, HeLa markör kromozomları ve DNA parmak izine dayalı olarak bulundu. Hücreler immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitifdir. Hücreler immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitifdir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan ve belirsiz etyopatolojisi bulunan progresif bir hastalıktır (Weaver ve ark., 1997). Kanserli hücrelerin kaynağı sağlıklı hücreler olmasına rağmen bazılarında morfolojik olarak birçok farklılıklar vardır. Bir dokuyu oluşturan normal hücrelerdeki düzenli sıralanışın, kanserli hücrelerde kaybolduğu gözlenirken bu hücrelerin ilkel hücre fazına dönüştüğü gözlenir.(Zang ark.,2009). 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 kanser hücrelerinde bölünme sınırsızdır ve gelişme devam eder. Tümörlü hücrelerin gelişiminde devamlı çalışan uyarıcılara gerek yoktur. Ayrıca kanserli hücrelerin birden fazla, büyük ve hiperkromatik çekirdeklerinin olması bu hücrelerin belirgin özelliklerindedir (Reshetnikov ve Tan, 2001). Kimyasal karsinogenlerin çoğu hücre içi makro moleküllerle direkt olarak etkileşmeden önce metabolik aktivasyona gereksinim duyarlar. Bu maddelerin çoğu Faz I enzimleri olarak bilinen Sitokrom P450 (CYP450)'nin izoformlarını içeren enzimler tarafından reaktif elektrofilik metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitler genomik DNA'ya bağlanabilir veya onkogenleri aktive edebilirler (Liska, 1998). Kanser oluşumu genetik yani mutasyonel ve epigenetik değişiklikler üzerinden gelişen bir süreçtir (Plass ve ark., 2002, Croce ve ark.,2008).

Kanserlerin çoğunda ilk adım mutasyondur. Bu mutasyonlar UV, kimyasallar, radyoaktivite virüs enfeksiyonları gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar tarafından oluşturulabilir. Bu ajanlar DNA'yı zedelediği veya değiştirdiği için kanser gerçekte bir genom hastalığıdır (Sezgin, 1998, Murray, 2004). Hücre çevreden gelen mesajlara göre çoğalır, farklılaşır ya da apoptozise uğrar. Hücre çoğalmasında görevli üç grup protein vardır. Bunlar protoonkogenler (myc, ras), tümör süpressör genler (p53, p21, pINK4A ve retinoblastoma) ve apoptik gen (Bcl 2, Bax) ürünleridir. Kanser olgusu bu üç tip proteini kodlayan genlerden birinin bozulmasına dayanır (Liu,2004). Örneğin; tübülün inhibitörleri ve antimetabolitler hem tümör hücrelerinde hem de sağlıklı hücrelerde apoptozisi tetiklediğinden bu tür yan etkilere neden olurlar kanserleşme hızını artırırılar (Rowinsky., 2005).

Tedavide kullanılan çeşitli kemoterapötik ajanların ve radyasyonunda tedavi gören hastaların ileriki yaşlarında kansere neden olabileceğini göstermiştir (Gustave ve ark., 2011). Çocukluk çağında antikanser ilaç tedavisi gören hastalarda daha sonra yumuşak doku sarkomu çıkma olasılığının oldukça yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, 4000 hastadan 16'sında tedaviden üç yıl sonra yumuşak doku sarkomu olduğunu, bunun ise normal bir popülasyonda bu hastalığın çıkma olasılığından 50 kat daha fazla bir değer olduğunu rapor etmişlerdir. DNA-metilleyici ajan olan procarbazine ile tedaviden sonra, bu hastaların ileriki yaşlarında sarkoma gelişme riski de oldukça yüksek çıkmıştır (Thurston, 2007). Çeşitli nedenlerle kemoterapötik ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmaları ve bunların istenmeyen yan etkileri nedeniyle, bunların tedavi edici güçleri azalmaktadır. İlaç direnci gelişimi kanser kemoterapisinde karşılaşılan en büyük problemdir. Bu yüzden, sürekli olarak yeni sentetik ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Avendaño, 2008).

Tıbbi önemi yüzyıllardır bilinmekte olan mantarların son yıllarda polisakkarit-protein komplekslerinin ve polisakkarit izolasyon ve biyolojik aktiviteleri çalışmalarının artması ile mantarların biyoaktif bileşenlerinin tıbbi önemi hakkında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu biyopolimerlerin elde edilen en önemli biyofarmakolojik aktiviteleri, anti kanser ve immünomodülatör etkileridir (Hsieh,2002). Yapılan araştırmalar sonucu olarak makromantarların polisakkaritlerinin birçok kanser çeşidine karşı inhibe edici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Hastalıkların tedavisinde önem kazanmaya başlayan doğal ürünler içlerindeki biyoaktif komponentlerin izolasyonu yoluyla tüm dünyada sağlıklı yaşama katkıda bulunmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay alan ilaçların yaklaşık %60'ı ve dünyada klinik kullanımda olan ilaçların %50'si doğal kaynaklıdır (Sithranga, 2010).

Fakat yeni üretilen birçok mantar türevi bileşiklerin antiprolatif potansiyeli bilinmemektedir. Dolayısıyla yeni ekstre edilecek mantar türevi bileşikler veya bunların karışımlarının da antikanser aktiviteye sahip olma potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir.

Bu kapsamda makromantarlar ile birçok çalışma yapılmış olduğunun görüyoruz. Literatür çalışmalarına bakılacak olursa; Mantarlar doğada, tedavi edici ve antitümör etkiye sahip bileşikleri içermeleri bakımından değerli bir kaynak oluşturmaktadırlar. Birçok mantar türünün antitümör özellik gösteren içeriği tanımlanmıştır. Kore'de

yapılan araştırmada, Chaga (*Inonotus obliquus*) mantarından üç farklı altfraksiyon (3 $\beta$ -hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al, inotodiol ve lanosterol) elde ederek kanser hücreleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bütün alt fraksiyonlar seçilmiş kanser hücrelerinin (A549, AGS, MCF-7, HeLa) proliferasyonunu baskılamışve, normal hücrelere karşı ise düşük sitotoksik etki göstermiştir. Alt fraksiyon 1 (3 $\beta$ -hydroxy-lanosta8,24-dien-21-al)'in; alt fraksiyon 2 (inotodiol) ve alt fraksiyon 3 (lanosterol) 'e kıyasla kanser hücrelerine karşı daha etkili olduğu görölmüştür. İnhibisyon oranları göz önüne alındığında en etkili olan altfraksiyon 1, kanser hücrelerine karşı A549; %66.7, AGS; %72.2, MCF-7; %67.4, HeLa; %69.5 seviyesinde etki göstermiştir (Wang,2007). Bu deneylere ilaveten, fare Sarcoma-180 hücreleriyle yapılan in vivo deneylerde, üç farklı alt fraksiyondan birinci alt fraksiyonun çok daha etkili olduğu ve tümör hacminin doza bağlı olarak, %23 ve %33 oranında küçölmesine sebep olduğu gözlenmiştir (Chung, 2010). Lezzetleri dolayısıyla dünya çapında sevilerek tüketilen *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* ve *Volvariella volvacea* mantarları üzerine Tayvan'da yapılan araştırmada, protein ekstraktlarının insan kolorektal adeno karsinom ve insan monositik lösemi hücrelerine karşı tedavi edici etkisi olduğu belirlenmiştir (Wu, 2011). *Amanita phalloides* ve *Laetiporus sulphureus* mantarlarında sitolitik lektinler dışında antikanserojen etkileri tespit edilmiştir (Tateno ve Goldstein, 2003). *Amanita virosa* mantarıyla yakın zamanda yapılan bir çalışmada en az iki tane yüksek derecede toksik protein (hemolitik lektin ve Toxovirin) elde edilmiş ve bunların memeli lösemi hücrelerinin canlılıklarını düşürdüğu, büyümelerini baskıladığu gözlenmiştir. *A. virosa* lektini, *A. phalloides* lektininden farklı olarak, kırmızı kan hücrelerine karşı yüksek hemolitik aktivite göstermiştir. Böylece memeli lösemi hücrelerine ve insan T hücrelerine (CEM T4 ve Jurkat hatları) karşı sitotoksik etkiye sahip yeni bir lektin keşfedilmiştir (Antonyuk ve ark.,2010).

Makromantarlar konusunda en önemli gelişmelere uzak doğu ölkelerinde rastlanmaktadır. Avrupa ve diğer bazı dünya ölkelerinde mantarlardan genellikle gıda olarak yararlanılırken, uzak doğu ölkelerinde (Çin, Japonya, Tayvan, Kore) mantarlar yüzyıllardır ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır. Çin ve Japonya gibi Asya ölkelerinde, mantarlar; özellikle de *Tremella fuciformis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* (shiitake) yüzlerce yıl şifa kaynağı ilaç ve yiyecek kaynağı olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2007). Sitotoksik etki üzerine yapılan bir çalışmada ise *Cordyceps militaris* mantarı çok uzun zamandan beri doğu Asya'da kanser hastalarının tedavisinde

kullanılmaktadır. Bu mantardan izole edilen *Cordyceps militaris* proteini (CMP) *Fusarium oxysporum* mantarına karşı güçlü antifungal etkisi, insan meme ve mesane kanser hücrelerine karşı da sitotoksik etkiye sahiptir (Park ve ark., 2009). Güneydoğu Asya ve Çin'de göğüs kanseri tedavisinde kullanılan, kaplan sütü mantarı olarak bilinen *Lignosus rhinocerus*'un soğuk su ekstresi çeşitli kanser hücreleri üzerine etkili olmuştur. İnsan meme karsinom (MCF-7) ve insan akciğer karsinom (A549) hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösteren mantar ekstresinin, karşılaştırma amaçlı kullanılan, insan sağlıklı göğüs (184B5) ve insan sağlıklı akciğer (NL 20) hücrelerine karşı herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Lee, 2012).

*Lentinula edodes* (shiitake) mantarı, heteroglikan-protein konjugatı LEM, peptidpolisakkarit kompleksi KS-2 ve yüksek moleküler ağırlıklı polisakkarit olan Lentinan gibi terapötik polisakkaritlerin kaynağını oluşturmaktadır (Chihara ve ark, 1970; Chihara ve ark., 2011). *Lentinula edodes* mantarının sitotoksik etkileri araştırılırken, şapkasından ve misellerinden ayrı ayrı ekstreler elde edilmiş. Şapkasından elde edilen ekstrenin tümör hücrelerini (MCF-7) %90'dan fazla baskıladığı görülmüştür. Kanser hücresine karşı IC50 değeri, ortalama 73 µg/ml, normal hücrede ise, IC50 değeri 140 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Lentinula edodes* mantarının misel ekstresinin uygulanması sonucu elde edilen bulgulara bakıldığında ise, kanser hücresine karşı IC50 değeri, ortalama 11 µg/ml, normal hücrede IC50 değeri 15 µg/ml olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *Lentinula edodes* mantarının suyla elde edilmiş ekstresi, kanserli hücrelerin bölünmesini baskılamıştır. Normal hücreyle inhibisyon konsantrasyonları karşılaştırıldığında, normal hücreye göre çok daha etkili olduğu, *Lentinula edodes* mantarı şapkasının, misellerine kıyasla daha sitotoksik olduğu kanıtlanmıştır (Israilides ve ark., 2008). Dalak, tümör bağışıklığında rol alan önemli bir organdır ve splenik sempatik sinir, splenik doğal öldürücü (NK) sitotoksitesisi üzerine baskılayıcı etkiye sahiptir. Shiitakemantarı üzerine yapılan başka bir araştırmada splenik- sempatik sinir aktivitesini (SNA) baskılayıp NK sitotoksitesisinin azalmasına yol açarak tümör hücresi proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Shen, 2009). Elde edilen farklı verilere göre, antiproliferatif (Liu ve ark., 2006), antitümör, immünmodülatör ve mitojenik (Ngai ve Ng, 2004) aktivitelere sahip mantar kökenli lektinlere, mantarın şapka, sap, spor ve misellerinde rastlanabilmektedir. Yenilebilir bir mantar olan *Agrocybe aegerita* şapkasından izole edilen antitümör özelliğe sahip lektinler (AAL); HeLa, SW480, SGC- 7901, MGC80-3, BGC-823, HL-60 gibi çeşitli

insan tümör hücre hatlarının ve bunun yanında in vivo çalışma olarak, fare sarkoma S-180 tümör hücresinin büyümesine karşı güçlü baskılayıcı etki göstermiştir (Zhao ve ark., 2003). *Coriolus versicolor* mantarından elde edilen polisakkaropeptit (PSP) ve protein bağlı polisakkarit (Krestin olarak da bilinen PSK) bileşenlerinin lösemi, lenfoma, hepatom, göğüs, akciğer ve prostat tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılayarak güçlü biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kidd, 2000; Hsieh, 2002; Lau, 2004). Metanol çözücüsü kullanılarak elde edilen *Coriolus versicolor* mantarı ekstresinin (terpenoidleri ve polifenollerini içeren) in vivo ve in vitro koşullarda yapılan deneyler sonucu anti-melanom etkisi göstermiş, B16 fare melanom hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkiye yol açtığı gözlenmiştir (Harhaji, 2008). *Amanita virosa* mantarıyla yakın zamanda yapılan bir çalışmada en az iki tane yüksek derecede toksik protein (hemolitik lektin ve Toxovirin) elde edilmiş ve bunların memeli lösemi hücrelerinin canlılıklarını düşürdüğü, büyümelerini baskıladığı gözlenmiştir. *A. virosa* lektini, *A. phalloides* lektininden farklı olarak, kırmızı kan hücrelerine karşı yüksek hemolitik aktivite göstermiştir. Böylece memeli lösemi hücrelerine ve insan T hücrelerine (CEM T4 ve Jurkat hatları) karşı sitotoksik etkiye sahip yeni bir Lektin keşfedilmiştir (Antonyuk ve ark., 2010). Hasta vücuduna zarar vermedikleri ve ek strese yol açmadıkları için mantar polisakkaritleri, biyolojik yanıt düzenleyiciler olarak kabul edilmektedirler. Mantar polisakkaritleri sadece immünoterapötik amaçlı değil, anti-inflamatuar, antiviral, antitrombotik, hipoglisemik ilaçların geliştirme çalışmalarında da kullanılmaktadır (Wasser ve Weis, 1999).

Makromantarlardan izole edilen üç polisakkarit immünoterapötik ajanları Krestin, Lentinan ve Sonifilan kanser antitümör ajanı ve tedavisinde kullanıldıkları görülmektedir. Genellikle sindirim organları kanseri olmak üzere, göğüs akciğer, serviks mide ve kanseri tedavisinde kullanılmaktadırlar. Birçok etkili biyolojik yanıt düzenleyicileri (BRM) çeşitli mantarlardan izole edilmişlerdir. Örneğin *Lentinus edodes* mantarından *Lentinan*, *Trametes* (*Coriolus*), *versicolor* mantarından Krestin (PSK) Japonya'da kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Mantar polisakkaritleri immün hücrelerini aktive ederler ve hematopoezi arttırırlar. Bu polisakkaritler herhangi bir yan etkiye sebebiyet vermeksizin antitümöretki göstermektedirler (Moradali ve ark., 2007). Bu etkilere örnek olarak, *Grifola frondosa* mantarıyla çalışan bilim insanları sıcak suyla yaptıkları ekstraksiyon sonucu elde ettikleri ekstraktın %46 karbonhidrat, %54 protein içerdiğini belirlemişlerdir. Önceden bulmuş oldukları MD fraksiyonundan farklı olarak

maitake Z fraksiyonunu (MZF) izole etmişler ve MZF polisakkaritinin %98,7 karbonhidrat içerdiğini, *in vivo* antitümör çalışmalarında ise kontrol grupları olan BALB/cA fare kolon-26 kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında, tümör büyümesini %47.6 oranında baskıladığını gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda, Dgalaktoz, D-mannoz, L-fukoz ve D-glukoz 'dan meydana gelen MZF'nin fare tümör modelinde immün yanıtı uyararak tümör regresyonuna neden olduğu kanıtlanmışlar (Masuda ve ark., 2009). Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki hücre homeostazı devam ettirmek için önemli bir yoldur ve ökaryotlarda doku gelişimi ve homeostazın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden kanser hücrelerinde apoptozisin uyarılması, antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde amaçlanan önemli bir stratejidir (Kaufmann ve Earnshaw, 2000), (Kaufmann ve Hengartner, 2001). Mantarlar aleminde *Polyporaceae* ailesinden çeşitli türler, yeni ilaçların kaynağı olarak görülmektedir. Birkaç farklı çözücü (etil asetat, metanol, su) kullanılarak elde edilen ekstralarının etkilerine bakılan *Phellinus rimosus* polipor mantarının, test edilen hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antitümör aktiviteleri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullandığımız türlerden olan *Polyporus squamosus*' ile yapılan bir çalışma örneğinde; Romanya'dan gelen yabani *Polyporus squamosus*'un (Hud.) Fr kimyasal bileşiminin (besin değeri, serbest şekerler, organik asitler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve tokoferoller) ve biyoaktif özelliklerinin (antioksidan, antimikrobiyal ve antiqorumun algılanması) tespit edilmesini amaçlamış. Sonuçlar ise *P. squamosus*'un şapka ve saplarında ayrı ayrı yapılan çalışmada, karbonhidratlar (100 g dw başına 74.22 g) ve proteinler (100 g dw başına 18.7 g) bakımından zengin olduğunu göslenmiş. Trehaloz ana serbest şeker iken, malik asit en yüksek miktarda (100 g dw başına 2.21 g) tespit edilmiş. Organik asit ve p-hidroksibenzoik asit ana fenolik bileşik olmuştur. Tokoferoller arasında  $\beta$ -tokoferol (100 g dw başına 114.7g), çoklu doymamış yağ asitleri bütün yağ asitlerinin% 57'sinden fazlasını vedoymamış yağ asitleri (% 24.96) düzeyinde olmuştur. *P. squamosus* özütünün ölçülen en yüksek antioksidan etkisi, TBARS inhibisyonu deneyi ( $EC_{50} = 0.22 \text{ mg mL}^{-1}$ ), ardından  $\beta$ -karoten / linoleat deneyi ( $EC_{50} = 1.41 \text{ mg mL}^{-1}$ ) kullanılarak bulunmuş. Test edilen ekstraktların minimal bir inhibitör konsantrasyonu 0.61–20.4 mg mL<sup>-1</sup> arasında, bakteri öldürücü etki ise 1.2-40.8 mg mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Test edilen bütün konsantrasyonlarda antibiyofilm potansiyeli elde edilmiş ve ekstraktın önleyici konsantrasyonları bir antiqorum etkisi sergilenmiş. Ayrıca araştırılan biyoaktiviteler ve *P. squamosus*'un



bileşiklerinin antioksidan antimikrobiyal ve antikanserojen bir bileşen olarak kullanılabilirliği tespit edilmiştir (Andrei, 2018).

Yenilenebilir mantarlardan olan bu tezde de kullandığımız *Ramaria flava*'nın, antikanser, antioksidan ve antibiyotik aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada *R. flava* etanol ekstraktının (EE) kimyasal bileşimi değerlendirilmiş ve çalışma EE'nin test edilen üç tümör hücre hattında IC50 değeri 66.54 µg / mL olan tümör hücresi MDA-MB-231'e karşı en güçlü inhibitör etkinliği gösterdiğini ve inhibisyon yüzdesinin 200 µg/mL konsantrasyonda% 71.66 olduğunu göstermiş Toplam fenolik bileşikler, kuru ağırlık başına EE'nin dört fraksiyonu arasında 6.66 ila 61.01 mg gallik asit eşdeğeri (GAE) arasında değişmiştir. Su fraksiyonu, düşük IC50 değerleri 5.86 ve 18.08 µg / mL olan yüksek DPPH ve OH radikal temizleyici faaliyetler sergilemiş (Liu,2013).

Altı farklı yenilebilir mantarın hücre büyümesini inhibe edici potansiyelini ortaya çıkarmak için tasarlanmış çalışmada kullanılan mantarlar ise: *Ramaria flava*, *Agrocybe molesta*, *Volvopluteus gloiocephalus*, *Lactarius deliciosus*, *Bovista plumbea*'dır. *Tricholama terreum*'un metanolik ekstraktları (IC50 = 1.62 mg / mL) ve *B. plumbea*'nın sulu ekstraktları (IC50 = 0.49 mg / mL) maksimum metal kenetleme aktivitesi göstermiş. En yüksek indirgeme kapasiteleri, *R. flava*'nın metanolik özleri (EC50 = 1.65 mg / mL) ve *B. plumbea*'nın sulu özleri (EC50 = 1.71 mg / mL) arasında gözlenmiş. Araştırılan mantarların farklı ekstraktlarının önemli ölçüde antioksidan ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu ve ümit verici bir tedavi edici kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiş (Sadi,2016).

Dünyada tıbbi amaçlı kullanılan en önemli makromantar türlerinden birisi de ölümsüzlük mantarı olarak bilinen *Ganoderma lucidum*'dur. Bu mantar bünyesinde birçok rahatsızlığın şifasını barındırmaktadır. Anti-tümör (Muller, 2006; Liu, 2009), antimikrobiyal (Wang ve Ng, 2006), antiviral (özellikle anti- HIV aktivitesi) (Min ve ark., 1998) ve yaşlanmayı geciktirici (Shieh, 2001) etkileri gibi. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Ganoderma lucidum* mantarındaki bir kısım triterpenlerin güçlü sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Cheng, 2010).

Etil asetat ve metanol ekstrelerinin Dalton's lenfoma asit (DLA) ve Ehrlich's asitkarsinom (EAC) hücrelerine karşı güçlü sitotoksik aktivitesi göstermiş ama su

ekstresinin sitotoksik aktivitesi görülmemiştir. En yüksek antitümör aktiviteye sahip ekstre olarak etil asetat ekstresi kayda geçmiştir. Fakat üç ekstrenin de fare Dalton's lymphoma ascites tümör hücresinin büyümesini baskıladığı kaydedilmiştir (Ajith ve Janardhanan, 2003).

*Pleurotus ostreatus* mantarı hücre içi ve hücre dışı polisakkaritlerinin ayrı ayrı etkileri incelendiğinde, insan karsinom hücrelerinin büyümesini hücre içi polisakkaritler %10-35; hücre dışı polisakkaritler ise %15-60 oranında baskıladığı görülmüştür. Dört farklı hücre hattından en çok etkilenen hücre hattı RL95 (%60), en az etkilenen ise HCT116 (%10) hücresi olmuştur (Silva, 2012).

Günümüze dek yapılan araştırmalara bakıldığında, medikal özellikteki mantarların tedavi edici kapasiteleri yüzyıllardır bilinmekte ve uygulanmaktadır. Yaklaşık olarak bilinen 15000 mantar türünden, 2000 mantar türü insan tüketimi için güvenli ve 650 mantar türü ise medikal özelliğe sahiptir (Wasser, 2002). Ancak günümüzde yalnızca 20 mantar türü klinik olarak kullanılmaktadır. Tüm bu yapılan araştırmalarla ve edinilen bilgilerle, gelecekte çok daha fazla mantar türü ilaç kaynağı olarak kullanılabilir, birçok hastaya doğal şifa kaynağı olabilecektir.

Özellikle sayısı günden güne artan kanser hastaları için birçok yıpratıcı yan etkiye sahip (kemik iliğinin baskılanması ile kemik iliğinde üretilen akyuvarların (lökositlerin), alyuvarların (eritrositlerin), trombositlerin sayısının düşmesi dolayısıyla halsizlik kemoterapik tedavilere kıyasla yan etkisi neredeyse olmayan ve bağışıklık sistemini aktive ederek etki gösterebilen doğal fungal maddeler tedavilerde daha sıklıkla kullanılabilir hale getirilebilmelidir. Mantar Polisakkaritlerin antitümör aktivitesi, moleküllerin boyutuna, dallanma derecesine, formuna ve sudaki çözünürlüğüne göre değişebilmektedir. Genellikle mantarların molekül ağırlığı ve polisakkaritlerin suda çözünürlüğü ne kadar yüksekse antitümör aktivite de o kadar yüksek olmaktadır (Wasser,2002; Ren ve ark, 2012). Mantar polisakkaritleri, antitümör etkilerini esas olarak konakçının bağışıklık tepkisinin aktive edilmesi yoluyla gerçekleştirirler. Bu maddeler biyolojik yanıt düzenleyicileri olarak kabul edilmektedirler. Temel olarak; vücuda zarar vermemekte ve ek bir stres uygulamamakla birlikte, vücudun çeşitli çevresel ve biyolojik streslere adapte olmasına yardımcı olmakta, sinir, hormonal ve bağışıklık sistemlerinin bazılarını veya tamamını destekleyip düzenlemektedirler (Ren

ve ark., 2012). Bu çalışmada ise etilasetat, metanol, hekzan gibi farklı çözücüler kullanılarak elde edilmiş mantar ekstralarının antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada *Polyporus squamosus* Metanol (PSM), *Polyporus squamosus* Etilasetat (PSE), *Polyporus squamosus* Hekzan (PSH), *Laetiporus sulphureus* Metanol (LSM), *Laetiporus sulphureus* Etilasetat (LSE), *Laetiporus sulphureus* Hekzan (LSH), *Ramaria flava* Metanol (RFM), *Ramaria flava* Etilasetat (RFE), *Ramaria flava* Hekzan (RFH), *Pholiota adiposa* Metanol (PAM), *Pholiota adiposa* Etilasetat (PAE), *Pholiota adiposa* Hekzan (PAH) ekstralarının (15, 30, 60, 90, 120, 150, 225 ve 300 µg/mL) antiproliferatif ve sitotoksik etkileri MTT hücre proliferasyon testi ve LDH sitotoksikite ölçümü kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmanın devamı olarak biyoaktif maddelerin izolasyonu, antikanser aktiviteye sahip yüksek saflıkta bileşiklerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan ve Tokat bölgesinden toplanan bazı makromantar türlerinin etilasetat, metanol, hekzan ekstraktları kimya bölümünde hazırlanmıştır. Bu ekstraktların antikanser aktivitelerinin belirlenmesinde HeLa (insan serviks karsinoma hücre hattı), HT29 (insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı), A549 (insan akciğer adenokarsinoma), Hep3B (insan hepatocellular carcinoma), MCF7 (meme kanseri hücresi) hücre hatları kullanıldı. Çalışılan bu kanser hücre hatları ve FL amniyon hücresi çoğaltıldıktan sonra azot tankında dondurulmuş olarak saklandı.

#### 3.1.1. Makromantarlar

##### *Gomphaceae*

##### *Ramaria flava* (Schaeff.) Quél

Makroskopik ve mikroskopik özellikleri: Bazidiokarp 10-20 cm yüksekliğinde, 7-15 cm genişliğinde, limon veya sülfür sarısı, daha sonra sarımsı kahverengi renk alır. Bazidiokarp yoğun olarak dallanmıştır. Sap 50-80 x 40-50 mm, beyazımsı tabana sahiptir ve özellikle ileri dönemlerde yaralandığında kırmızımsı kahverengi renk alır.



Şekil 3.1. *Ramaria flava* basidiokarpları

Eti beyaz-soluk sarımsı, kırılğan ve içi doludur. Sporlar 11-18 x 4-6,5  $\mu\text{m}$ , eliptik, pürüzlü ve soluk sarımsı kahverengidir.

**Yetiştirme yeri özellikleri:** Tokat-Niksar Çamiçi Yaylası, *Pinus sylvestris* ormanı, 40° 38' 35" K, 036° 56' 04" D, 17.05.2014, 1132 m (TURK 4185).

### ***Polyporaceae***

*Polyporus squamosus*(Huds.) Fr.

Makroskopik ve mikroskopik özellikleri: Bazidiokarp 10-40 cm çapında ve 1-4 cm çapında, yarım daire veya yelpaze şeklinde, üst yüzeyi sarı veya açık kahverengi renkte, sap kısmından başlayan ve kenarlara doğru gittikçe küçülen ve azalan, az veya çok konsantrik şekilde dizilmiş, tarçın renkli fibrilloz pulludur. Sap 30-100 x 20-60 mm, şapkaya genellikle yandan bağlıdır ve dip kısmı koyu siyahımsı renktedir. Eti genç dönemde beyaz, yumuşak ve sulu, yaşlılarda ise sarımsı kahverengi, sert ve elastiktir. Porlar düzensiz, köşegen, beyazımsı ve krem renkte, şapkanın ve sapın tümünü kaplar. Tüpler dekurrent, beyazımsı ilerleyen zamanda sarımsı renk alır. Spor baskısı beyazdır. Sporlar 12-16 x 4-6  $\mu\text{m}$ , hiyalin, düz, silindirik veya sucuk şeklinde, amiloid değildir. Bazidium 4 sporlu ve sistid bulunmaz.



Şekil 3.2. *Polyporus squamosus* basidiokarpları

**Yetiştirme yeri özellikleri:** Tokat-Erbaa Canpolat Köyü kavak ağaç kütüğü üzeri, 40° 31' 27" K, 036° 37' 35" D, 28.04.2014, 1084 m, (TURK 4171).

### ***Russulaceae***

*Lactarius zonarius* (Bull.) Fr.

Makroskopik ve mikroskopik özellikleri: Şapka 5-12 cm çapında, genç dönemde basık merkezli planokonveks, kenarları içe kıvrık, daha sonra geniş ve huni şeklinde, açık veya koyu turuncu renkli, üzerinde soluk yeşilimsi lekeler ile konsantrik halkalar bulunur. Eti beyaz, şapka kütikulasının altında, lamellerde ve sapın korteksinde koyu turuncu renktir. Lameller genç dönemde krem turuncu renk daha sonra turuncu renk, az dekurrenttir. Sap, şapkayla aynı renkte, beyaz veya açık turuncu üzerinde turuncu benekli, şapkaya yakın uç kısımda beyazımsı, silindirik, genç dönemde içi dolu daha sonra içi boşalır. Spor baskısı krem renktir. Spor 7-9 x 6-7 µm, eliptik, hiyalin, üzerindeki damarlar çok düzenli bir ağ yapısı oluşturur. Sütü kırmızımsı turuncu, 1-2 saat içinde yeşilimsi renge döner.



Şekil 3.3. *Lactarius zonarius* basidiokarpları

**Yetiştirme yeri özellikleri:** Tokat-Yağmurlu Kasabası, karışık ormanlık alan, 40° 32' 18" K, 035° 48' 14" D, 13.06.2014, 1018 m, (TURK 4203).

## ***Strophariaceae***

*Pholiota adiposa* (Batsch) P.Kumm.

Makroskopik ve mikroskopik özellikleri: Şapka 3-5(7) cm çapında, et renginde ve kırmızımsı kahverengi pulludur. Genç dönemde konik-konveks şekillidir ve daha sonra açılır. Nemliken kaygan, kurduğunda matlaşır. Eti açık sarı- krem renktedir. Lameller önceleri açık portakal sarısı-kahverengi, sonra koyu kahverengi renk alır. Sap 2,5-6x0,5-1 cm, silindir şeklinde, esnek ve şapkayla aynı renktedir. Üzerinde tarçın kahverengi, boyuna fibril şeklinde pullar bulunur. Spor baskısı koyu kırmızı kahverengi, sporlar 7-8x4-5,5 µm, elipsoid, düz ve açık sarıdır.

**Yetiştirme yeri özellikleri:** Tokat-Çamlıbel Ortaören Köyü; *Populus nigra* gövdeleri üzerinden toplanmıştır. 40° 02' 06" K, 036° 26' 50" D, 06.11.2013,1240 m, (TURK 3792).



Şekil 3.4. *Pholiota adiposa* basidiokarpları

## ***Fomitopsidaceae***

*Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murril

Makroskopik ve mikroskopik özellikleri: Şapka 10-15(20) cm çapında, sarı veya koyu sarı renkli. Genç dönemde yumuşak olgunluk döneminde sertleşir. Üst üste raf şeklinde katmanlar oluşturur. Eti açık sarımsı renktedir. Spor baskısı sarı, sporlar 12-17 x 4-5,5 µm, elipsoid, düz ve açık sarıdır.



Şekil 3.5. *Laetiporus sulphureus* basidiokarpları

**Yetiştirme yeri özellikleri:** Tokat-Çamaltı Köyü; *Salix alba* gövde, 40° 16' 11" K, 036° 26' 07" D, 14.11.2013, 786 m (TURK 3812).

### 3.1.2. Hücre hatları

Hücre Kültürü Yapılışı:

Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde, steril ortamda gerçekleştirildi. Sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37°C sıcaklıktaki benmaride 1-2 dakika bekletildikten sonra %10 (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum), %2 (v/v), PenStrep (Penisilin-Streptomisin) ve %0,22 (wt/v) NaHCO<sub>3</sub> ilave edilen katkılı DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, High Glucose (4.5 g/L)) ya da RPMI1640 besi yeri içeren steril T75'lik hücre kültür flasklarında 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 3-4 gün inkübe edildi. Hücreler konfluent hale geldiğinde flasklardaki besi yeri döküldü ve hücreler 10 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra DPBS döküldü ve adheren hücreleri zeminden çözmek için flaske 5-6 mL %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi. Hiç beklenmeden flask el yardımıyla biraz çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı ve oluşan hücre süspansiyonu 50 mL'lik steril falkon tüplere aktarıldı. Bu falkon tüplere, tripsini nötralizeetmek için 10 mL katkılı taze besi yeri eklendi ve hücreler 1500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti üzerine 4 mL taze besiyeri eklenerek steril pastör pipetle hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon haline getirilen ilk kuşak



hücreleri eksponansiyel log fazına sokmak için üçer gün arayla 4 hücre ekimi daha yapıldı. Sonunda eksponansiyel log fazına sokulan hücreler çalışma için uygun hale getirildi. Hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre süspansiyonundan alınan 20 µL hücre ile 20 µL %0,4 (wt/vol) tripan mavisi solüsyonu karıştırılır, bu karışımın 20 µL'si Thoma lamına pipetlenerek mikroskop altında birinci sayım alanından 5 kare, ikinci sayım alanından 5 kare olmak üzere toplam 10 kare sayılır [1 mL hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı = 10 karede sayılan toplam hücre sayısı / 10 x 2 (Tripan mavisi seyreltme faktörü) x 16 (bir sayım alanındaki toplam kare sayısı) x 10 000 (katsayı)]. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 mL'lik falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu hazırlandı.

### 3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

#### Kullanılan cihazlar

Laminar Kabin .....	Esco Sınıf II Tip A2
Faz-kontrast Mikroskop.....	Leica DMIL
Işık Mikroskop .....	Olympus CX21
İnkübatör.....	Nuaire AutoFlow NU-4750
Karıştırıcı İnkübatör .....	Heidolph Unimax 1010
Hassas Terazi .....	Denver Instrument TB224A
Terazi.....	AccuLab VIC212
Vorteks Tüp Çalkalayıcı.....	IKA Genius 3
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı.....	IKA RH Basic 2
Santrifüj .....	Hettich Mikro200R
pH Metre.....	Hanna HI 2211
Thoma Lamı.....	Tiefe Depth
Vakum pompası .....	Divac 2.2L
Mikroplate Okuma .....	Raydo RT-2100
Elisa Plate Yıkama .....	Cenix Exaro
Otoklav .....	Hirayama HMC HV-110L
Derin Dondurucu (-80).....	New Brunswick Sientific U-410
Derin Dondurucu (-20).....	VESTEL GTP 455A
Soğutucu (+4).....	UĞUR USS 440 DKTL
Buz Makinesi .....	Scotsman AF 80
Sıvı Azot Tankı .....	Locator 4 Thermolyne Dewars
Saf Su.....	MES MP MiniPure
Saf Su.....	Lobconco WaterPro PS
Ultra Saf Su.....	Milipore Direct-Q 3 UV

## Kullanılan kimyasallar

TritonX-100 .....	Amresco
HCl .....	Carlo-Erba
NaHCO <sub>3</sub> .....	Merck
Tripan Blue .....	Fluka
Agaroz .....	Lonza
Sitrik Asit .....	Botafarma
Absolüt Alkol .....	Merck
Tris .....	Roche
Borik Asit .....	Sigma
EDTA .....	Amresco
Loading Dye .....	Fermantes
Etidyum Bromür .....	Sigma
DPBS .....	Sigma
5-Fluorourasil (5-FU) .....	Sigma
DMSO .....	Sigma
Steril DMSO .....	Sigma
Hücre Kültür Media (DMEM) .....	Sigma
Penicilin-Streptomycin .....	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS) .....	Sigma
Tripsin-EDTA .....	Sigma
Cytotoxicity Detection Kit (LDH) .....	Roche

## Kullanılan sarf malzemeleri

T150 Flask .....	Corning Costar
T75 Flask .....	Corning Costar
T25 Flask .....	Corning Costar
Vidalı Kapaklı Santrifüj Tüpü (15 mL) .....	Corning Costar
Vidalı Kapaklı Santrifüj Tüpü (50 mL) .....	Corning Costar
Hücre Kültür Plate (96, 24 ve 6 kuyulu) .....	Corning Costar
Parafilm .....	Pechiney
Plastik Pipet (10 mL) .....	Corning Costar
Plastik Pipet (25 mL) .....	Corning Costar
Pipet (2-10 µL) .....	Axygen
Pipet (1-200 µL) .....	Axygen
Pipet (100-1000 µL) .....	Axygen
Çok Kanallı Pipet (1-200 µL) .....	Brand, Eppendof
Otomatik Pipet (100-1000 µL) .....	Brand, Eppendof
Pipet Tabancası .....	Brand, Eppendof
Pipet Ucu (1-200 µL) .....	Corning Costar
Pipet Ucu (100-1000 µL) .....	Corning Costar
Pipet Ucu (2-10 µL) .....	Corning Costar

Dispensır .....	Eppendorf
Filtre (0,22 mikron) .....	Stericup
Şırınga Filtre .....	Sartorius Stedim
Pastör Pipet .....	LP Italiana
Eppendorf Tüpü (2 mL).....	Isolab
Cam Şişe (250 mL, 500 mL, 1 L) .....	Isolab

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Mantar ekstralarının hazırlanması

Kurutulmuş mantar örneği öğütüldü, toz halindeki numuneden 2 g alınarak üzerine 3:1 metanol-diklorometan karışımı eklendi. Sonra ultrasonik banyoda yarım saat bekletildi. Daha sonra 24 saat buzdolabında (+4) bekletildi. Darası alınmış olan bir deney tüpüne ekstraksiyonu yapılan mantar örneğinin çözelti kısmından bir miktar alınarak çözücüsü uzaklaştırıldı ve tekrar tartıldı. Böylece mantar ekstraktının miktarı belirlenmiş oldu. Miktarı belirlenen örnek için (mg/mL) stok çözelti hazırlandı. Bu aşamalardan sonra aktivite testleri yapıldı.

### 3.2.2. Hücre proliferasyon ölçümü

Bu projede makromantar ekstralarının hücre proliferasyonuna olan etkileri ölçmek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi kullanıldı.(Mossmann, 1983 ). Makromantar ekstraları ile kanser hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra bu test protokolü uygulanmıştır. Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edilerek, çözücü (DMSO) ile muamele edilmiş hücrelerin optik dansitesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Buna göre % inhibisyon  $[1-(A \text{ test maddesi} / A \text{ çözücü kontrol}) \times 100]$  formülüne göre hesaplandı. Makromantar ekstralarının IC50 konsantrasyonlarını belirlemek için(ortamdaki hücrelerin %50'sinin proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyon) belirlemek için çalışılan numunelerin 15, 30, 60, 90, 120, 150, 225 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında hücreler kullanıldı. MTT yöntemiyle test edildikten sonra elde edilen absorbans logaritmik eğrisi bulundu. Bu eğri Excel® programı yardımıyla logaritmik fonksiyon kullanılarak analiz edildi (Avrameas, 1985).

### 3.2.3. Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi

Test edilecek makromantarekstrelere hücre sitotoksik aktiviteleri LDH yöntemi ile belirlendi (Decker ve ark; Lohmann-Matthes, 1988). Test edilen makromantarekstrelerebağlı olarak inkübasyon süresinde ölen hücre miktarındaki artış, kültür süpernatantında LDH artışıyla sonuçlandı. Hücre hasarı sonucu ortama salınan sitoplazmik enzimlerin ölçümü bu deneylerin temelini oluşturur. LDH sitoplazmik bir enzim olup, çoğu hücrede bulunur ve stabildir. Bu amaçla LDH hücre sitotoksisite kiti üreticinin solüsyonları ve prosedürüne göre kullanıldı.

1. Kültürü yapılan hücreler her bir kuyucuğa 5000 hücre olacak şekilde pipetlendi.
2. Plate yüklenen hücrelerin üzerine DMSO ile çözüldürülmüş IC<sub>50</sub> dozunda makromantar ekstreleri, yüksek kontrol için %2 Triton X-100 (LDH salımına etkisi %100 kabul edilecek) ilave edildi.
3. Düşük kontrol için makromantar ekstreleri içermeyen hücre hattı, besi yeri kontrol için sadece besiyeri içeren kuyu ve pozitif kontrol olarak IC<sub>50</sub> dozunda 5-FU ve sisplatin eklenerek kuyuların son hacmi besi yeri ile 200 µL'ye tamamlandı ve 24 saat inkübe edildi.
4. Her bir kuyudan hücre içermeyen 100 µL kültür süpernatantı alınarak başka bir mikropate transfer edildi. Üzerine kit içinde bulunan taze hazırlanmış reaksiyon karışımından 100 µL/kuyu olacak şekilde eklendi ve yarım saat karanlıkta inkübe edildi.
5. Stop solüsyonu olarak 50 µL/kuyu olacak şekilde 1 N HCl eklenildi. Bu işlem sonunda 492-630 nm'de okuma yapıldı ve bulunan absorban değerlerinden % sitotoksisite hesaplandı.

### 3.2.4. Apoptotik potansiyel ölçümü

Makromantar ekstrelerinin antikanser etki mekanizmasının apoptoz aracılığıyla olup olmadığını test etmek amacıyla, ekstreile muamele edilen hücrelerdeki DNA degradasyonu belirlendi. Bilindiği gibi apoptozun en önemli özelliklerinden biri de DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Aslında DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleaz olup apoptoz sürecinin sonlarına doğru çeşitli ölüm uyaranları nedeniyle aktifleşir. Makromantar ekstrelerinin antikanser

etki mekanizmasının apoptoz aracılığıyla olup olmadığını test etmek amacıyla test maddelerinin IC50 konsantrasyonları ile muamele edilen kanser hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra flask yüzeyinden kazınarak %70'lik alkol içinde 24 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda alkol uzaklaştırılarak örneklerin üzerine fosfat-sitrat tamponu eklendi ve 30 dakika inkübe edilir. Bu işlemi takiben Tween20, RNaz ve en son proteinaz K ile muamele edilen örnekler jelde yürütüldü ve DNA degradasyonu/bantlaşma bir jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi (Gong ve ark., 1994).

### **3.2.5. Migrasyon testi**

Hücrelerin, makromantar ekstraktları içeren ortamda, proliferasyon yeteneklerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu test için arasında 500 µm aralık bulunan iki bölmeli silikon kuyu (µ-Dish) kullanıldı. İki bölmeli silikon kuyunun her bir bölmesine 35.000 hücre / 70µL olacak şekilde hücreler yüklendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından silikon kuyu forseps yardımıyla köşesinden tutularak kaldırıldı ve eski besiyeri atıldı. Sonra yaklaşık 2 mL taze besiyeri eklendi ve DMSO içinde çözülen test makromantar ekstraktları IC<sub>50</sub> dozunda koyuldu. Bu andan itibaren örnekler fotoğraflanmaya başlanır. Kontrol olarak kullanılan µ-Dish'deki 500 µm olan aralık dolana kadar 12 saatte bir test maddeleri koyulan µ-Dish'lerde fotoğraf çekimi yapılır (Mosmann, 1983).

#### 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında *Lactarius zonarius*, *Polyporus squamosus*, *Laetiporus sulphureus*, *Ramaria flava* ve *Pholiota adiposa* makromantar türlerinin Etilasetat, Metanol ve Hekzan ekstratlarında MTT testi kullanarak antikanser aktivite tayinleri yapılmıştır. Buna göre PAE ve PAH ekstreleri A549 hücre hattında ( 85.4 ve 67.0 µg/mL), LSH, PAE ve PAH ekstreleri HeLa hücre hattında ( 99.0, 63.7 ve 97.5 µg/mL), PAE ve PAH ekstreleri Hep3B hücre hattında ( 98.4 ve 94.5 µg/mL), PAE ve PAH ekstreleri HT29 hücre hattında ( 90.6 ve 99.6 µg/mL), LSH, PAE, PAH ve PSH ekstreleri MCF7 hücre hattında ( 86.3, 87.5, 97.7 ve 99.3 µg/mL) yüksek seviyede antiproliferatif özellik göstermiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4,6).

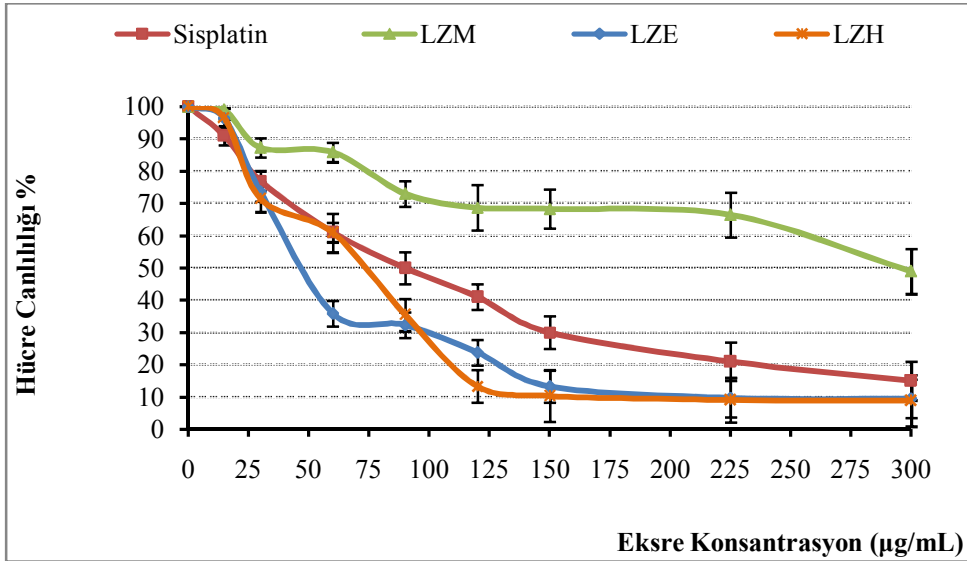
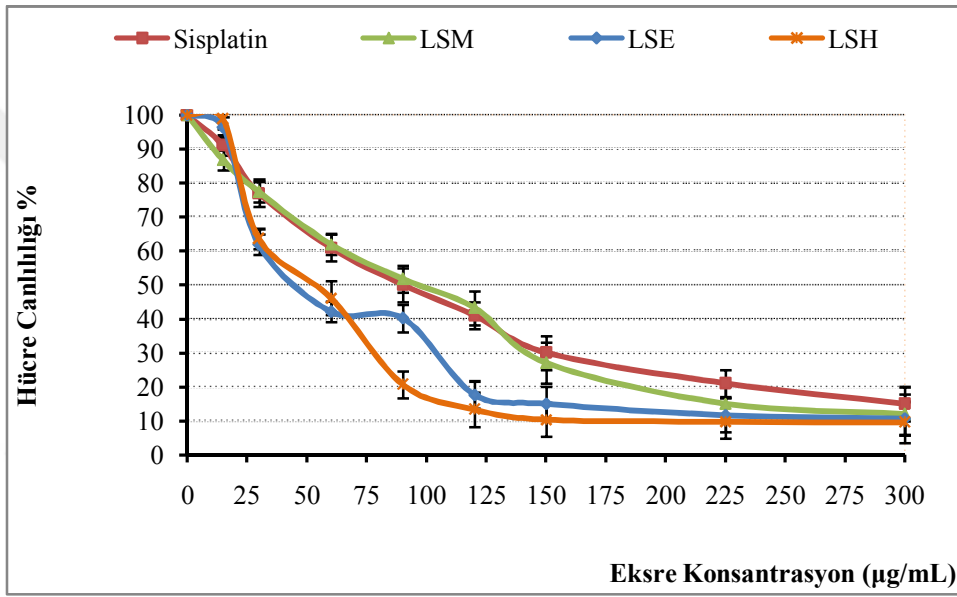
Özellikle *Pholiota adiposa*'nın Etilasetat ve Metanol ekstreleri bütün hücre hatlarında antikanser aktivite yönüyle etkili bulunmuştur. Makromantar ekstrelerinin hiçbiri pozitif kontrol olan sisplatin kadar antikanser aktivite gösterememesine rağmen sergiledikleri biyolojik aktivite daha sonra çalışmalar için kullanılabilir.

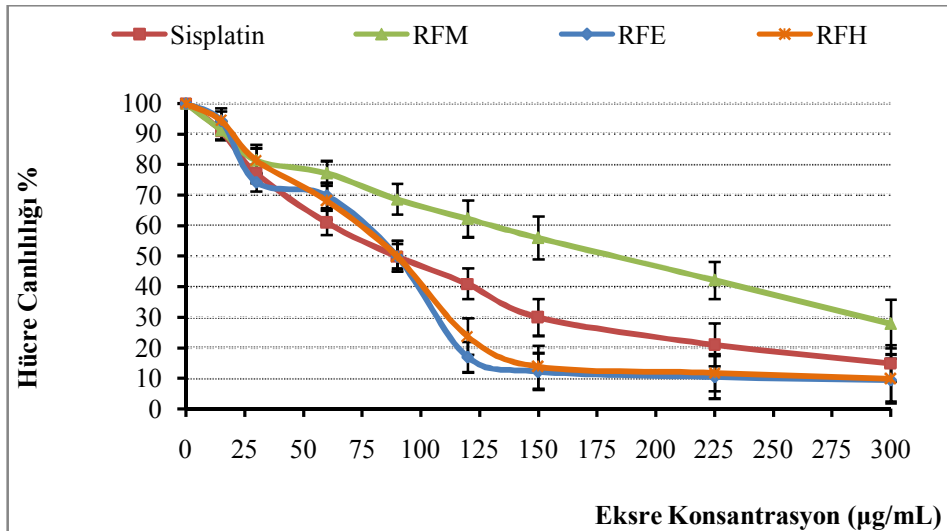
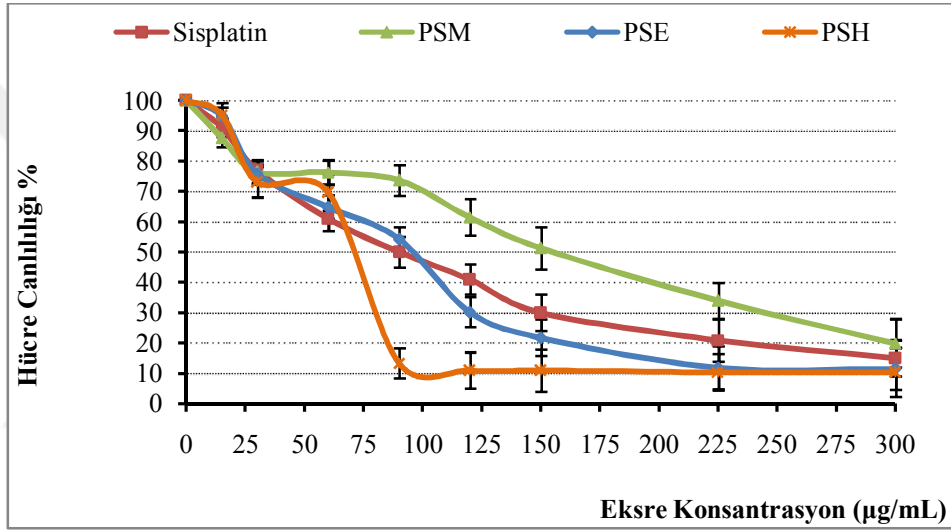
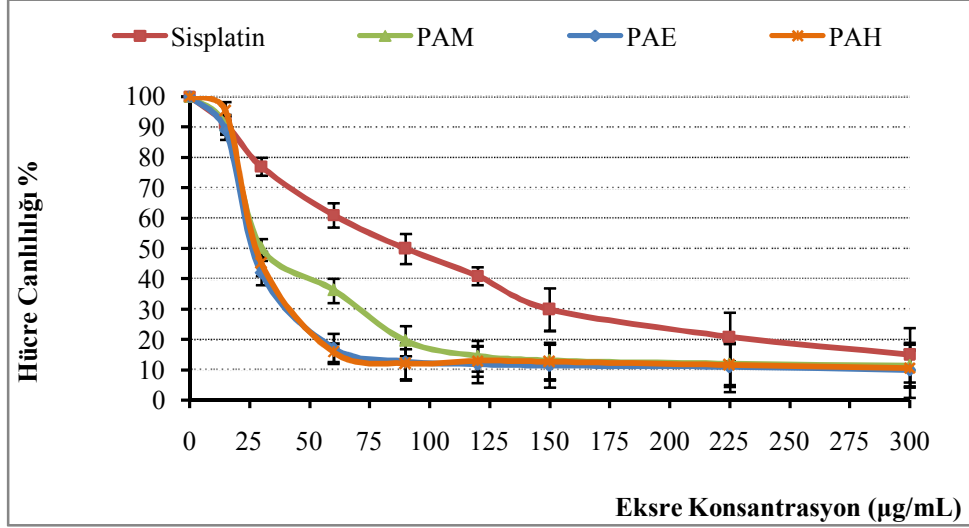
*Polyporus squamosus*'un Etilasetat ekstrelerinin MCF7 hücre hattı üzerine olan antikanser aktivitesinin sisplatin kadar olmasada sergiledikleri biyolojik aktivitesi ileri çalışmalara için kullanılabilir. *Laetiporus sulphureus* ve *Polyporus squamosus*'un Hekzan ekstrelerinin her ikisinin de MCF7 hücre hatlarına olan antikanser aktivitesi diğer mantar türlerinden daha iyi sonuç vermiştir.

*Laetiporus sulphureus* makromantar türünün Metanol ve Etilasetatekstrelerinin çalışılan tüm hücre hatlarında sisplatinin antikanser değerlerinden çok uzak değerlere sahip olması ileri çalışmalar için ümit vermemektedir. Çalışmada elde edilen bulgular neticesinde *Lactarius zonarius* Metanol ekstrelerinin tüm hücre hatlarında IC50 değerlerinin çok yüksek olması antikanser aktivitesinin düşük olduğunu göstermektedir *Ramaria flava* Etilasetat ekstrelerinin normal FL hücre hattına olan antikanser aktivitesinin düşük olması çalışmamız için olumlu bir sonuç olmuştur.

#### 4.1. Makromantar Ekstrelerinin Normal FL Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin normal hücre olan FL üzerinde sergiledikleri düşük antiproliferatif özellik (45.0-186,9  $\mu\text{g/mL}$ ) kontrol ilaç sisplatinle karşılaştırıldığında (50.7  $\mu\text{g/mL}$ ) iyi bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Makromantar ekstrelerinden PAE ve PAH, FL hücre hattı üzerinede sırasıyla (45,0-51,5  $\mu\text{g/mL}$ ) düşük antiproliferatif etki göstermiştir ( Şekil 4.1). LZM, RFM makromantar ekstreleri ise sırasıyla (285.2-186.9  $\mu\text{g/MI}$ ) sisplatininden yüksek antiproliferatif özellik göstermiştir (Şekil 4.1).





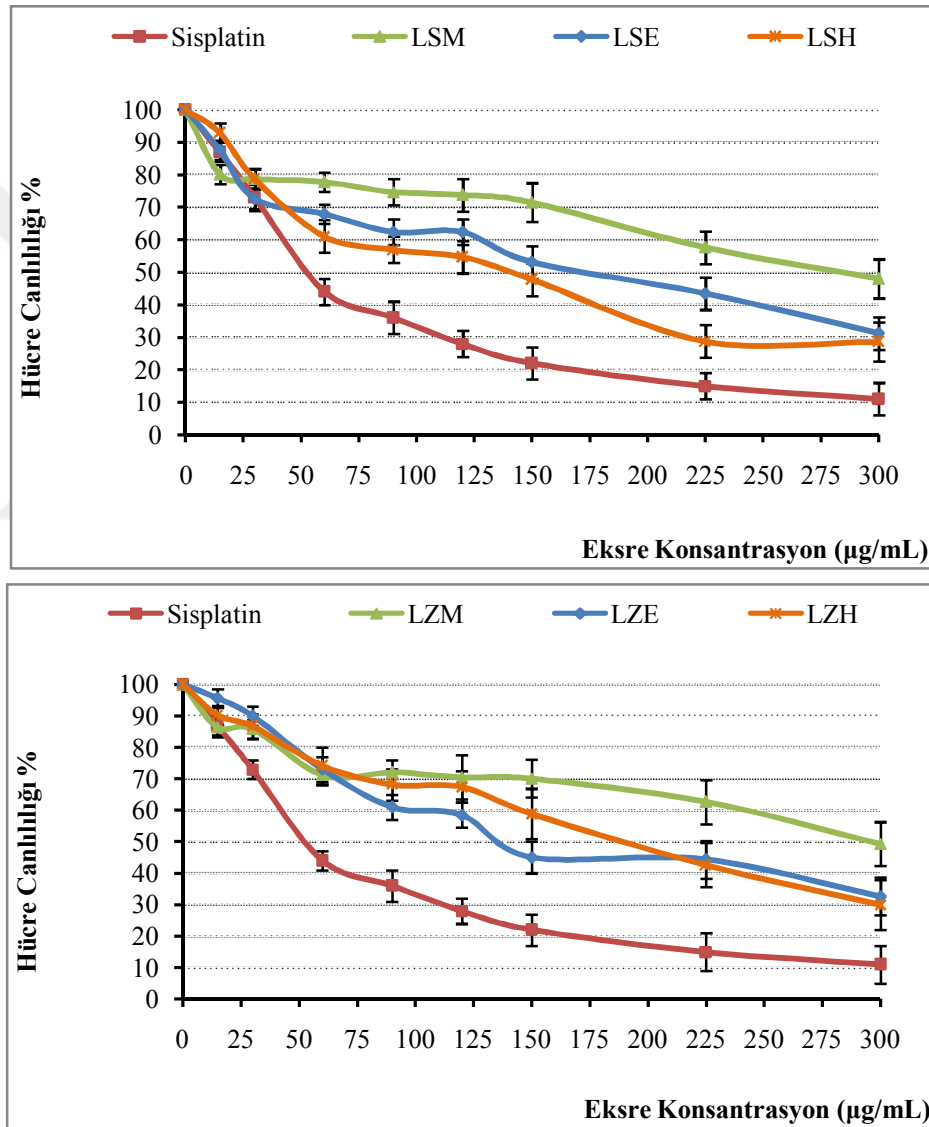
Şekil 4.1. FL hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

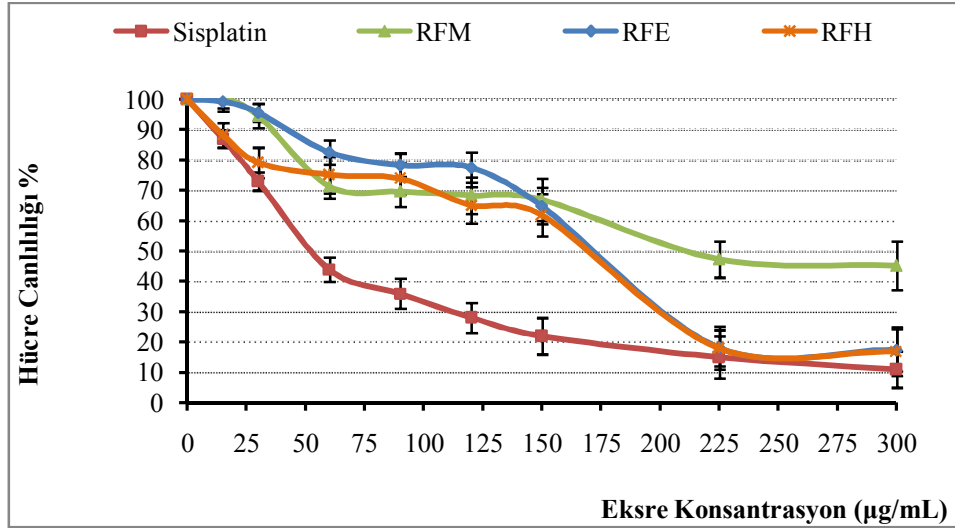
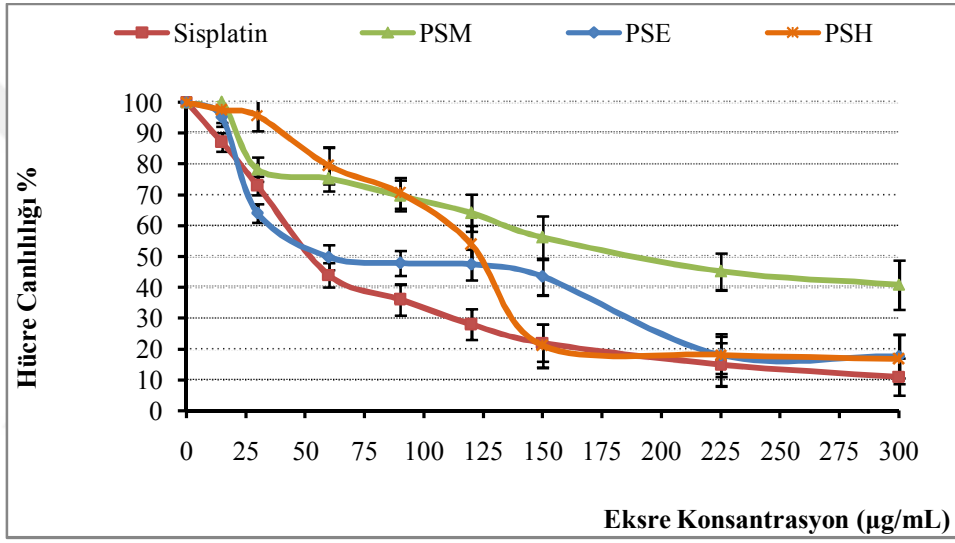
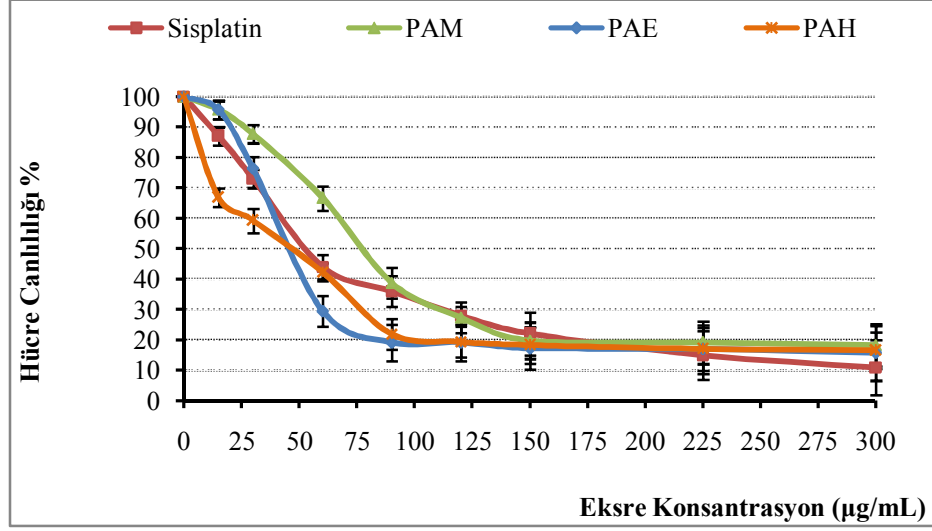
\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak belirtilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.



#### 4.2. Makromantar Ekstrelerinin A549 Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin A549 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri sispilatine karşılaştırıldığında (58.7  $\mu\text{g/mL}$ ) sispilatine en yakın sonuçlar sırasıyla (67.0 -85.4  $\mu\text{g/mL}$ ) ile PAH. PAE ekstreleri ile ulaşılmıştır (Şekil 4.2). LSM ve RFM ekstreler ise sırasıyla (285.3- 233.5  $\mu\text{g/mL}$ ) antiproliferatif etkileri sispilatinden oldukça yüksek çıkmıştır. A549 hücre hattında antikanser aktivite gösteren ekstrelerimiz PAH ve PAE dir.



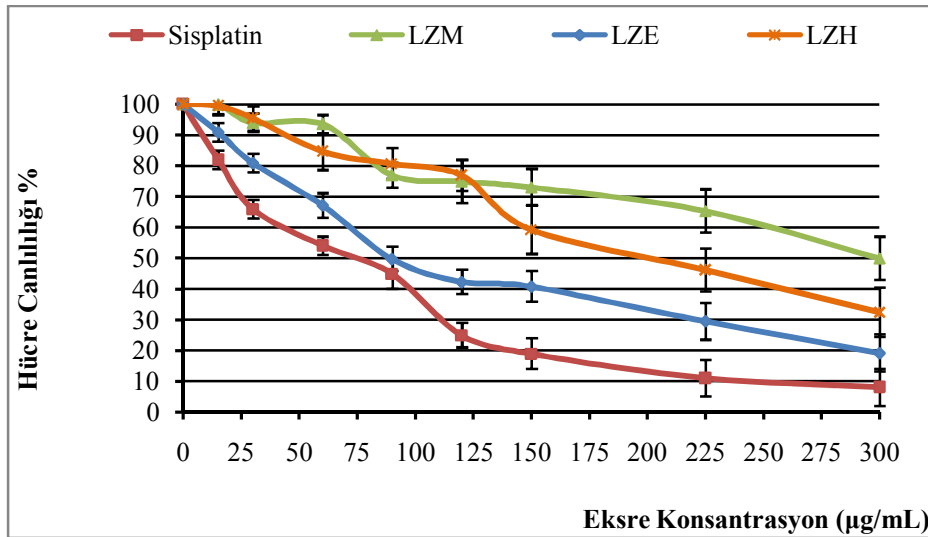
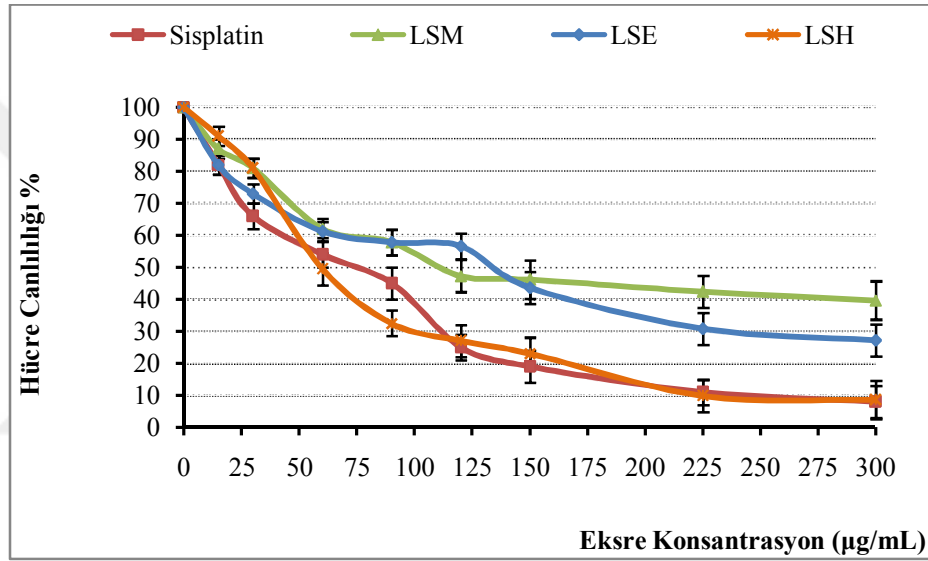


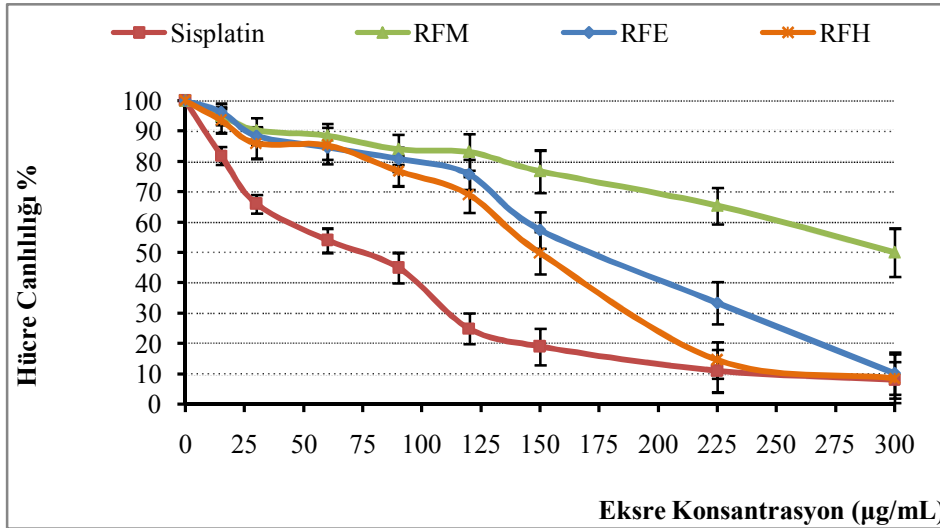
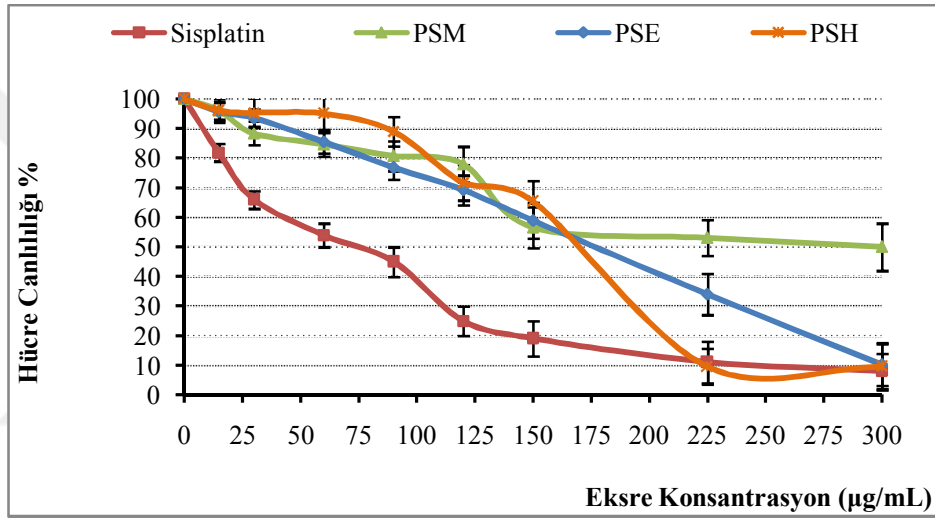
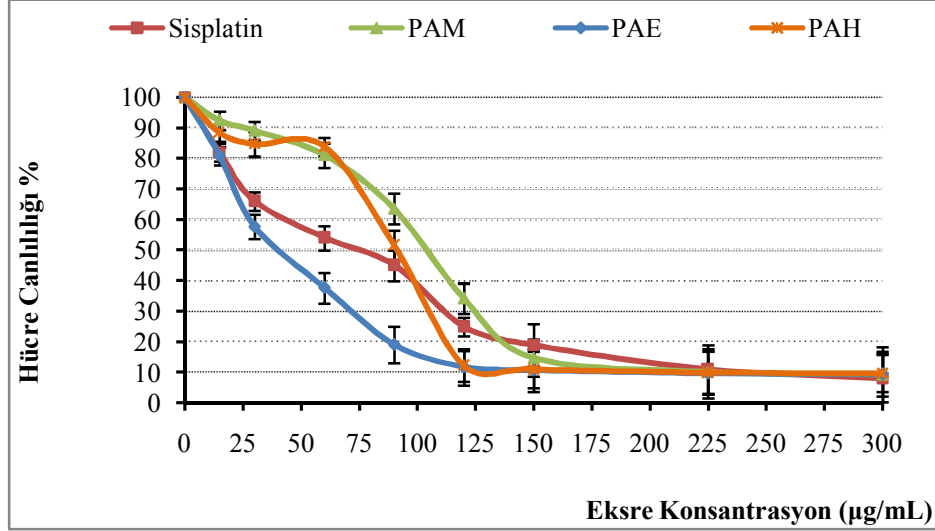
Şekil 4.2. A549 hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak ifade edilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.

### 4.3. Makromantar Ekstrelerinin HeLa Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin HeLa hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri sispaltinle karşılaştırıldığında (47.3 µg/mL) PAH ve PAE ekstreleri sırasıyla (97.5 -63.7 µg/mL) sispaltine en yakın sonuçlara elde edilmiştir (Şekil 4.3) .LSM ve RFM ekstreleri sırasıyla (177.0- 316.5 µg/mL) antiproliferatif etkileri sispaltinden yüksek çıkmıştır.IC50 değerleri artıka antiproliferatif etki artmakta antikanser özelliği azalmaktadır. Sitotoksik etki ise artmaktadır. RFM, LSM ekstresinin sitotoksik etkilerinin yüksek olduğunu (Çizelge 4.2).görmekteyiz. HeLa hücre hattında antikanser aktivite PAH ve PAE ekstreleri göstermektedir.



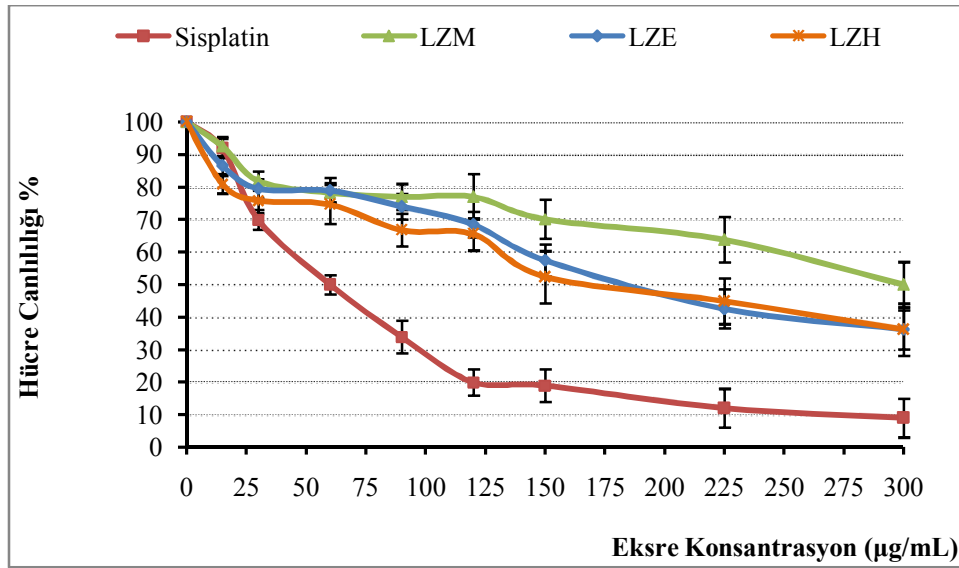
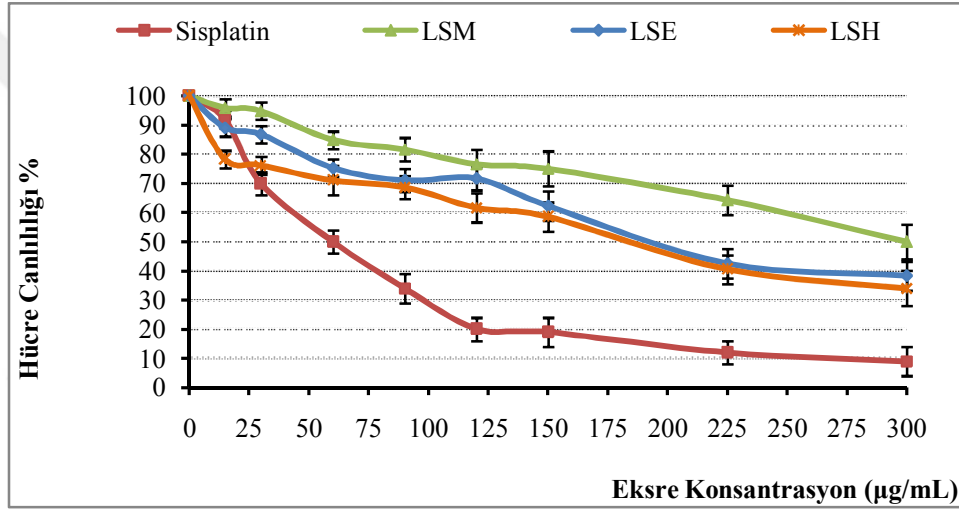


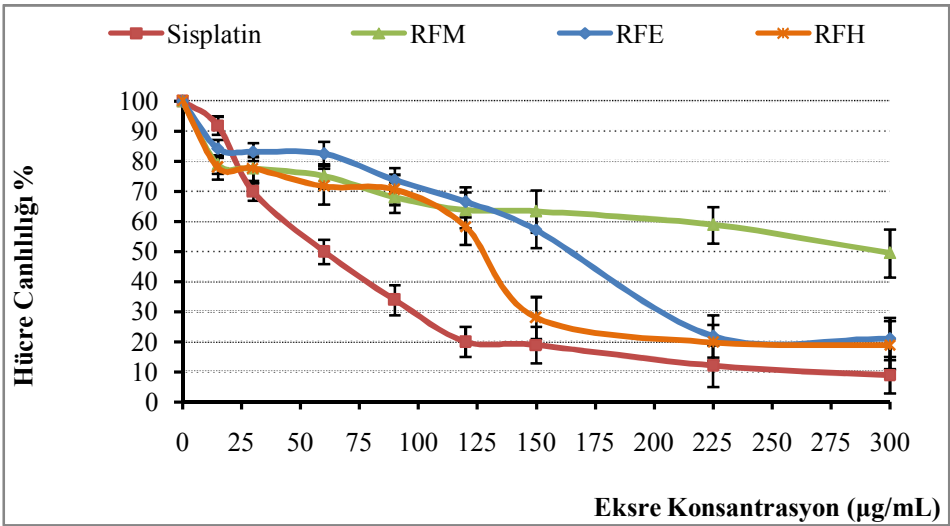
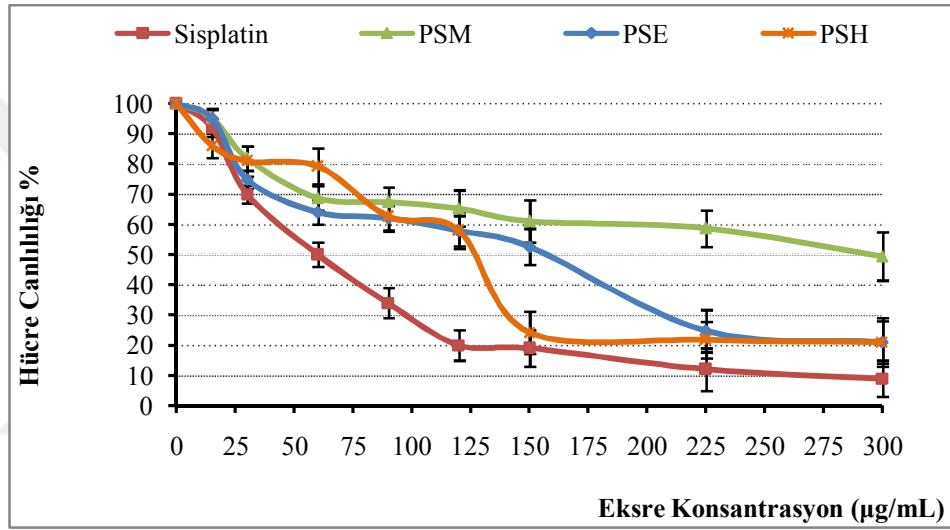
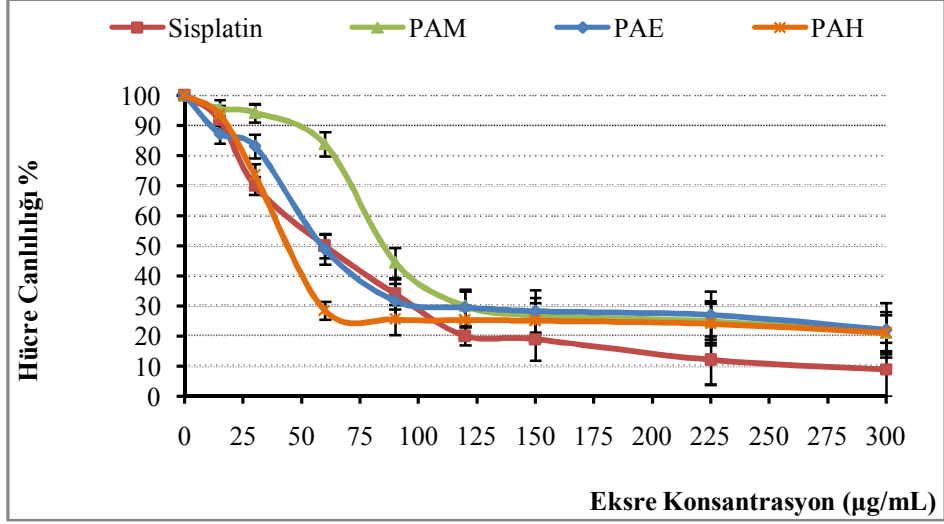
Şekil 4.3. HeLa hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak belirtilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.

#### 4.4. Makromantar Ekstrelerinin Hep3B Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin Hep3B hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri sisplatinle karşılaştırıldığında (41.9 µg/mL) PAH ve PAE ekstreleri sırasıyla (94.5 -98.4 µg/mL) sisplatine en yakın değerlere ulaşılmıştır (Şekil 4.4). RFM ve LSM ekstreleri sırasıyla (269.8 -301.4 µg/mL) antiproliferatif etkileri sisplatinden yüksek çıkmıştır. LSM ekstresinin IC50 değerinin çok yüksek olması antiproiferatif etkinin yüksek antikanser aktivitesinin düşük olduğunu, sitotoksik etkisinde yüksek olduğunu göstermektedir(Çizelge4.3). Hep3B hücre hattında PAH ve PAE ekstreleri antikanser aktivite göstermiştir(Şekil 4.4).



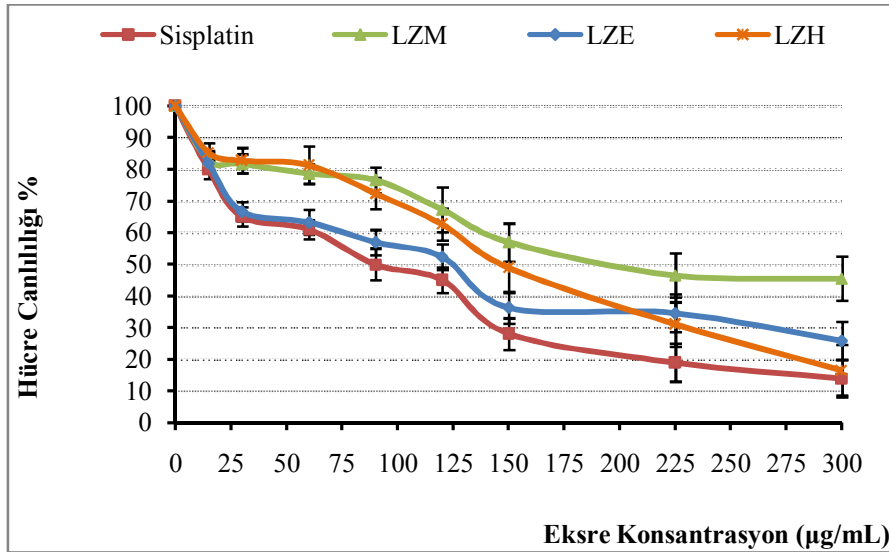
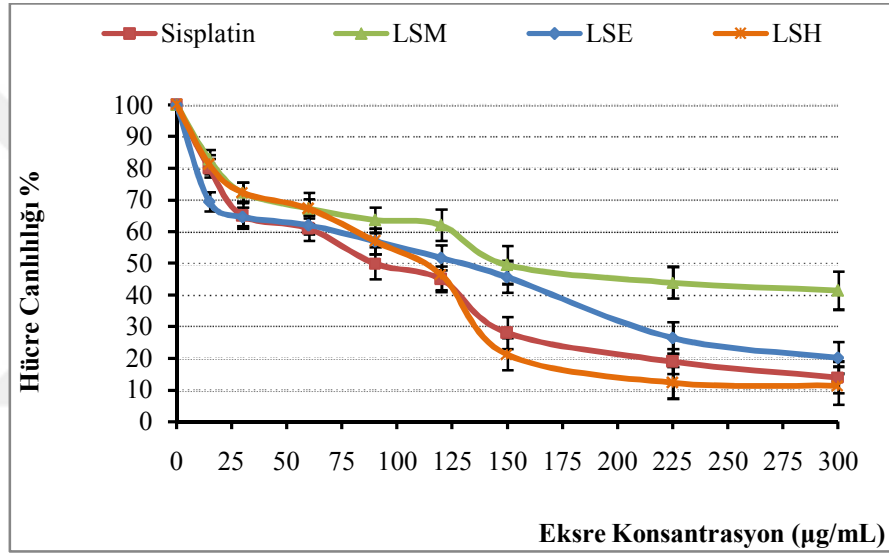


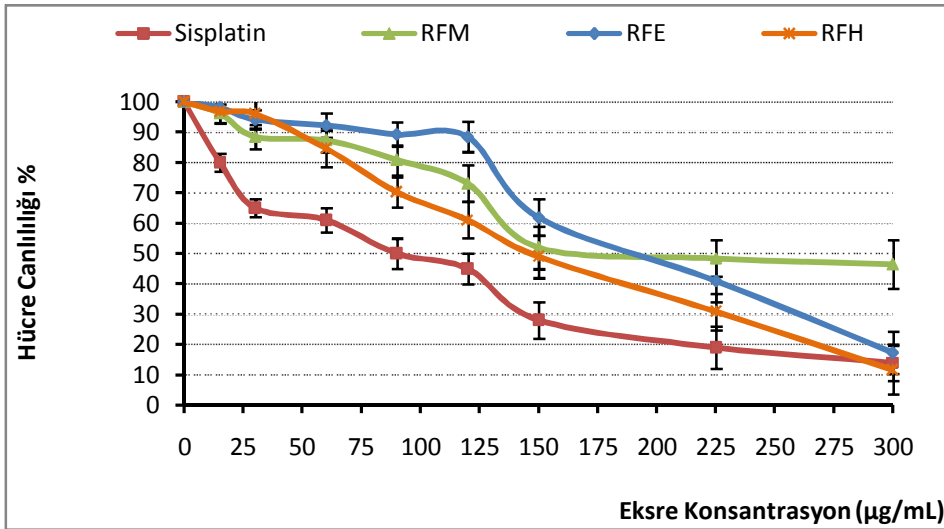
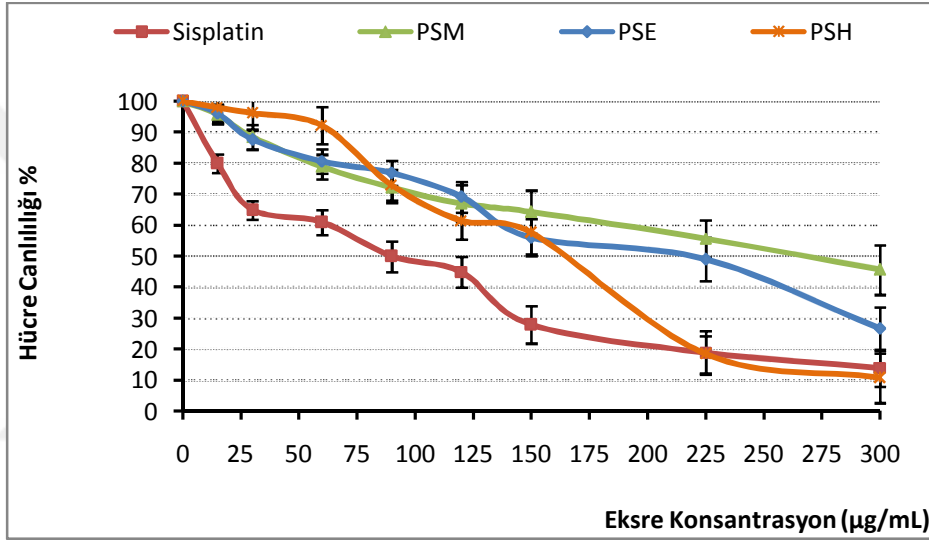
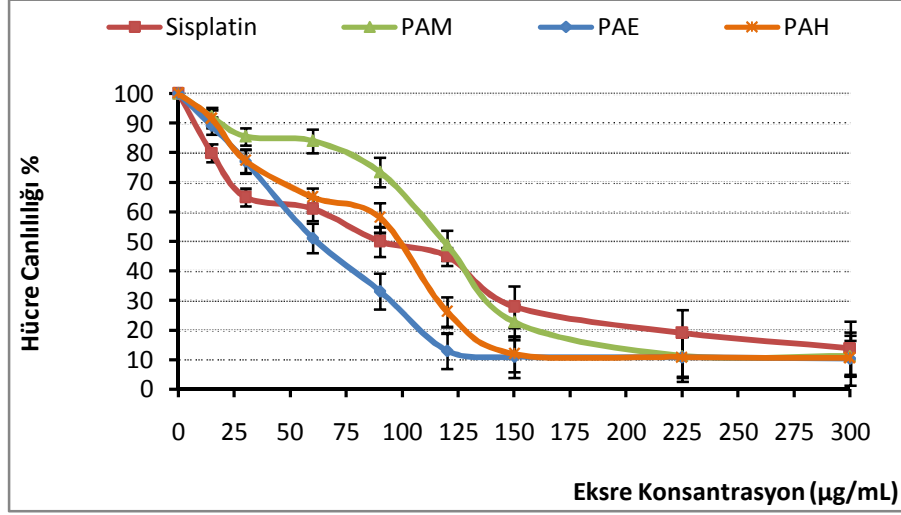
Şekil 4.4. Hep3B hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak belirtilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.

#### 4.5.Makromantar Ekstrelerinin HT29 Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin HT29 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri sispaltinle karşılaştırıldığında (44.6 µg/mL) PAH ve PAE sırasıyla (99.6 -90.6 µg/mL) ekstreleri ile sispaltine en yakın değerlere ulaşılmıştır (Şekil 4.5). PSM ,RFM ve LZM ekstreleri sırasıyla(248.9,; 236.0 ve 230.8 (µg/mL) antiproliferatif etkileri sispaltinden yüksek çıkmıştır. IC50 değerleri arttıkça antiproliferatif etkilerin artması sitotoksik etkiyi artırmaktadır. PSM, RFM ve LZM ekstrelerin sitotoksik etkilerinde yüksek olduğunu (Çizelge 4,3).görmekteyiz HT29 hücre hattında PAH ve PAE ekstreleri antikanser aktivite göstermektedir.





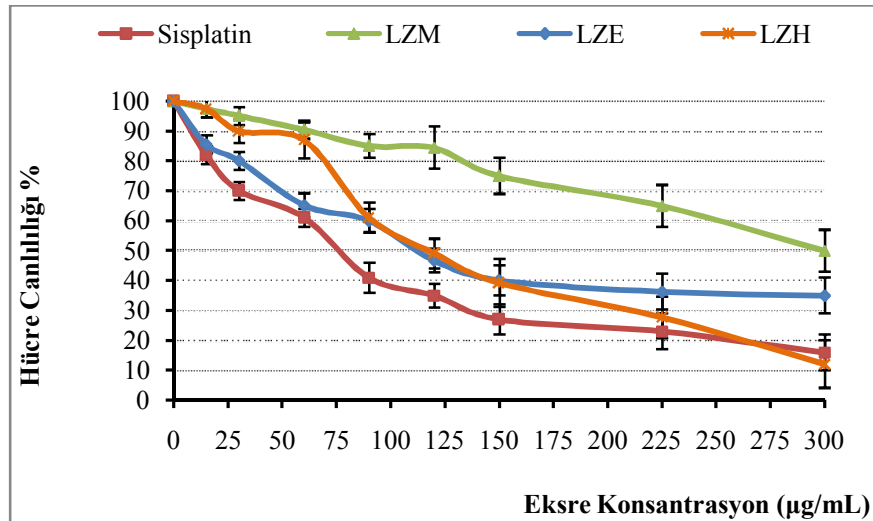
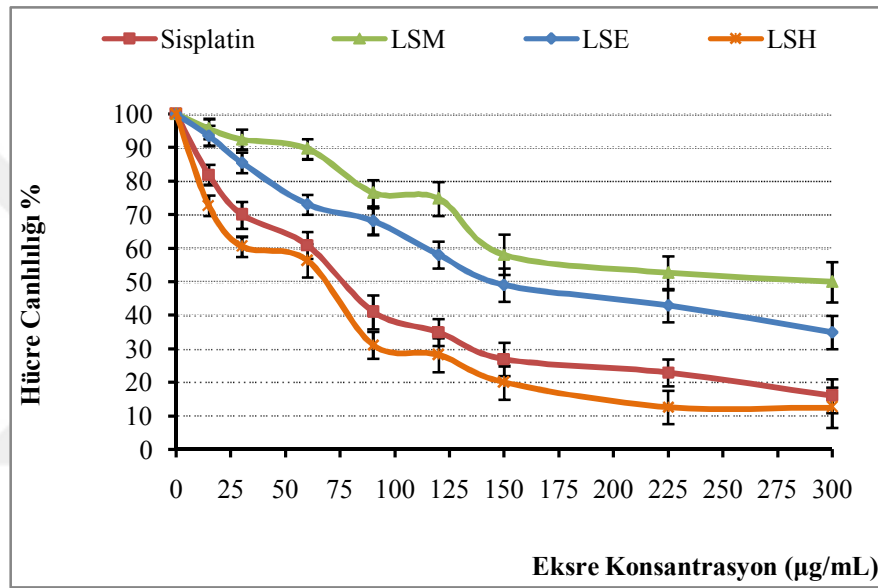
Şekil 4.5. HT29 hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

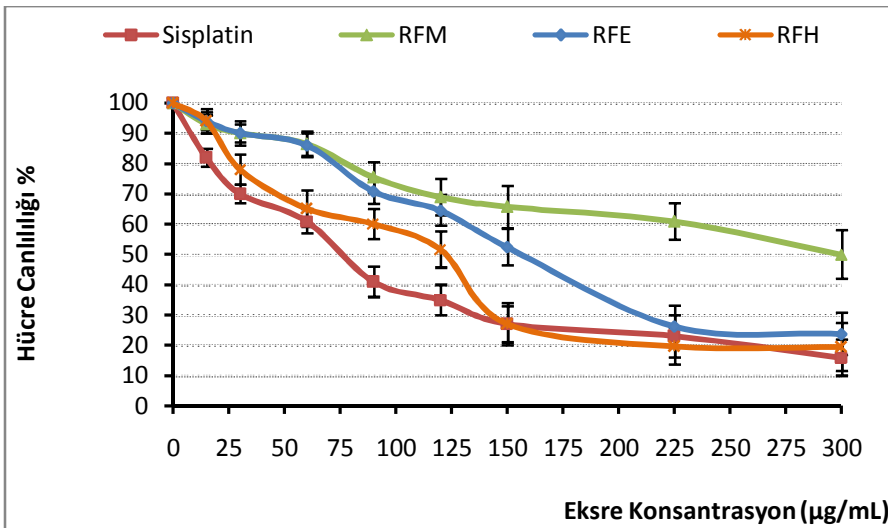
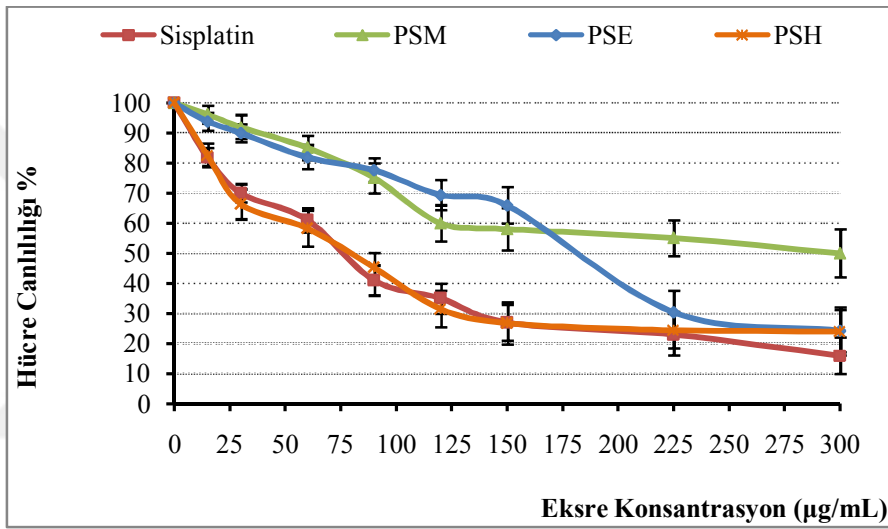
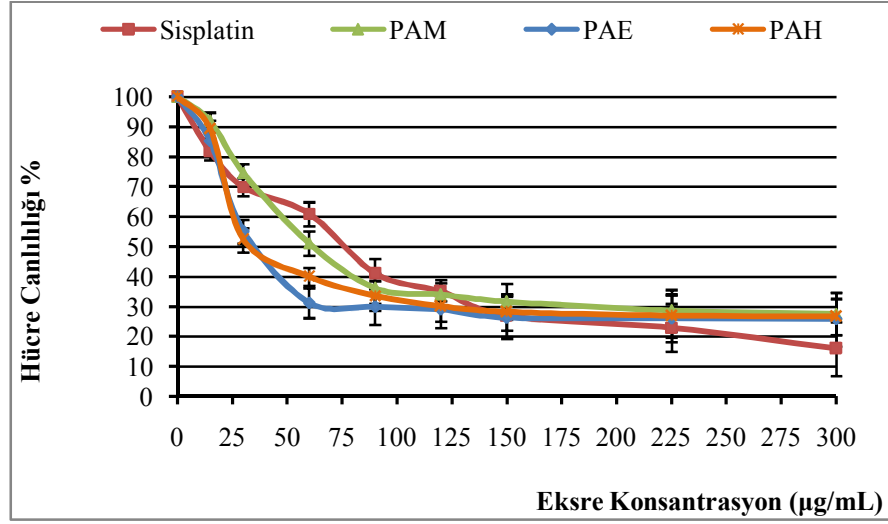
\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak ifade edilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.



#### 4.6. Makromantar Ekstrelerinin MCF7 Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Makromantar ekstrelerinin MCF7 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri sispaltinle karşılaştırıldığında (58,1 µg/mL) sispaltine en yakın sonuçları sırasıyla LSH ve PAE (86,3 - 87,5 µg/mL) ekstreleri ile ulaşılmıştır (Şekil 4.6). LSM, RFM ve LZM ekstreler sırasıyla (256,1 -276,7 ve 309.5 µg/mL) ise antiproliferatif etkileri sispaltinden yüksek çıkmıştır. LSM, RFM ve LZM ekstrelerinin sitotoksik özellikleride yüksektir. LSH ve PAE ekstrelerinin sitotoksik özellikleride düşük (Çizelge 4.2). Antikanser aktivitesi yüksektir.





Şekil 4.6. MCF7 hücre hatları üzerinde makromantar ekstralarının ve pozitif kontrol sisplatinin antiproliferatif etkileri.

\*Yüzde inhibisyon üç bağımsız ölçümün  $\pm$  SEM değeri olarak belirtilmiştir. Her bir deney, her hücre hattı için en az üç kez tekrarlanmıştır.

Makromantar ekstralarının normal hücre olan FL üzerinde sergiledikleri nisbeten düşük antiproliferatif özellik (45.0 - 186,9 µg/mL) kontrol ilaç sisplatinle karşılaştırıldığında (50.7 µg/mL) iyi bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Çizelge 4.1). Hazırlanacak bir yol haritası ile bu makromantar ekstre türlerinden elde edilecek büyük ihtimalle normal hücreler üzerinde çok toksik olmayan ve seçici bir şekilde kanser hücrelerini hedefleyebilen biyolojik aktiviteden sorumlu potent saf moleküller elde edilebilir. Kanser ülkemizde en yaygın ikinci ölüm nedenidir ama kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ithal olduğundan çok pahalıdır. Bu nedenle kanserle mücadelede ARGE yatırımlarıyla beraber milli ilaç dönemi başlamış ve ülkemizde sağlık politikaları bu perspektif üzerine oturtulmaya çalışılmaktadır. Bu kapsamda ekstralarını elde ettiğimiz antikanser özelliği tespit edilen makromantarlar ileriye dönük çalışmalar için etken maddelerinin tespiti ile manantar ekstralarının antikanser aktiviteleri *in vitro* olarak çalışılmış olmanın dışında bu ekstraların eczacılık ve tıpta tedavi amaçlıyla kullanılma potansiyellerinin ortaya çıkarılması için *in vivo* çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

**Çizelge 4.1.** Makromantar ekstralarının hücre hatlarındaki IC50 değerleri

IC50(µg/mL)	A549	FL	HeLa	Hep3B	HT29	MCF7
LSM	285.3±7.8	119.4±6.5	177.0±7.1	301.4±8.6	197.1±7.2	256.1±6.1
LSE	183.4±5.1	89.4±4.7	151.5±5.6	214.5±8.3	133.9±3.5	190.0±5.6
LSH	157.2±5.9	81.5±3.9	99.0±4.2	191.7±7.1	117.2±3.6	86.3±4.6
LZM	289.7±6.3	285.2±9.2	295.8±9.3	301.5±8.4	230.8±4.9	309.5±9.4
LZE	183.7±5.7	89.7±3.7	140.0±5.4	206.7±7.5	145.0±4.2	162.4±4.7
LZH	194.9±6.0	94.8±3.1	215.6±7.7	198.6±7.6	164.0±4.3	150.4±4.4
PAM	118.7±5.1	67.2±2.8	124.2±5.1	136.2±3.9	136.3±4.0	122.5±5.1
PAE	85.4±4.8	45.0±2.1	63.7±3.8	98.4±3.4	90.6±3.7	87.5±3.8
PAH	67.0±4.8	51.5±2.0	97.5±3.5	94.5±3.5	99.6±3.7	97.7±3.6
PSM	211.0±6.7	168.0±4.7	259.4±8.3	257.3±8.6	248.9±7.5	248.0±8.5
PSE	124.4±4.5	97.4±4.3	174.3±5.4	154.2±5.7	201.4±7.7	187.9±6.4
PSH	144.9±4.8	90.5±4.0	168.8±6.5	143.3±5.1	163.0±6.1	99.3±4.3
RFM	233.5±6.7	186.9±4.4	316.1±6.7	269.8±7.4	236.0±7.0	276.7±7.8
RFE	176.4±5.8	95.8±4.1	176.1±5.0	168.4±6.3	202.1±6.8	173.4±5.1
RFH	161.6±5.2	98.0±3.7	155.5±4.2	140.0±5.5	163.9±5.3	135.6±4.3
Sisplatin	58.7±4.1	50.7±2.6	47.3±3.8	41.9±2.9	44.6±3.1	58.1±2.4

#### 4.7. Makromantar Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivitesi

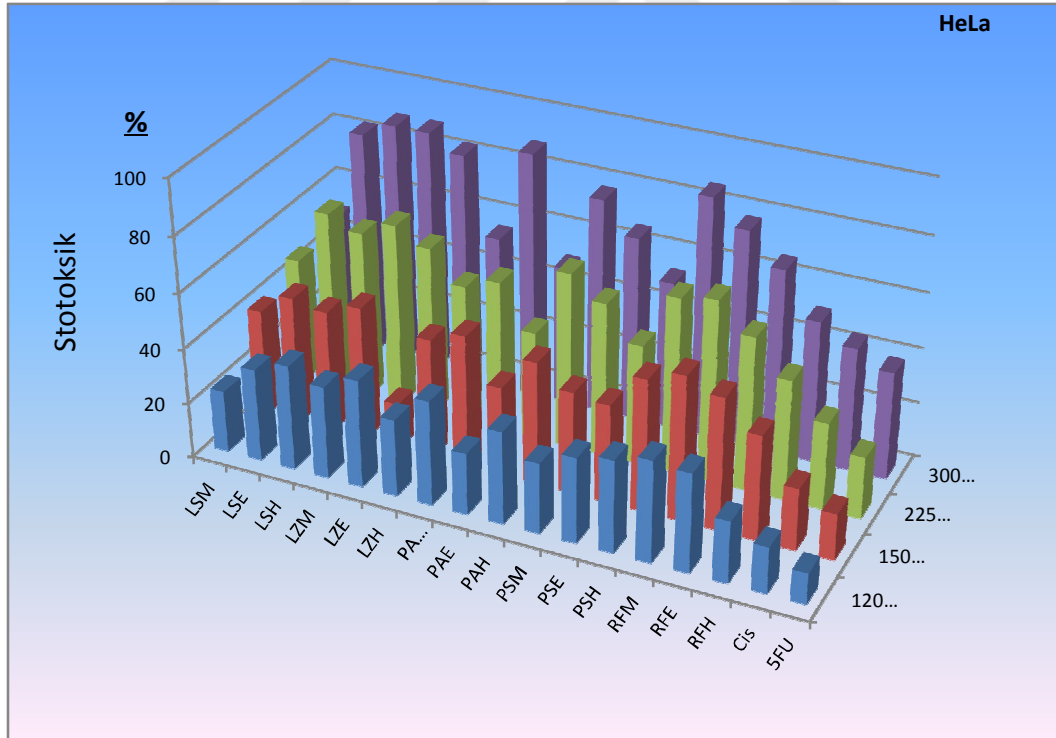
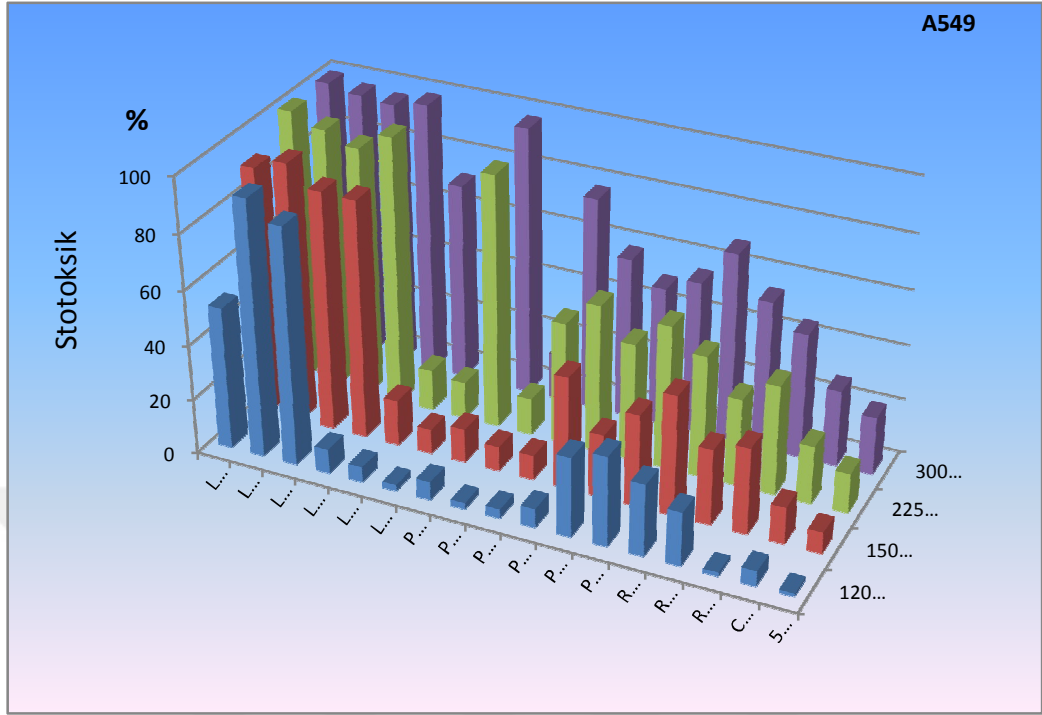
Makromantar ekstrelerinin çeşitli konsantrasyonlarının (120, 150, 225 ve 300 µg/mL) A549, HeLa, Hep3B, HT29, MCF7 ve FL hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri LDH sitotoksikite kiti kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen bulgular beklenildiği gibi konsantrasyon bağımlı bir hücre membranı yıkımı olduğunu göstermektedir. Sitotoksikite bulguları farklı hücre hatlarında oldukça yüksek değişkenlik gösteren ve 150 µg/mL'den sonra hem konsantrasyon hem ekstre bağımlı olarak hücrelerin membran bütünlüğünün önemli derecede etkilendiği ve aynı etkinin daha düşük konsantrasyonlarda görülmediği bizce anlaşılmaktadır (Çizelge 4.2; Şekil 4.7).

**Çizelge 4.2.** Ekstrelerin A549 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi %

µg/mL	A549				HeLa			
	120	150	225	300	120	150	225	300
LSM	51.8	90.3	99.9	99.9	22.2	38.9	45.6	50.0
LSE	93.3	94.4	95.6	97.8	33.3	46.7	65.6	83.3
LSH	86.3	87.1	91.4	96.7	37.8	44.4	61.1	88.9
LZM	8.9	86.7	97.8	98.9	33.3	48.9	66.7	88.9
LZE	5.6	16.7	14.9	72.1	18.9	26.7	61.1	83.3
LZH	2.2	8.9	13.3	16.7	27.8	43.3	50.0	55.6
PAM	6.7	12.2	92.2	97.8	37.8	47.8	54.4	88.9
PAE	2.2	8.9	13.3	16.7	22.2	32.2	38.9	50.0
PAH	3.3	8.9	44.4	77.8	33.3	44.4	63.3	77.8
PSM	6.9	40.9	53.9	58.6	25.4	36.8	55.6	66.7
PSE	29.0	23.0	42.8	50.6	30.8	35.4	43.3	53.3
PSH	32.7	33.6	52.3	55.6	33.3	47.8	63.3	86.7
RFM	26.1	43.7	44.4	68.9	36.7	52.2	65.6	77.8
RFE	19.6	27.6	31.9	54.3	35.6	47.8	55.6	66.7
RFH	1.4	31.3	39.9	45.6	22.2	37.8	43.3	51.1
Cis	5.6	13.3	21.1	27.8	16.7	22.2	31.1	44.4
5FU	1.1	7.8	14.4	21.1	11.1	16.7	22.2	38.9

Makromantar ekstreleri hücre hatları üzerinde çoğunlukla 120 µg/mL'e doza kadar herhangi bir sitotoksik etki ortaya çıkarmamıştır. Fakat yüksek dozda antiproliferatif etki başlamaktadır. İncelenen hücre hatlarından A549 üzerinde LZH ve PAE'nina sitotoksik etkisinin antikanser moleküller olan sisplatin ve 5FU göre daha az olduğu görülmektedir. Antiproliferatif özellikler dikkate alındığında PAE'nin hem yüksek

antikanser özelliği hem düşük sitotoksik etkisinden dolayı, *in vivo* çalışmalarının yapılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.7. Ekstrelerin A549 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.

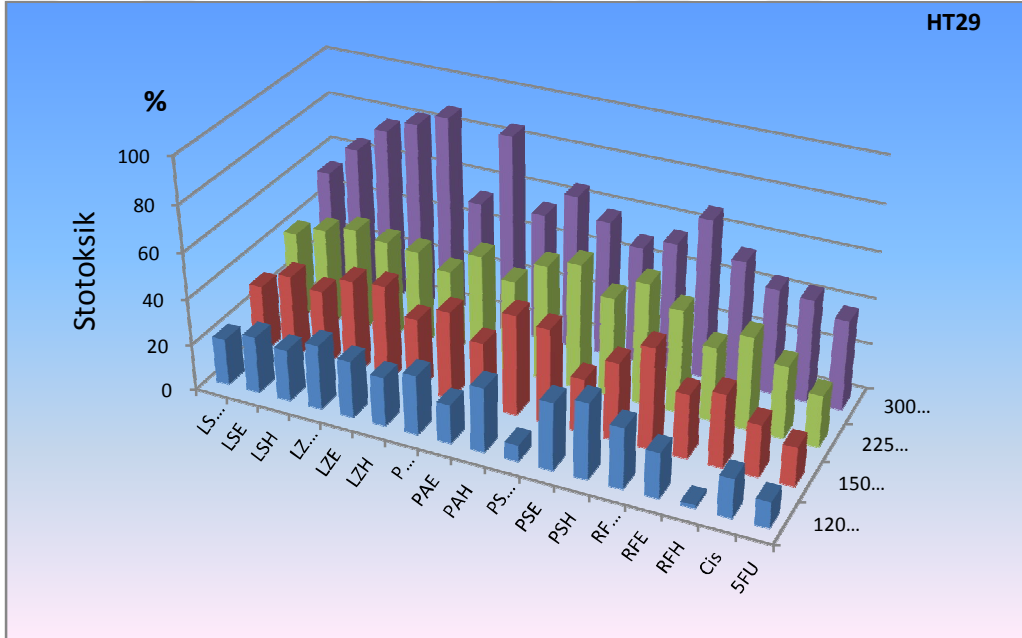
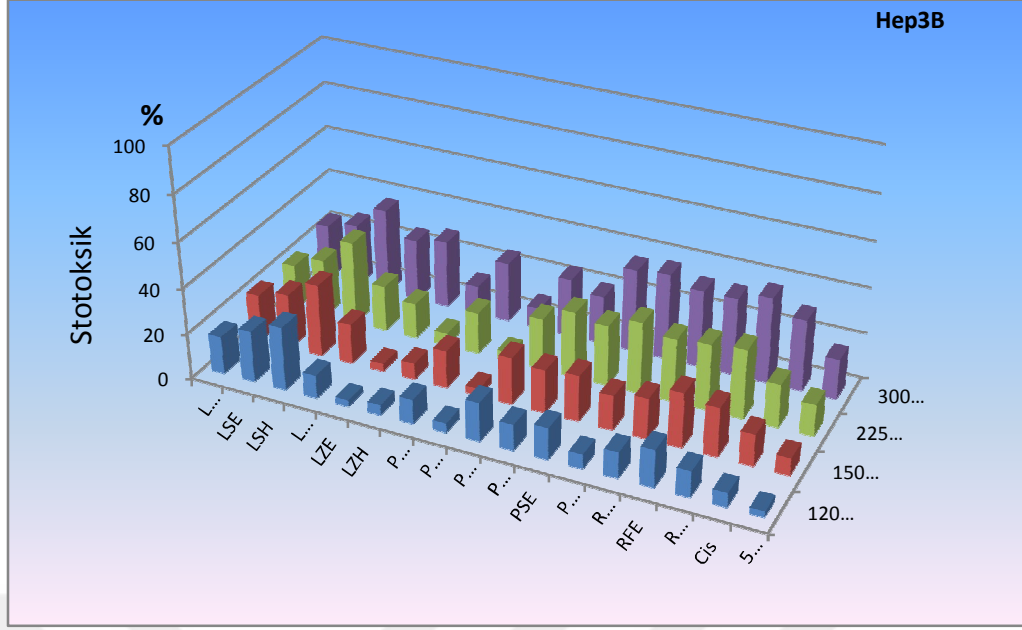
\*Hücre hatları çeşitli konsantrasyonlarda ekstreler ile 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve LDH sitotoksisite kiti kullanılarak sitotoksisite belirlenmiştir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi 549 hücre hattı için LZE, PAM ve PAH'da dikkate değer seviyede düşük sitotoksik özellik tespit edilmiştir. Ancak HeLa hücre hattında ekstrelerin tamamı oldukça yüksek toksik özellik göstermiştir (Çizelge 4.2; Şekil4.7).

Çalışma kapsamında incelenen LZE, LZH ve PAE ekstrelerinin Hep3B ve MCF7 hücreleri için yüksek antikanser aktivite göstermelerine karşın düşük sitotoksik etki göstermiştir. (Çizelge 4.3; Çizelge 4.4; Şekil 4.8; Şekil 4.9). Makromantar ekstrelerinden yapılacak izolasyon çalışmalarında biyolojik aktiviteden sorumlu moleküllerin bulunup tespit edilmesi ile yüksek antiproliferatif etkisi tespit edilebilir. Aktif moleküller üzerinden yeni ilaç dizaynları yanı sıra literatüre de önemli katkı sağlanabilir.

**Çizelge 4. 3.** Ekstrelerin Hep3B ve HT29 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi. %

µg/mL	Hep3B				HT29			
	120	150	225	300	120	150	225	300
LSM	16.5	20.3	19.6	24.3	20.0	28.9	38.9	53.3
LSE	22.3	23.8	25.0	27.5	24.4	36.7	43.3	66.7
LSH	27.6	31.4	36.3	37.5	22.2	33.3	46.7	77.8
LZM	10.0	17.4	19.9	26.9	27.8	41.1	44.4	83.3
LZE	2.8	3.3	15.4	29.4	24.4	42.2	43.3	88.9
LZH	4.4	7.0	5.3	12.3	21.1	31.1	37.8	54.4
PAM	10.5	16.1	18.0	26.1	25.6	37.8	47.8	86.7
PAE	4.0	3.1	3.6	8.9	16.7	27.8	40.0	55.6
PAH	16.9	20.4	22.3	25.4	27.8	43.3	50.0	66.7
PSM	11.3	18.8	28.8	21.0	6.9	40.9	53.9	58.6
PSE	13.8	20.0	26.3	36.3	29.0	23.0	42.8	50.6
PSH	6.3	15.0	31.3	37.5	32.7	33.6	52.3	55.6
RFM	11.3	17.5	27.5	33.8	26.1	43.7	44.4	68.9
RFE	16.3	23.8	28.8	33.8	19.6	27.6	31.9	54.3
RFH	11.3	21.3	30.0	37.5	1.4	31.3	39.9	45.6
Cis	6.3	13.8	18.8	31.3	16.7	22.2	31.1	44.4
5FU	2.5	7.5	13.8	17.5	11.1	16.7	22.2	38.9



**Şekil 4.8.** Ekstrelerin Hep3B ve HT29 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.

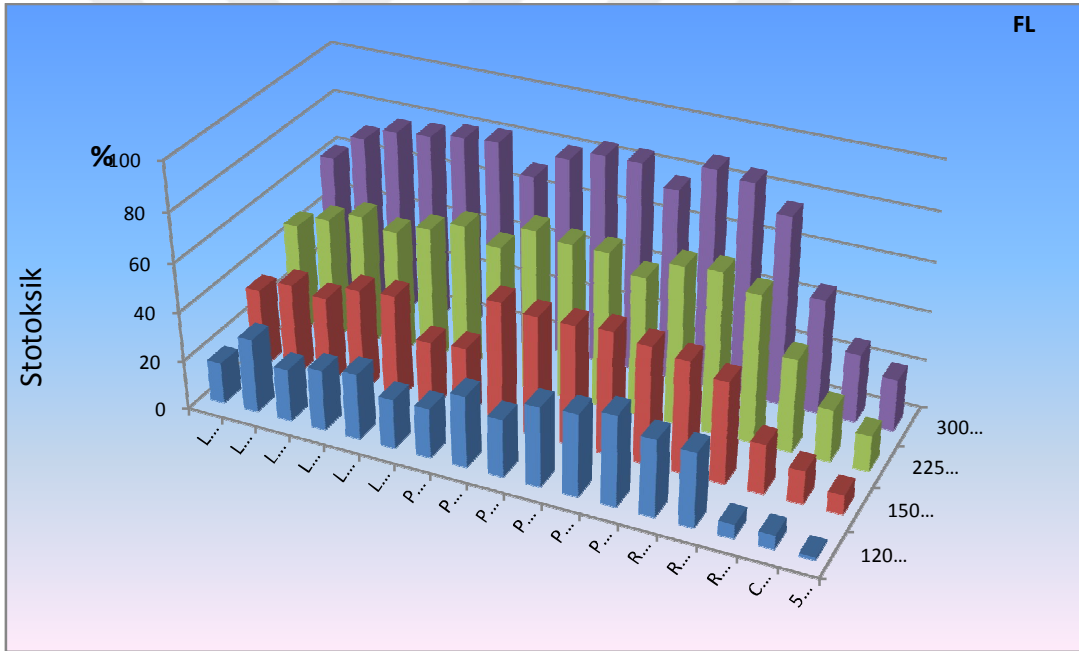
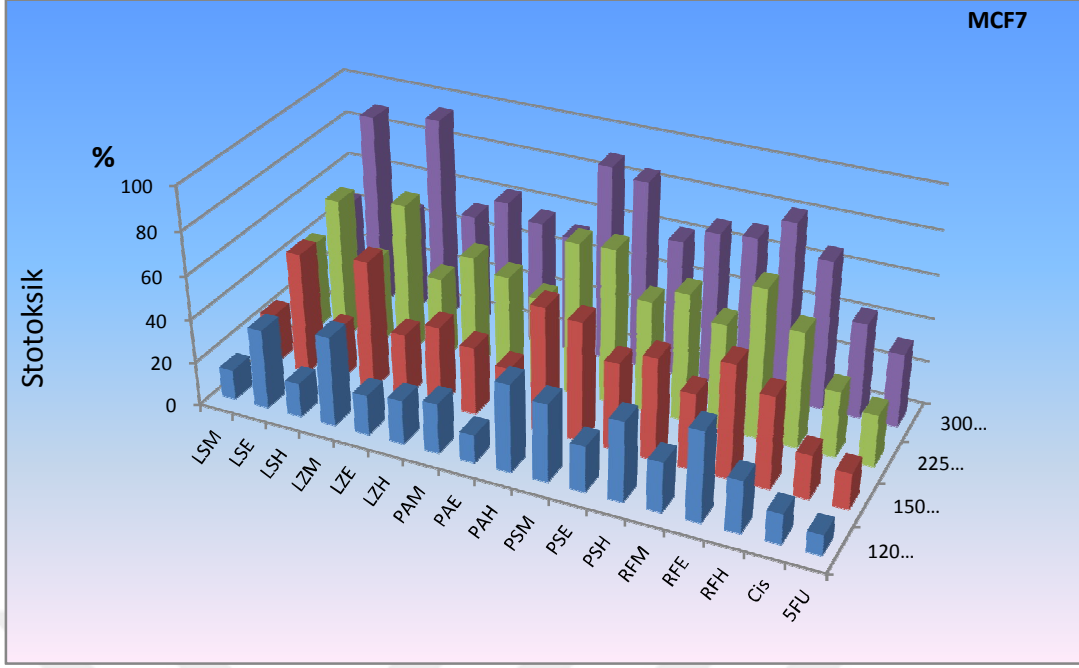
\*Hücre hatları çeşitli konsantrasyonlarda ekstreler ile 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve LDH sitotoksosite kiti kullanılarak sitotoksisiteleri belirlenmiştir.

Toksisite çalışmaları sırasında incelenen normal FL hücreleri üzerinde nispeten yüksek sayılabilecek değerlerin bulunması ekstre analizlerinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Çizelge 4.4; Şekil 4.9). Pek çok molekül içeren ekstreler biyolojik etkinin görülebilmesi adına yüksek dozlarda çalışılmaktadır. Bu nedenle istenmeyen toksik etkiler görülebilmektedir. Yapılacak ileri çalışmalar neticesinde bu makromantar ekstrelerinden elde edilecek biyoaktif izolatlar düşük dozlarda kullanılacağı için toksik etkileri de düşük olacaktır. İkinci bir neden olarak FL hücre hattı kanser hücre hatlarına göre kültür ortamına daha duyarlıdır. Bu nedenle ekstrelerin toksik etkisi olduğundan bir miktar fazla ölçülmüş olabilir. Ancak yine de test edilen bu makromantar ekstreleri ileri farmakolojik çalışmalar için ümit vaat etmektedirler.

**Çizelge 4. 4.** Ekstrelerin MCF7 ve FL hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi. %

µg/mL	MCF7				FL			
	120	150	225	300	120	150	225	300
LSM	13.6	22.7	40.0	45.5	16.7	32.2	45.6	61.1
LSE	36.4	55.5	65.5	90.9	30.0	37.8	51.1	72.2
LSH	15.5	23.6	40.0	47.3	21.1	35.6	55.6	77.8
LZM	40.9	59.1	70.0	95.5	24.4	42.2	52.2	78.9
LZE	18.2	29.1	39.1	53.6	26.7	43.3	56.7	81.1
LZH	20.0	36.4	52.7	63.6	20.0	27.8	61.1	82.2
PAM	22.7	30.9	47.3	57.3	20.0	28.9	55.6	71.1
PAE	12.7	25.5	40.9	53.6	28.9	51.1	65.6	81.1
PAH	40.0	57.3	70.0	90.0	23.3	48.9	63.3	85.6
PSM	35.5	54.5	70.9	86.4	32.2	48.9	63.3	85.6
PSE	20.9	40.0	50.9	62.7	33.3	50.0	56.7	77.8
PSH	36.4	46.4	58.2	70.0	36.7	47.8	64.4	88.9
RFM	22.7	34.5	48.3	71.5	31.1	45.6	65.6	86.7
RFE	40.9	51.8	68.2	81.8	30.0	41.1	60.0	76.7
RFH	23.6	41.8	52.7	68.2	5.6	20.0	37.8	46.7
Cis	13.6	20.0	30.0	43.6	5.6	13.3	21.1	27.8
5FU	9.1	16.4	23.6	33.6	1.1	7.8	14.4	21.1



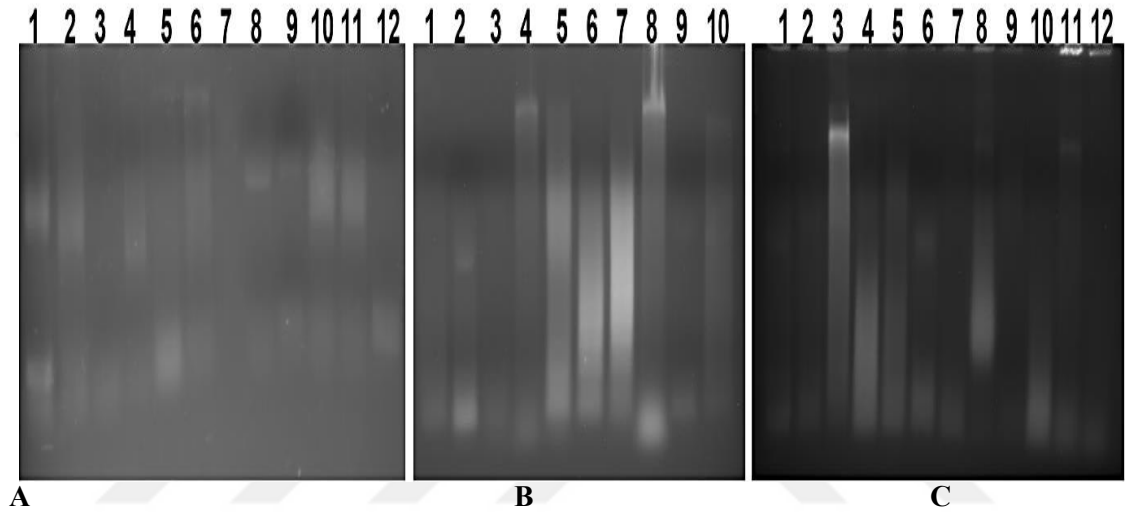


**Şekil 4.9.** Ekstrelerin MCF7 ve FL hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi.  
 \*Hücre hatları çeşitli konsantrasyonlarda ekstreler ile 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve LDH sitotoksisite kiti kullanılarak sitotoksisite belirlenmiştir.

#### 4.8. Makromantar Ekstrelerinin DNA Bantlaştırma Potansiyelleri

Test edilen makromantar ekstrelerinin apoptozun bir göstergesi olan DNA degradasyon aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan DNA bantlaşma testine göre ekstreler etkili dozlarda yani IC50 değerlerinde (Gong ve ark., 1994). HeLa ve HT29 hücreleri üzerinde belirgin biçimde DNA kırıklarına neden olduğu jel

üzerinde oluşturdukları basamaklı yapıdan anlaşılmaktadır (Anonim, 2019a). DNA bantlaşma testine göre kontrol kuyucuğunda herhangi bir DNA degradasyonu görülmezken makromantar ekstrelerin meydana getirdiği DNA kırıklarının çok belirgin bantlaşmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). DNA üzerinde kısmi kırıklara neden olan bu ekstrelerin antikanser aktivitelerinin bir kısmından apoptoz mekanizmasında sorumlu olduğu düşünülmektedir. Test log fazında eksponansiyel büyüme gösteren HeLa ve HT29 hücre hattı kullanılarak yapılmış olup inkübasyon süresi 24 saat olarak sınırlandırılmıştır.



**Şekil 4.10.** Makromantar ekstrlerinin DNA bantlaşma testi.

\*(A) 1- HeLa RFE, 2- HeLa RFM, 3- HeLa PAE, 4- HeLa PAM, 5- HeLa Kontrol, 6- HT29 Kontrol, 7- HT29 PAE, 8- HT29 PAH, 9- HT29 PSM, 10 - HT29 PSH, 11 - HT29 LZH, 12 - HT29 PAM;  
 B) 1- HT29 LSE, 2- HT29 LSH, 3- HT29 LSM, 4- HT29 Kontrol, 5- HT29 RFH, 6- HT29 RFM, 7- HT29 RFE, 8- HT29 Kontrol, 9- HT29 LZE, 10- HT29 LZM  
 C) 1- HeLa LZE, 2- HeLa LZH, 3- HeLa LZM, 4- HeLa LSE, 5- HeLa LSM, 6- HeLa PSE, 7- HeLa PSH, 8- HeLa PSM, 9- HeLa PAH, 10- HeLa RFH, 11- Kontrol, 12- Kontrol. )

#### 4.9. Makromantar Ekstrelerinin Hücre Göçüne Etkisi

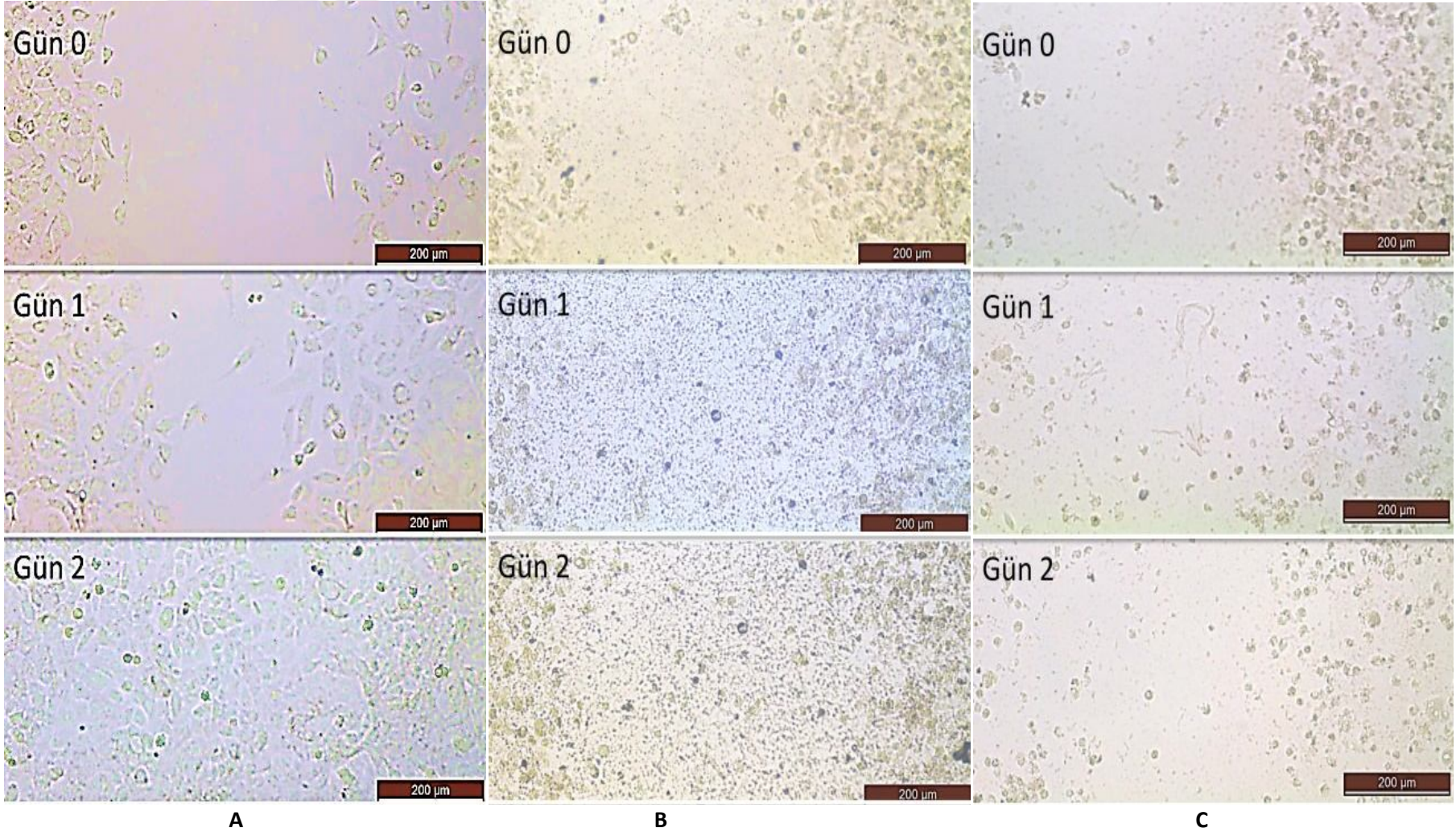
Bu çalışmada makromantar ekstrlerinin hücre hatları için migrasyon kapasitesi üzerine olan etkileride araştırılmıştır. Özellikle Hücre göçü bilindiği gibi özellikle kanser hücreleri için önemli bir karakteristik olup yeni antikanser ajanların da hedefi konumundadır. Migrasyon kapasitesini yitiren kanser hücrelerinde hücrel stres tetiklenir ve bu apoptoz mekanizmasını aktifleşmesine neden olabilir. Bu yüzden yeni geliştirilen antikanser ilaçların bir amacı da kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerini önemli ölçüde azaltmaktır.

Zamana bağımlı tarzda yapılan migrasyon testine göre LZE, LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstreleri HeLa kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerini kontrol hücrelerine göre önemli oranda baskılamıştır (Şekil 4.11).’de görüldüğü gibi kontrol grubu kanser hücreleri test sırasında boş bırakılan alanı üç gün içinde tamamen doldurduğu halde, test ekstreleri uygulanan gruplarda insert içindeki boşluk dolmadığı gibi hücrelerde de küçülme meydana geldiği görülmüştür. Migrasyon, anjiogenez ve invazyon ile beraber metastazın en önemli basamağını teşkil eder.

Dolayısıyla, LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstreleri migrasyonu inhibe ederek kanser hücrelerinin metastaz yeteneklerini de önemli ölçüde zayıflatır. Bu test sonucuna göre, LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstreleri hücre migrasyonunu inhibe ettiği için, bu ekstrelerin antiproliferati etkilerinin en azından bir kısmından antimigrasyon etkinin sorumlu olduğu anlaşılmaktadır.

PAE ve PSE ekstreleri üçüncü günün sonunda insert içindeki boş alanın fazla olduğu görülmektedir hücrelerde küçülme sayılarında azalmanın tespit edilmesi migrasyonu önemli oranda baskıladığı görülmektedir(Şekil 4.12).LSE ekstreleri ilk günden itibaren migrasyonu önemli oranda baskılamış hücrelerde şekil bozukluğuna sayılarında ise önemli oranda azalmalara sebep olmuştur LZE ekstreleri ise migrasyonda LSE ile karşılaştırıldığında migrasyon kapasitesinin daha düşük olduğunu (Şekil4.11).görmekteyiz

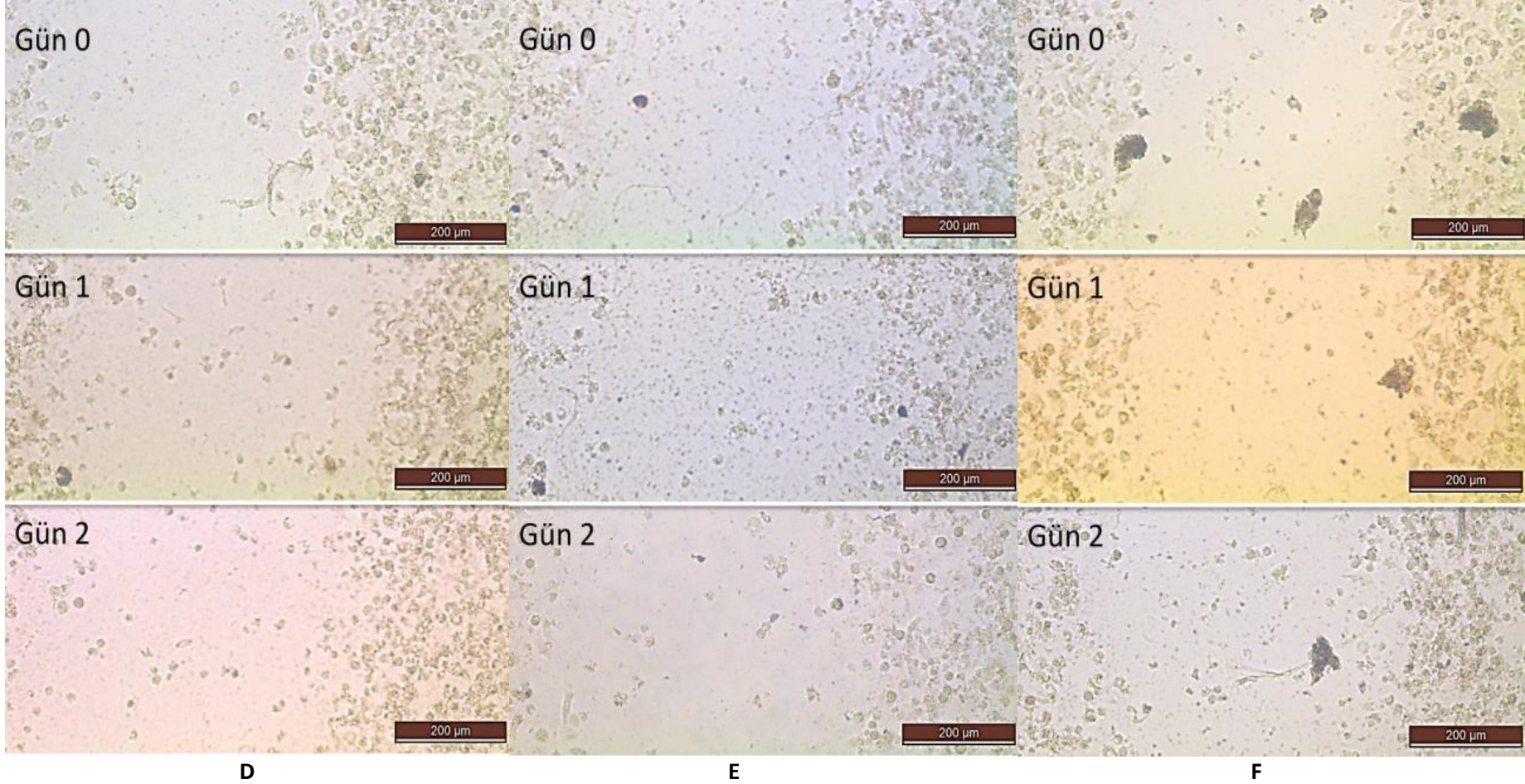
PAE, PSE ve RFE ekstreleri ile yapılan migrasyon testlerinde karşılaştırma yaptığımızda PSE ekstrelerinin etkisinin yüksek PAE ekstrelerinin ise migrasyonda etkisinin daha az olduğunu RFE ekstrelerinin ise hücrelerde önemli oranada küçülmelere sebep olduğunu fakat hücre göçlerinde PSE ekstreleri kadar etkilili olmadığını (Şekil 4.12) görmekteyiz.



**Şekil 4.11.** Makromantar ekstralarının HeLa hücre hattı üzerinde hücre migrasyonuna etkileri.

\*Testler log fazında eksponansiyel büyüme gösteren HeLa hücre hatları kullanılarak yapılmış olup inkübasyon süresi 3 gün olarak sınırlandırılmıştır.

A-Kontrol, B-LZE, C-LSE, Bar 200 µm



**Şekil 4.12.** Makromantar ekstralarının HeLa hücre hattı üzerinde hücre migrasyonuna etkileri.

\*Testler log fazında eksponansiyel büyüme gösteren HeLa hücre hatları kullanılarak yapılmış olup inkübasyon süresi 3 gün olarak sınırlandırılmıştır.  
D-PAE, E- PSE, F-RFE. Bar 200 µm

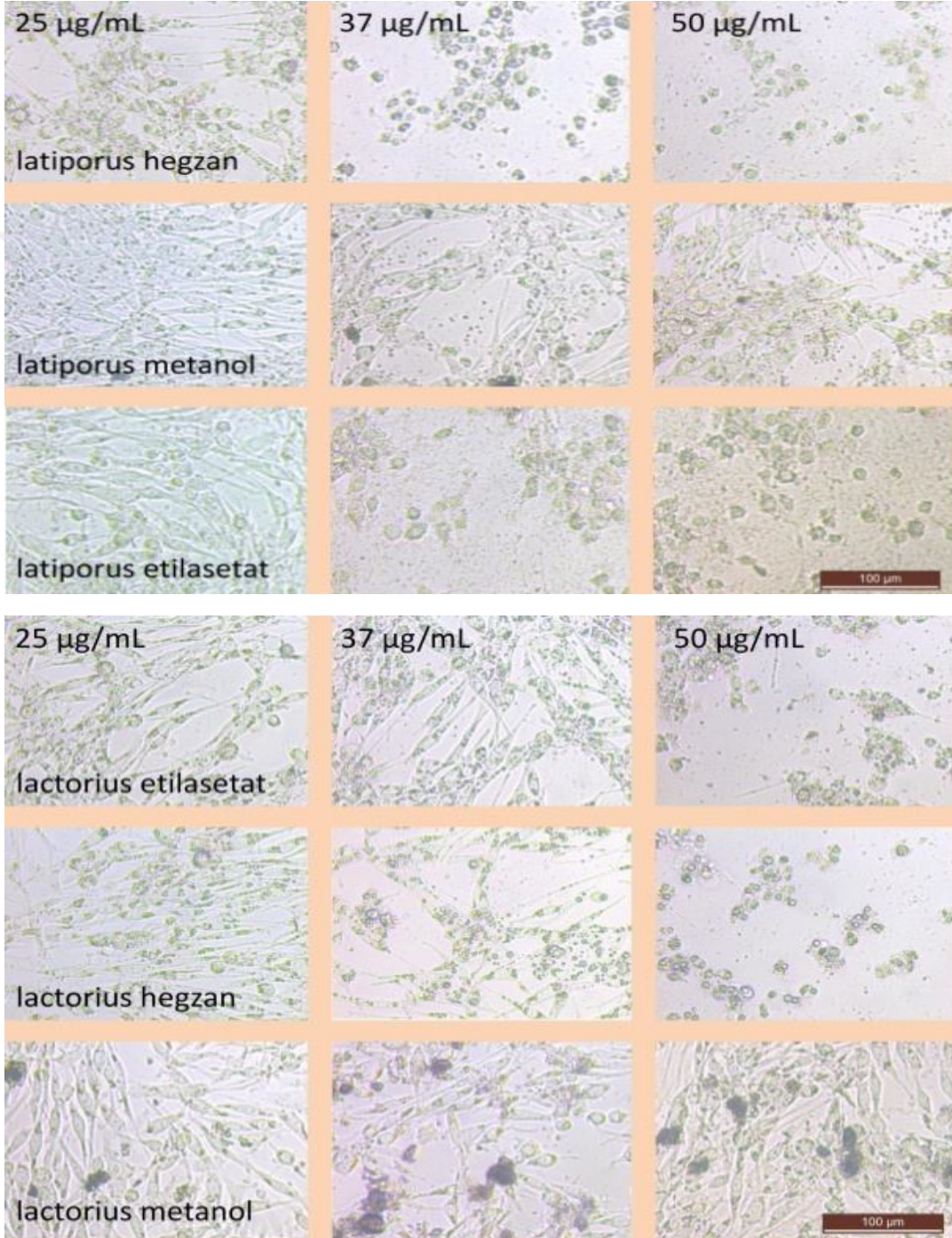
#### 4.10. Makromantar Ekstrelerinin Sitotoksitelerinin Morfoljik Değerlendirilmesi

Makromantar ekstrelerinin hücre morfolojileri üzerindeki etkileri, üzerinde kamerada bulunan faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir. Görüntüler farklı konsantrasyonlarda makromantar ekstreleriyle muamele edilmiş hücrelerin morfolojilerinin ilgili kontrollerle karşılaştırıldığı faz-kontrast imajlarını göstermektedir. Makromantar ekstreleriyle muamele edilmiş hücrelerin morfolojileri sadece yüksek konsantrasyonlarda (>50 µg/mL) çeşitli oluşumlarla farklılaşmıştır. Bu değişimler hücrenin yuvarlak hale gelmesi ve sonrasında zeminden ayrılarak hücre ölümünün bir belirtisi olan yüzen hücrelerin oluşumlarını içerir. Makromantar ekstreleriyle muamele edilmiş hücrelerin düşük ve orta konsantrasyonlarda (25 ve 37 µg/mL) hücre morfolojisi üzerinde çok fazla bir değişimine neden olmamıştır. Bu dozlarda kontrol grubu ve normal çoğalan hücreler, membran bütünlüğü nispeten korunmuş fakat huzursuz bir görüntü sergiler. Özellikler 25 µg/mL ve altı dozlarda kontrol hücrelerine benzer şekilde, makromantar ekstreleriyle muamele edilmiş hücrelerin büyük çoğunluğu epitelooid ya da normal fibroblast benzeri görünümünü sürdürmeye devam etmiştir.

*Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, makromantar ekstrelerinin HeLa hücre hatlarında düşük ve orta konsantrasyonlarda (25 ve 37 µg/mL) morfolojik olarak çok fazla etki etmemesine rağmen yüksek konsantrasyonlarda (>50 µg/mL) ise hücrelerde, küçülmeye veya sitoplazmik küçülmeye ya da apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcik oluşumlarına neden olmuştur(Şekil 4.15).

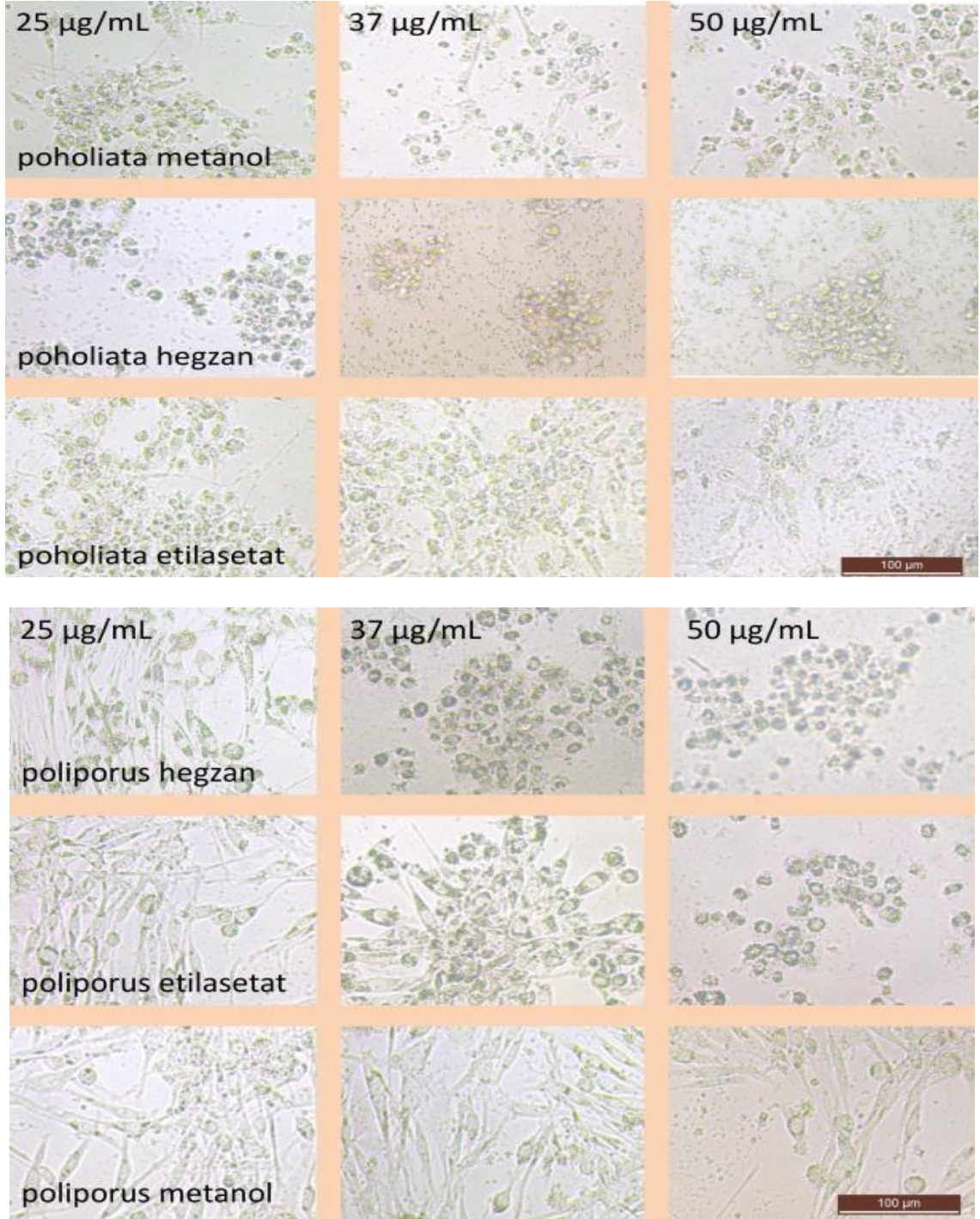
Makromantar ekstrelerinin MCF7 ile A549 hücre hatlarının üzerlerine olan etkileri bakıldığında hücrenin astroit şekilden globüler şekle kaymasına, zemine çok zayıf bağlanmasına, hücrelerde kümeleşmeye sebep olmuştur(Şekil4.16.;Şekil4.17). Makromantar ekstrelerinin A549 ile Hep3B hücre hatlarına olan etkileri yüzeye tutunan hücre sayısında azalmaya ve hücrelerde dejeneratif değişikliklere sebep olmuştur(Şekil4.18.;4.19).

HeLa hücre hattı üzerinde yapılan testlerde *Lactarius zonarius*, *Laetiporus sulphureus* ekstralarının sadece yüksek konsantrasyonlarda (>50 µg/mL) hücre şekillerinde önemli oranada değişimlere sebep olduğunu, hücrenin astroit şekilden globüler şekle kaymasına, zemine çok zayıf bağlanmasına (Şekil 4.13). Neden olduğunu görmekteyiz.



Şekil 4.13. Makromantar ekstralarının (A) Hela, hücrehatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

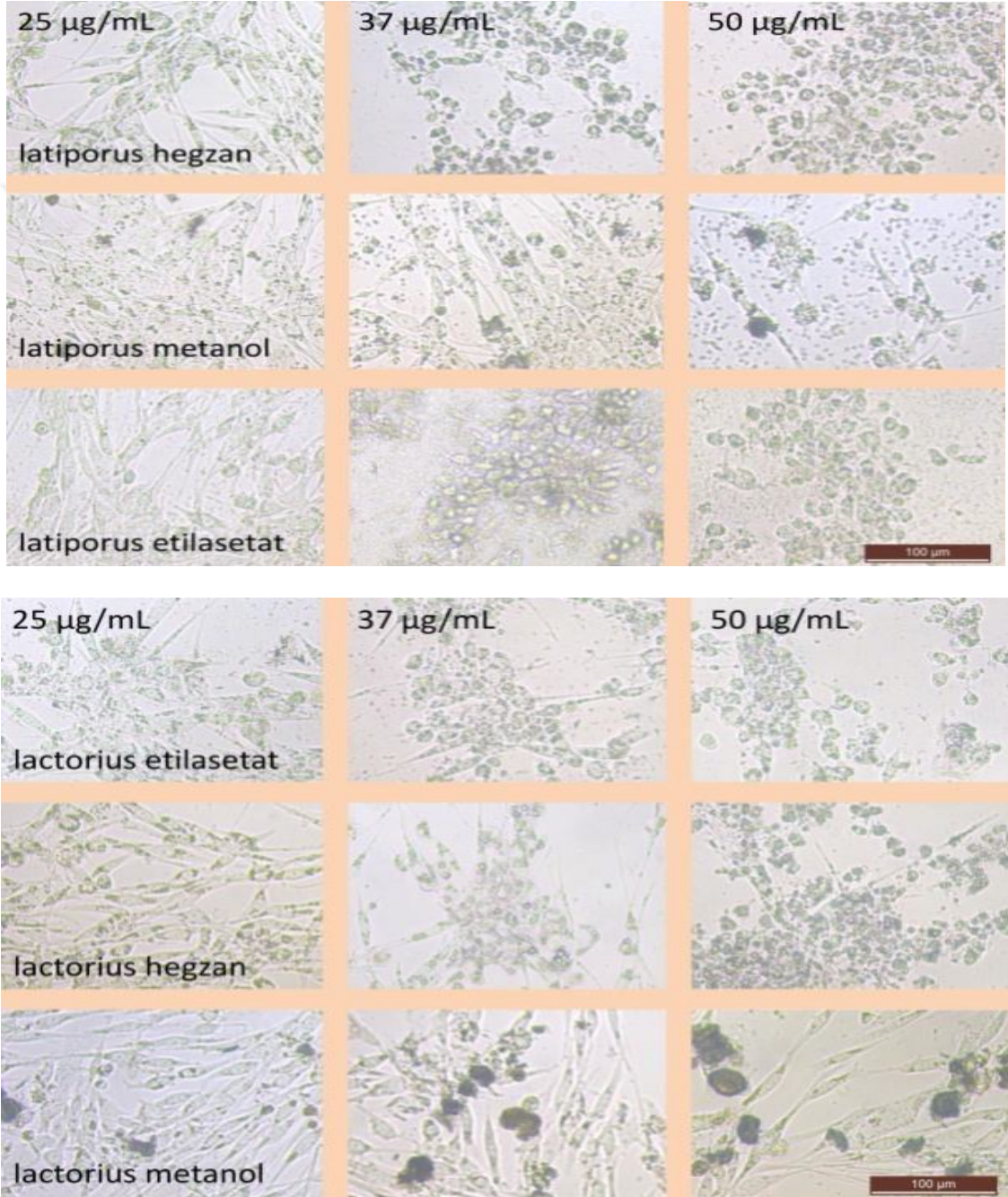
*Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* makromantar ekstretlerinin HeLa hücre hatlarında düşük ve orta konsantrasyonlarda (25 ve 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) morfolojik olarak çok fazla etki etmemesine rağmen yüksek konsantrasyonlarda (>50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ise hücrelerde kümeleşme, kabarcık, sivri uç ve baloncuk oluşumuna neden olmuştur(Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Makromantar ekstrelerinin (A) Hela, hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

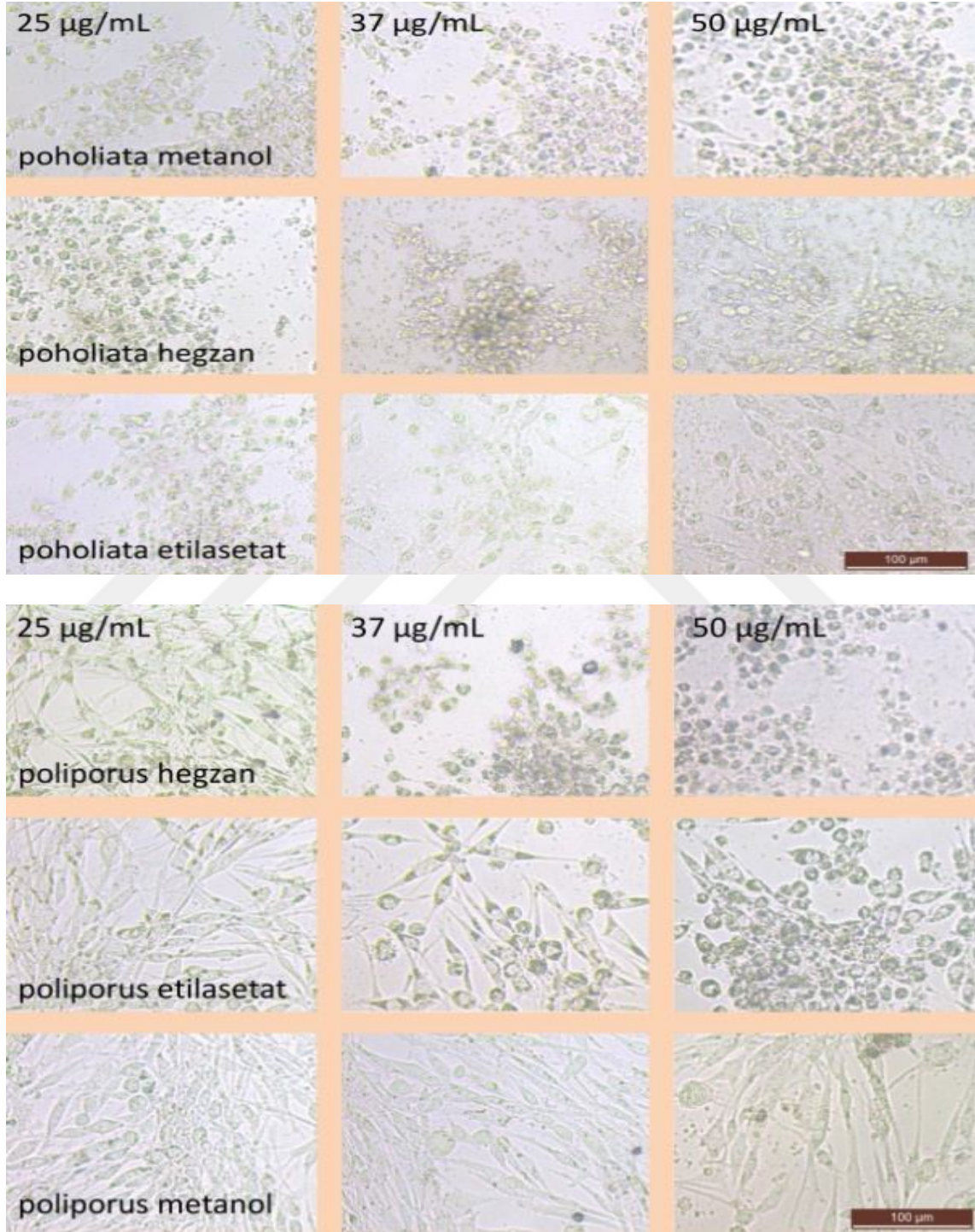


*Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, makromantar ekstretlerinin HT29 hücre hatlarında düşük ve orta konsantrasyonlarda (25 ve 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) morfolojik olarak çok fazla etki etmemesine ramen yüksek konsantrasyonlarda (>50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ise hücrelerde, küçülmeye veya sitoplazmik küçülmeye ya da apoptotik hücreler üzerinde gelişen ceccik oluşumlarına neden olmuştur(Şekil 4.15).



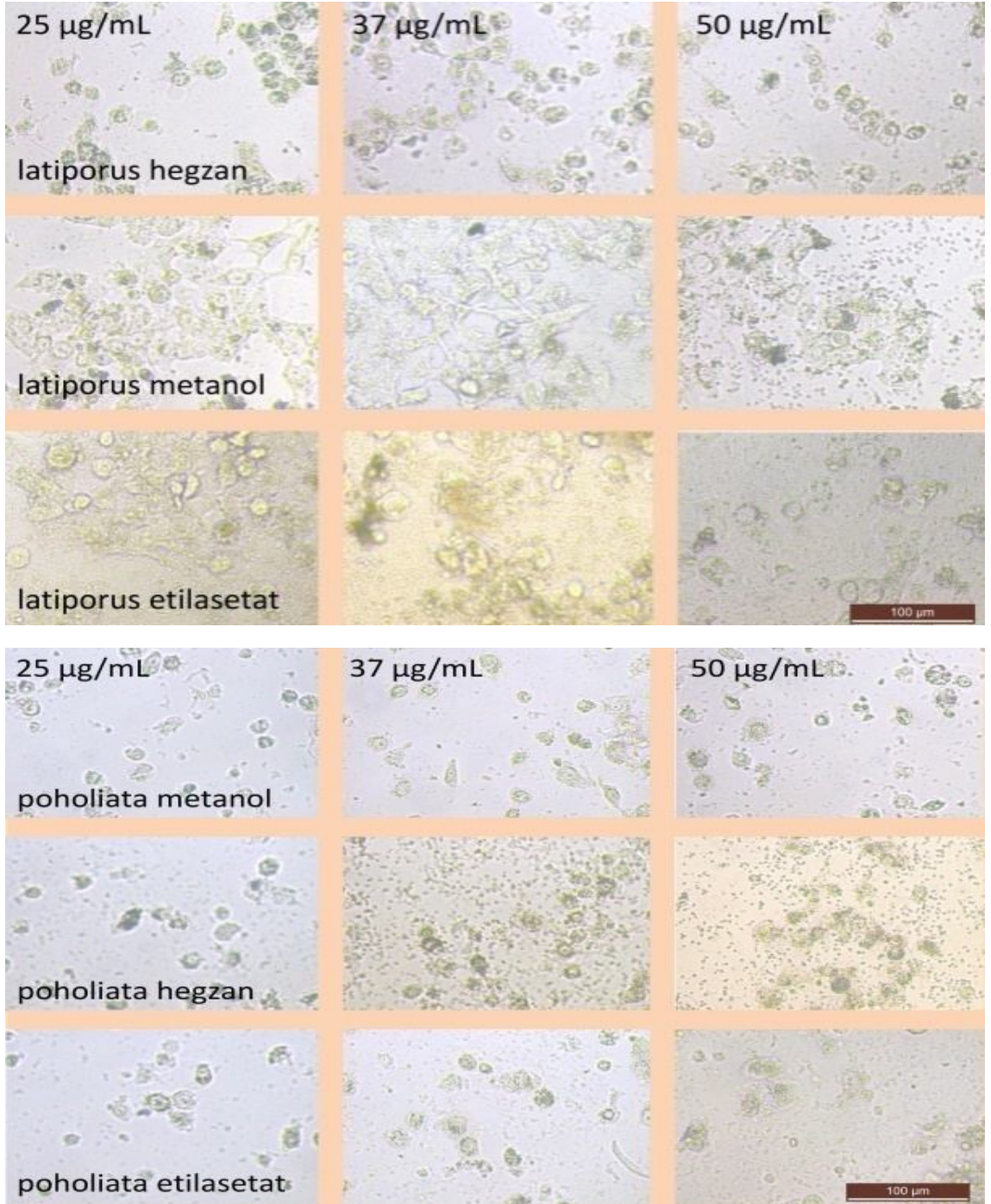
Şekil 4.15. Makromantar ekstrelerinin (B) HT29 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

*Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* ekstraktlarının MCF7 hücre hatlarının üzerlerine olan etkileri bakıldığında hücrenin astroit şekilden globüler şekle kaymasına, zemine çok zayıf bağlanmasına, hücrelerde kümeleşmeye sebep olmuştur(Şekil4.16).



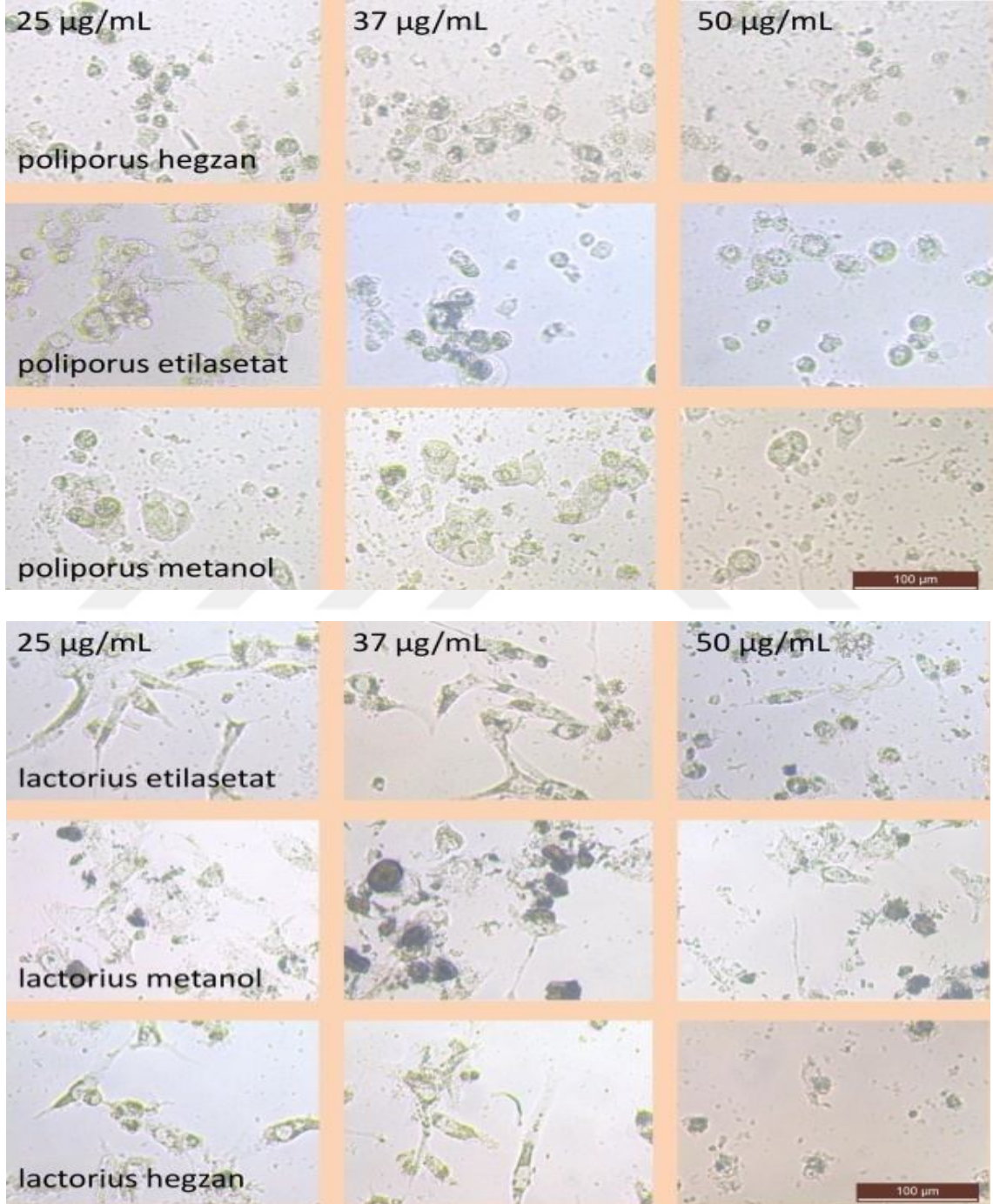
**Şekil 4.16.** Makromantar ekstraktlarının (C) MCF hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

*Pholiota adiposa*, *Leatiphorus sulphureus* eksretlerinin A549 hücre hatlarının üzerlerine olan etkileri bakıldığında hücrenin astroit şekilden globüler şekle kaymasına, zemine çok zayıf bağlanmasına, hücrelerde kümeleşmeye ve sayısal azalmaya sebep olmuştur(Şekil 4.17).



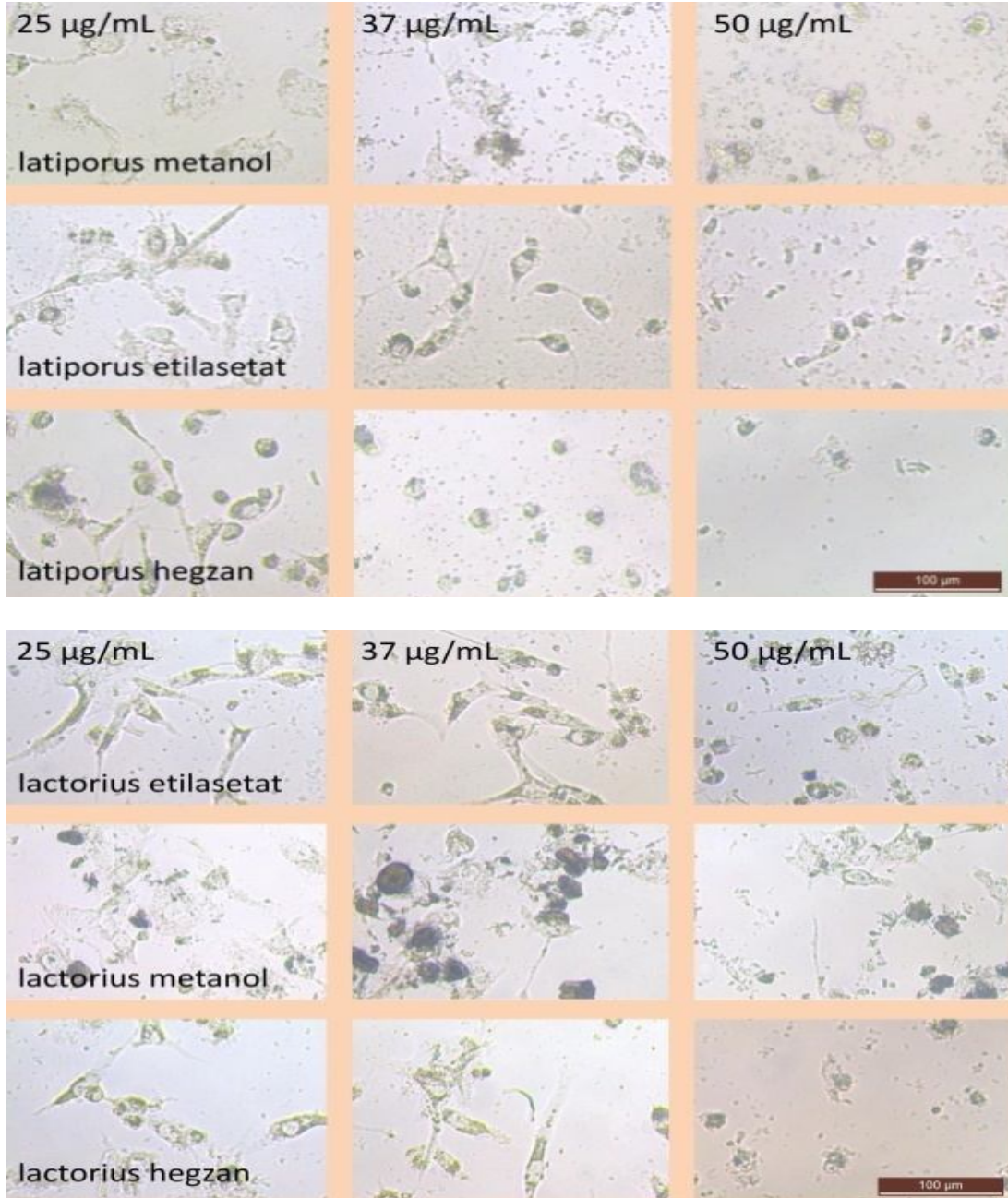
Şekil 4.17. Makromantar ekstrelerinin (D) A549 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

*Polyporus squamosus*, *Lactarius zonarius*, makromantar ekstretlerinin A549 hücre hatları üzerindeki etkileri yüksek konsantrasyonlarda (>50 µg/mL) hücrelerde, küçülmeye veya sitoplazmik küçülmeye ya da apoptotik hücreler üzerinde gelişen ceccik oluşumlarına neden olmuştur(Şekil,4.18).



Şekil 4.18. Makromantar ekstretlerinin (D) A549 hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

*Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, makromantar ekstretlerinin Hep3B hücre hatlarında düşük ve orta konsantrasyonlarda (25 ve 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) morfolojik olarak çok fazla etki etmemesine ramen yüksek konsantrasyonlarda (>50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ise hücrelerde, yüzeye tutunan hücre sayısında azalmaya ve hücrelerde dejeneratif değişikliklere sebep olmuştur (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Makromantar ekstretlerinin (E) Hep3B hücre hatları morfolojileri üzerindeki etkileri.

\*Ekspansiyel büyüme gösteren hücreler çeşitli konsantrasyonlarda makromantar ekstretleri ile 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Kontrol hücreleri sadece DMSO ile muamele edilmiştir. Tüm ölçümler 100  $\mu\text{m}$ 'dir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışmamızda, *Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, *Pholiota adiposa*, *Polyporus squamosus* ve, *Ramaria flava*, Makromantar türlerinin Etilasetat, Metanol ve hekzan ekstralarının 120 µg/mL, 150 µg/mL, 225 µg/mL ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında MTT testi ile antikanser aktivite tayinleri yapılmıştır. LDH testiyle sitotoksik etkilerine bakılmıştır. Migrasyon testi ile hücre göçlerine, DNA bantlaşma testleriyle DNA kırılmaları incelendi. Kullanılan makromantarların antiproliferatif etkilere sırasıyla; PAE ve PAH ekstraları; A549 hücre hattında, LSH, PAE ve PAH ekstraları; HeLa hücre hattında, PAE ve PAH ekstraları; Hep3B hücre hattında, PAE ve PAH ekstraları; HT29 hücre hattında LSH, PAE, PAH ve PSH ekstraları; MCF7 hücre hattında yüksek oranda antiproliferatif özellik göstermişlerdir.

Özellikle *Pholiota adiposa*'nın Etilasetat ve Metanol ekstraları bütün hücre hatlarında oldukça etkili bulunmuştur. Çalışılan makromantar ekstralarının hiçbiri pozitif kontrol olan sisplatin kadar antikanser aktivite gösterememesine rağmen, PAH ve PAE ekstralarının HT29 hücre hattında gösterdikleri biyolojik aktiviteleri ileri yapılacak araştırmaları destekleyebilecek kadar önemlidir. Etilasetat ve Metanol ekstralarındaki biyoaktif moleküller bilinmediği halde Metanol ekstralarındaki antiproliferatif aktivite göstermiş ekstraların etkilerinin kaynağının; flavanoidler, lignanlar, fenolik asitler, terpenoitler gibi fenolik bileşenler olabileceği belirtilmiştir (Mattila ve ark,2001).

Kanser hücrelerine karşı ekstraların olası etkilerini belirlemek amacıyla uyguladığımız MTT yöntemiyle elde edilen verilere bakıldığında, 15 değişik makromantar ekstresinin, denenen hücre hatlarına karşı farklı konsantrasyonlarda (120 µg/mL, 150 µg/mL, 225 µg/mL, 300 µg/mL) farklı etkiye sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). Antiproliferatif özellikler dikkate alındığında PAE'nin 120 µg/mL A549 hücre hattı üzerine düşük sitotoksik etkisi ve yüksek antikanser özelliği vardır. Çalışılan moleküllerinin sitotoksik etkilerinin düşük olması sağlıklı hücrelere zarar vermemesi kanser tedavisinde arzu edilen özellikler arasındadır. PAE'nin biyoaktif bileşenlerine göre değerlendirilmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz. Bu tez çalışmasında, Tokat ve çevresinde doğal olarak yetişen makromantar türlerinden *Lactarius zonarius*, *Leatiphorus sulphureus*, *Polyporus squamosus*, *Pholiota adiposa* ve *Ramaria flava* türlerinden elde edilen ekstraların etken maddeleri bilinmediği için ekstralar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldı. Bundan dolayı toksik etkilerinin fazla olduğu görüldü. Bu

alanda yapılan başka ekstre çalışmalarında da aynı sonuçları verdiği görülmektedir (Mattila ve ark, 2001).

Makromantar ekstrlerinin hücre hatları üzerinde çoğunlukla 120 µg/mL'e doza kadar herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı tesbit edildi. Daha yüksek dozdaki eksterlerde antiproliferatif etki görülmektedir. Bu çalışma kapsamında incelenen hücrelerden Hep3B ve MCF7 için LZE, LZH ekstretleri, 120 µg/mL ve 150µg/mL konsantrasyonlarında oldukça etkilidir. PAE ekstrleri ise 150µg/mL ve 225µg/mL konsantrasyonlarında yüksek antikanser aktivite gösterdikleri gibi düşük sitotoksiste özelliklerileri sebebiyle önem arz etmektedir. (Çizelge4.3 ve 4.4;Şekil 4. 8. ve 4. 9).

Mantar ekstrlerinin kanser hücrelerine farklı etkileri göstermeleri etken maddelerinin farklı olduğunu göstermekte ve bu alanda çalışılması için bizlere ümit vermektedir. Ayrıca LSM, PAE ekstrlerinin 120 µg/mL konsantrasyonunda sitotoksik etkilerinin sispatine yakın olması toksik etkisinin düşük olduğunu göstermektedir.

DNA bantlaşma testine göre ekstrler etkili dozlarda (IC50 değerlerinde) HeLa ve HT29 hücreleri üzerinde belirgin biçimde DNA kırıklarına neden olduğu jel üzerinde oluşturdıkları basamaklı yapıdan anlaşılmaktadır (Şekil 4.10). DNA bantlaşma testine göre kontrol kuyucuğunda herhangi bir DNA degradasyonu görülmezken ekstrlerin meydana getirdiği DNA kırıklarının çok belirgin bantlaşmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). DNA üzerinde kısmi kırıklara neden olan bu ekstrlerin antikanser aktivitelerinin bir kısmından apoptoz mekanizmasının sorumlu olduğu anlaşılmaktadır. Bu da gösteriyor ki ekstrlerimizin antikanser aktivitesinde etken olduğu fakat, etki düzeylerinin farklı olduğu görülmektedir. (Şekil 4.10). HT29 hücre hattına PAE, PAH ekstrlerininilave edildiğinde DNA üzerindeki kısmi kırılmaların, diğer ekstretlere kıyasla fazla olması antiproliferatif özelliklerinin de fazla olabileceğini düşündürmektedir.

Zamana bağımlı migrasyon testine göre, LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstrleri HeLa kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerini kontrol hücrelerine göre önemli seviyede baskılamıştır. (Şekil4,11.)'de görüldüğü gibi kontrol grubu kanser hücreleri test sırasında boş bırakılan alanı üç gün içinde tamamen doldurduğu halde, test ekstrleri uygulanan gruplarda hücre kültür ortamındanki boşluğun dolmadığı, hücrelerde de küçülme meydana geldiği, hücre göçlerinin baskılandığı görüldü. Bu yüzden çalışılanmakromantar ekstrlerinin, kanser

hücrelerinin en belirgin özelliklerinden olan hücre göçlerini, hücre büyümesini yavaşlattığı ve göçleri baskıladığı görülmüştür. Migrasyon, anjiogenez ve invazyon ile beraber metastazın en önemli basamağını teşkil eder. Dolayısıyla LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstreleri migrasyonu inhibe ederek kanser hücrelerinin metastaz yeteneklerini de önemli ölçüde zayıflatır. Bu test sonucuna göre LSE, PAE, PSE ve RFE makromantar ekstreleri hücre migrasyonunu inhibe ettiği için, bu ekstrelerin antiproliferatif etkilerinin en azından bir kısmından antimigrasyon etkinin sorumlu olduğu anlaşılmaktadır.

Ayrıca yapmış olduğumuz çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiğinden, elde edilen bulgular *in vivo* sonuçları birebir yansıtmayabilir. Bu nedenle biyoaktif bileşenlerin etkinliğinin açığa çıkarılabilmesi için bu bileşenlerin elde edilerek antikanser aktivitelerinin daha ileri düzeyde *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Antikanser özelliği tespit edilen *Leatiphorus sulphureus* Hegzan (LSH), *Pholiota adiposa* Etilasetat (PAE), *Pholiota adiposa* Hegzan (PAH), *Polyporus squamosus* Hegzan (PSH), ekstreleri içersinde tüm konsantrasyonlarda en iyi sonuç alınan PAH ve PAE ekstretlerinin düşük sitotoksik ve yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu görüldü. RFH ekstresinin 120 µg/mL konsantrasyonunda FL hücre hattına sitotoksik etkisinin sisplatin kadar düşük olduğu bulunmuştur. Ekstrelerimizin hücre hatlarıyla yapılan deneylerde tüm konsantrasyonlarda A549 üzerine toksik etkisinin düşük seviyede olduğu ama Hela hücre hattında yüksek olduğu tesbit edilmiştir.

Bu alanda yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle Doğu Asya ülkelerinde çeşitli mantar türlerinin kanser tedavisinde kullanıldığı görülmektedir. Çin, Japonya, Tayvan ve Kore gibi uzak Doğu ülkelerinde makromantar türlerinden *Tremella fuciformis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* (shiitake) yüzlerce yıldır şifa ve yiyecek olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark, 2007). Sitotoksik etki üzerine yapılan bir çalışmada ise *Cordyceps militaris* mantarı çok uzun zamandan beri doğu Asya'da kanser hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır Sitotoksik etkisinin düşük olması tedavide kullanılmasını desteklemektedir. *Cordyceps militaris* protein (CMP), *Fusarium oxysporum* mantarına karşı güçlü antifungal etki göstermişken, aynı zamanda insan meme ve mesane kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Park ve ark, 2009). Benzer çalışma Güneydoğu Asya ve Çin'de meme kanserini tedavi etmek için yapılmıştır. Sklerotiyadan hazırlanan soğuk su ekstraktının (LR-CW) L., insan meme karsinoması (MCF-7) ve Akciğer karsinoması (A549) için sırasıyla IC50'si 96.7 µg / mL ve 466.7 µg / mL konsantrasyonlarında antiproliferatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu eksternin insan normal hücresine karşı (184B5; insan göğüs hücresi ve NL



20 insan akciğer hücresi) sitotoksitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. DNA parçalanma çalışmaları, LR-CW'nin antiproliferatif etkisinin olduğunu göstermiştir, IC50'si sırasıyla 70.0 /g / mL ve 76.7 µg / mL konsantrasyonlarında kanser hücrelerine karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur (Lee,2011).

İzolasyon ve etken madde bulma ile alakalı tıbbi mantarlardan elde edilen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri hakkında çok az şey biliniyor olmasından dolayı makromantar türlerinden biri olan ve bizimde çalışmış olduğumuz *Pholiota adiposa*'dan bir lektin izole edilmiş. İzolasyon sonucu amino asit dizisinin diğer Agaricales lektinlerinin dizilerine çok az benzerlik göstermiştir. Lektinin hemaglutinleştirici aktivitesinin belirlenmesi için 50 ° C'ye kadar olan sıcaklıklarda ve NaOH'ın 25 mM'dan daha düşük konsantrasyonlu HCl çözeltileri inülin ile inhibe edilmiştir. Lektinhepatoma, Hep G2 hücreleri ve meme kanseri MCF7 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite göstermiştir (Zhang, 2009). Bizim çalışmış olduğumuz makromantar türü olan *Pholiota adiposa*'dan lektin izole edilerek etkilerinin araştırılmasını önermekteyiz.

Çalışmamızda yenilebilir mantar türü olan *Ramaria flava*'nın antikanser ve sitotoksik etkisi araştırıldı. *R. flava* etanol ekstraktının (EE) test edilen üç tümör hücre hattında IC50 değeri 66.54 µg / mL olan tümör hücresi MDA-MB-231'e karşı en güçlü inhibitör etkinliği gösterdiğini ve inhibisyon yüzdesinin 200 ug/mL konsantrasyonda %71.66 olduğunu göstermiştir. Su fraksiyonu, düşük IC50 değerleri 5.86 ve 18.08 µg / mL olan yüksek DPPH ve OH radikal temizleyici faaliyetler sergilemiş. Bu sonuçlar *R. flava*'nın insan sağlığı için iyi bir antikanserejen kaynağı olduğubildirilmiştir (Author, 2013). *Ramaria flava*, *Agrocybe molesta*, *Volvopluteus gloiocephalus*, *Lactarius deliciosus*, *Bovista plumbea*'nın farklı ekstraktlarının antioksidan, antibakteriyel ve antikanser özelliklere sahip olduğunu ve ümit verici bir tedavi edici kaynağı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Gursoy, 2010). Çeşitli makromantar türlerinin antikanser aktivitesi üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda da görüldüğü gibi değişik çözücülerde hazırlanan ekstrelerin farklı hücre hatlarıüzerine farklı etkiler oluşturduğu bizim çalışmamızda da görülmüştür. Etken maddelerin tesbitiyle yapılan çalışmalarda kullanılan konsantrasyondüşmekte ve sitotoksik etki azalmaktadır. Bunun sonucu olarak etken maddenin sağlıklı hücreler üzerine olan olumsuz etkisi azalmaktadır. Bu yüzden ekstrelerdeki etken maddelerin izolasyonu ile ilgili çalışmaların da yapılmasını önermekteyiz.

## 6.KAYNAKLAR

- Ahmed, Y., Jennifer S., Fang-Sheng W., Hussien El S., Fathy H., ve Mahmoud E., 2004. Cytotoxic Activity of Edible Mushrooms Extracts Against Tumor Cell Lines International Journal of Science and Technology.(3-11),736-738.
- Ajith, T.A., Janardhanan K. K., 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. Journal of Ethnopharmacology 84 (2-3): 157-162.
- Alexander, L. W., 1999. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review), 10 (1615): 1-30.
- Anonymus 2019a.American Brain Tumor Association (ABTA), Causes and Risk Factors. info@abta.org., 4, 18–20.
- Andrei M., 2018.Chemical Composition and Bioactive Properties of the Wild Mushroom *Polyporus squamosus*. 9, 160-170.
- Anonymus, 2014. <http://www.rcdrg.sgul.ac.uk/research/cell-apoptosis/apoptosis>, (28.07.2019)
- Anonymus, 2019. American Type of Cell Culture (ATCC), <http://www.atcc.org>, (28.07.2019)
- Antonyuk, V. O., ve Klyuchivska, O. Y., 2010. Cytotoxic Proteins of *Amanita virosa* Secr. Mushroom: Purification Characteristics and Action Towards Mammalian Cells Toxicon, 55 (7): 1297-1305.
- Author, L., 2013.A New Data Set of Educational Attainment in the World,104, 184-198.
- Avendaño, C., Menéndez, J. C., 2008. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier B.V.Elseer. Tokyo
- Avrameas S. Porstmann T, Ternynck T., 1985. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods 82(1); 169-79.
- Baykara, O., 2016.Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Current Modalities In Treatment of Cancer. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(1): 45-57.
- Bhoolab, K., 2003. Mechanisms of the Anticancer Action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.: A New Understanding,180-185.
- Cheng, C. R., Yue, Q. X., 2010. Cytotoxic Triterpenoids From *Ganoderma lucidum*, Phytochemistry, 71 (13):1579-1585.
- Chihara, G., Hamuro, J., 1970. Fractionation and Purification of the Polysaccharides With Marked Antitumor Activity Especially Lentinan From *Lentinus Edodes* Sing, 30 (11); 2776-2781.
- Chung, Mi J., Chung, C-K., Jeong, Y. and SheHam S., 2010.Nutrition Research and Anticancer Activity of Subfractions Containing Pure Compounds of Chaga Mushroom (*Inonotus obliquus*) Extract in Human Cancer Cells and in Balbc/c Mice Bearin Sarcoma-180 Cells Practice (Nutr Res Pract); 4 (3): 177-182.
- Croce, C.M., 2008. Oncogenes and Cancer, N. Engl. J. Med., 385; 503-511.
- Decker, T. ve Lohmann-Matthes, M.-L., 1988. A Quick and Simple Method for the Quantitation of Lactate Dehydrogenase Release in Measurements of Cellular Cytotoxicity and Tumor Necrosis Factor (TNF) Activity, J. Immun Meth, 15, 61-69.
- Diaa E. P. Rizk., Peter K. Sand, Gabriel, N., 2009. Schaeran International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS)Joint Report on the Terminology For Female Pelvic Floor Dysfunction. Standardization and Terminology Committees ICS.10.1002. Nau. 2079.
- Edible, W., 2010. Mushrooms From Turkey as Possible Anticancer Agents on HepG2 Cells Together with Their Antioxidant and Antimicrobial Properties, Int J Med Mushrooms, 7 (3); 385-386.

- Elgorashi, E., 2003. Screening of Medicinal Plants Used in South African Traditional Medicine for Genotoxic Effects. *Toxicol. Lett.* 143; 195–207.
- Gong, J., Traganos, F. ve Darzynkiewicz, Z., 1994. A Selective Procedure for DNA Extraction From Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. *Anal. Biochem.* 218 (2): 9-314.
- GQ, Zhang, I., Sun, J., Wang, HX, Ng ve TB. A., 2009. Novel Lectin With Antiproliferative Activity From The Medicinal Mushroom *Pholiota adiposa*. 56(3):415-21.
- Gursoy, N., Sarikürkcü, C., Tepe, B., 2010. Evaluation of Antioxidant Activities Of 3 Edible Mushrooms: *Ramaria Flava* (Schaeff.: Fr.) Quéf., *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries., And *Russula delica* Fr. 18.(3 ): 691–696.
- Harhaji, L., Mijatovic, S., 2008. Anti-Tumor Effect of *Coriolus Versicolor* Methanol Extract Against Mouse B16 Melanoma Cells: In Vitro and In Vivo Study, *Food Chem Toxicol*, 46 (5): 1825-1833.
- Hsieh, T-L., 2002. Inhibitory Effect of Some Selected Nutraceutical Herbs on LDL Glycation Induced by Glucose and Glyoxal, 102 ( 3): 357-363.
- Hua, D.D., Zhangb, R.Y. Zhanga, G.Q., Wanga, H.X., 2011. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea*. *Phytomedicine* 18; 374–379.
- Israilides, C., Kletsas, D., 2008. In Vitro Cytostatic and Immunomodulatory Properties of the Medicinal Mushroom *Lentinula edodes*, *Phytomedicine*, 15 (6-7): 512.
- Kaufmann, S. H. ve Earnshaw, W. C., 2000. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy, *Exp Cell Res*, 256 (1): 42-49.
- Kaufmann, S. H. ve Hengartner, M. O., 2001. Programmed Cell Death: Alive and Well in the New Millennium, *Trends Cell Biol*, 11 (12): 526-534.
- Khan, Md. Asaduzzaman; Tania, Mousumi; Zhang, Dianzheng; and Chen, Hanchun, "Cordyceps Mushroom: a Potent Anticancer Nutraceutical" 2010. PCOM Scholarly Papers. Paper 373.
- Kheong, N., 2004. A Domain-Based Reference Model for the Conceptualization of Factory Loading Allocation Problems in Multi-Site Manufacturing Supply Chains, 24 (8): 631-642.
- Kidd, P. M., 2000. The use of Mushroom Glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment, *Altern Med Rev*, 5 (1): 4-27.
- Kwon, H. J., Y. K. Hong, 2006. Methanolic Extract of *Pterocarpus Mantalinus* Induces Apoptosis in HeLa Cells, *J Ethnopharmacol*, 105 (1-2): 229-234.
- Lau, C. B. S., YHo, C., FKim, C., NLeung, K. , PFung, K., FTse, T., LChan, H. H., SChow, M.S., 2004. Cytotoxic Activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) Extract on Human Leukemia and Lymphoma Cells by Induction of Apoptosis, *Life Sciences* 75 (7): 797-808.
- Lee, M. L., Tan, N. H., 2012. The Antiproliferative Activity of *Sclerotia* of *Lignosus rhinocerus* (Tiger Milk Mushroom), *Evid Based Complement Alternat Med*, 603-697.
- Lentini, E., Kozarski, M., 2012. Antioxidative and Chemical Characterization of Polysaccharide *Gonederma lucidium*, *Lentinus edodes*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 144-153.
- Leo, J. L. D., Van G., 2012. Antioxidative Activities and Chemical Characterization of Polysaccharide Extracts. 148-160.
- Liska, D.J., 1998. *Alternative Medicine Review*, 3; 187–198.
- Liu, E.T., 2004. Oncogenes and Suppressor Genes: Genetic Control of Cancer. In: Goldman, L., Ausiello, D., eds. 191-198.

- Liu, Q., Wang, H., 2006. First Report of a Xylose-Specific Lectin With Potent Hemagglutinating Antiproliferative and Anti-Mitogenic Activities From a Wild Ascomycete Mushroom, *Biochim Biophys Acta*, 1760 (12): 1914-1919.
- Liu, K. J, Junli, W. Qian. 2013. Anticancer, Antioxidant And Antibiotic Activities of Mushroom *Ramaria Flava*. In *Food And Chemical Toxicology. An International Journal Published For The British Industrial Biological Research Association*. 16(4): 327-337 .
- Liuab, K., 2013. Anticancer Antioxidant and Antibiotic Activities of Mushroom *Ramaria flava*, 375-380.
- Lu, X ., Ma, L., Chen, H, Dong, P. 2013. Anti-Inflammatory And Anticancer Activities of Extracts And Compounds From The Mushroom *Inonotus Obliquus*. *Food Chemistry*. 503–508.
- Maja, K, A., Anita, K, A., Miomir Nikšić A, Miroslav M. Vrvic B, Nina Todorovic C, Dragica Jakovljevic C, Mossmann, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay of Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J. Immun Method*, 65; 55-63.
- Marzoli, A., P, Renne., R, Enzo., M, Piccirillo., M, Ernesto., A, D-M. ve Giuliano, B., 1999. Extensive 200-Million-Year-Old Continental Flood Basalts of the Central Atlantic Magmatic Province, *Science*. 616-618.
- Masuda, Y., A. Matsumoto., 2009. Characterization and Antitumor Effect of a Novel Polysaccharide From *Grifola Frondosa*, *J Agric Food Chem*, 57 (21):10143- 10149.
- Mattila, P., Konko, K., Euroala M., Pihlava, JM., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M. ve Piironen V., 2001. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms, ( 49): 2343-2348.
- Min, R., Sahara, Meselhy., E, Meselhy., N, Nakamura., Yasuhiro, T. ve Maso, H., 1998. Anti-HIV-1 And Anti-HIV-1 Protease Substances From *Ganoderma lucidum*. 49 (6): 1651-1657.
- Moradali, M. F., H. Mostafavi, 2007. Immunomodulating and Anticancer Agents in the Realm of Macromycetes Fungi (Macrofungi), *Int Immunopharmacol*, 7 (6):701-724.
- Mosmann, Tim (December 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.", *Journal of Immunological Methods*. 65 (1–2): 55–63.
- Muller, C. I., T. Kumagai., 2006. *Ganoderma lucidum* Causes Apoptosis in Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma Cells, *Leuk Res*, 30 (7): 841-848.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell., 2004. K.W. Harper'in *Biyokimyası. Nobel Tıp Kitapevleri*, 780-787, İstanbul.
- Ngai, Ng., 2004. A domain-based reference model for the conceptualization of factory loading allocation problems in multi-site manufacturing supply chains, Volume 24, Issue 8, August Pages 631-642.
- Park, B. T., Na, K. H., 2009. Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *Cordyceps Militaris*, *Korean J Physiol Pharmacol*, 13 (1):49-54.
- Patrick, H. K., Ngai and T. B. Nga., 2004. Mushroom (*Ganoderma capense*) Lectin With Spectacular Thermostability, Potent Mitogenic Activity on Splenocytes, and Antiproliferative Activity Toward Tumor Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 988–993.
- Plass, C., 2002. Cancer Epigenomics, *Hum. Mol. Genet.*, 11; 2479-2488.
- Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S., 1985. Quantitation of 5-Bromo-2-Deoxyuridine Incorporation Into DNA: An Enzyme Immunoassay for the Assessment of the Lymphoid Cell Proliferative Response. *J Immunol Methods* 82 (1): 169-79.

- Ren, Lu., a Perera , C., and Hema, Y., 2012. Antitumor Activity of Mushroom Polysaccharides: A Review.
- Reshetnikov . P., Tan, Sergey. V., 2001. Higher Basidiomycota as a Source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides, *IntJMedMushr.* 80 (34): 1615.
- Roche, V. F., 2002. Cancer and Chemotherapy., In: Williams D.A., Lemke T., eds. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins, Chapter 42; 10451-10469.
- Rosenberg, S. A., 2005. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 7th Ed. Baltimore: Lippincott Williams &Wilkins, (11); 390–416.
- Rowinsky, E.K., Tolcher, A.W., 2005. Antimicrotubule Agents. In: DeVita V.T., Jr, Hellman, 17667-17671.
- Sadi, G, Kocabaş, A., İrtem, K., Deniz, E., Buğrahan; Alpay, A., 2016. Wild Edible Mushrooms from Turkey as Possible Anticancer Agents on HepG2 Cells Together with Their Antioxidant and Antimicrobial, Properties, 83-95.
- Scherer Rosen. N., 1953. Anticancer Potential of Azurin Interaction With Lipid Rafts: Deciphering the Role of Caveolae, <http://hdl.handle.net/10451/24661> (25/08/2019).
- Sezgin, İ., 1998. Klinik Genetik., C.Ü. Yayınları, 70, 216-217, Sivas,
- Shen, J., Tanida, M., 2009. Effect of the Culture Extract of *Lentinus Edodes* Mycelia on Splenic Sympathetic Activity and Cancer Cell Proliferation, *Auton Neurosci*, 145 (1-2): 50-54.
- Shieh, J. M., Suen, S-C., Tsai, K, C., 2001. Kou-Chiang Tsai and Bau-Characteristics of Fluorinated Amorphous Carbon Films and Implementation of 0.15 µm Cu/a-C:FCu/a-C:F Damascene Interconnection. Published Online, 10.1002. sfa.5560
- Silva, S., Martins, S., 2012. Production Purification and Characterisation of Polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with Antitumour Activity, *J Sci Food Agric.* 10.1116.jsfa.136268
- Sithranga B, N., Kathiresan, K., 2010. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview, *J. Oncol.* 10, 1–18.
- Sullivan, R., Smith, J.E. ve Rowan, N.J., 2006. Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: Translating a Traditional Practice into Western Micine, *Perspectives in Biology and Medicine*, 49 (2), 159-170.
- Sung Hak Lee, Hwang, H.S., Yun, J.W., 2009. Antitumor Activity of Water Extract of a Mushroom, *Inonotus Obliquus* Against HT-29 Human Colon Cancer Cells *Phyther*, 23; 1784–1789.
- Tateno, H. ve I. J. Goldstein., 2003. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Novel Hemolytic Lectins From the Mushroom *Laetiporus Sulphureus* Which Show Homology to Bacterial Toxins, *J Biol Chem*, 278 (42): 40455-40463.
- Thurston, D.E., 2007. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs, CRC Press, 11-27,
- Wang, H. X., 2007. Isolation and Characterization of a Novel Thermostable Lectin From the Wild Edible Mushroom *Agaricus arvensis* <https://doi.org/10.1002/jobm.201000267> (27/08/2019).
- Wang, H.X. ve Kheong, N., 2006. Purification of a Laccase From Fruiting Bodies of the Mushroom *Pleurotus eryngii* *January*, 69 (5): 521–525.
- Wasser, S., P. ve A. L. Weis., 1999. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective, *Crit Rev Immunol*, 19(1), 65-96.
- Wasser, S. P., 2002. Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60 (3): 258- 274.

- Wasser, S. P., 1999. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushroom*. 10(30):31-62.
- Weaver, R.F., P.W. Hedrick., 1997. Genes and Cancer, *Advances in Cancer Reseach*. 482-503.
- Whaiti, S., Bhutia, K.S., 2008. Antiproliferative and Immunostimulatory Protein Fraction From Edible Mushrooms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26; 187–191.
- Wu, J. Y., Chen, C. H., 2011. Anti-Cancer Effects of Protein Extracts from *Calvatialilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*, 982368.
- Xu J., Zhou, H. Yan, X., Zhou, C., Zhu P., 2012. Bin Ma Effect of Unialgal Diets on the Composition of Fatty Acids and Sterols in Juvenile Ark Shell *Tegillarca granosa* Linnaeus. *J. Agric. Food Chem*. 66(18): 4592-4601.
- Zhang, M., Cui, S. W., 2007. Antitumor Polysaccharides From Mushrooms: a Review on Their Isolation Process Structural Characteristics and Antitumor Activity, *Trends Food Sci*. 18 (1): 4-19.
- Zhao, G., Lu.C, Cheng. S., 2005. Effect of characteristics of calcium-based sorbents on the sulfation kinetics 84 (14–15): 1933-1939.

## 6.ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Murat

**Soyadı** : ŞEBİN

**D. Yeri** : Karayazı / Erzurum

**D. Tarihi** : 06.06.1977

**Lisans** : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü  
(Isparta/2000).

**Yüksek Lisans** :Gaziosmanpaşa Üniverstesı Fen Bilimleri Enstitüsü (Tokat/2012).

**Yabancı Dil** :İngilizce.

**Medeni Hali** :Evli 2 Çocuk babası.