



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRICHOLOMA ANATOLICUM H.H.DOĞAN & İNTİNİ'UN HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE H_2O_2 KAYNAKLI HASARA KARŞI HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİN BELİRLENMESİ

Deniz ÖZKAYA

YÜKSEK LİSANS

Biyoloji Anabilim Dalını

Aralık-2015
KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmzaDeniz ÖZKAYA

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

TRICHOLOMA ANATOLICUM H.H.DOĞAN & İNTİNİ'UN HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE H_2O_2 KAYNAKLI HASARA KARŞI HEPATOPROTEKTİF ETKİLERİN BELİRLENMESİ

Deniz ÖZKAYA

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Hüseyin DOĞAN
Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

2015, 80 Sayfa

Jüri
Danışman: Prof. Dr. H. Hüseyin DOĞAN
Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI
Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL

Yüzyıllar boyunca insanlar mantarları besin olarak tüketirken aynı zamanda hastalıkların tedavilerinde de kullanmaktadırlar. Makrofunguslar 21. yüzyılda birçok interdisipliner alanda farklı araştırmalara kaynak olmakta ve tedavi amaçlı çalışmalar için kullanılmaktadır. Yenen ve yenmeyen mantar türlerinin birçoğu önemli tıbbi çalışmalarda kullanılarak elde edilen etkileri, hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de endemik bir mantar türü olan *Tricholoma anatolicum* un HEPG2 karaciğer kanser hücre hattı üzerinde hidrojen peroksit(H_2O_2) kaynaklı oluşturulan oksidatif strese karşı hepatoprotektif etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada *Tricholoma anatolicum* ultrasonikasyon ve fraksiyon yöntemleri sonucunda ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların HEPG2 karaciğer kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılıp hepatoprotektif etkileri belirlenmiştir. *Tricholoma anatolicum* sulu ekstraktının(EHTA) farklı konsantrasyonları 24-48-72 saat HEPG2 hücrelerinin hücresel morfolojilerine ve yaşam döngüsüne etkileri TBE (Trifan boyası dışlama), XTT ve gerçek zamanlı hücre analizi (Xcelligence cihazıyla) yöntemleriyle belirlenmiştir. EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerindeki TBE hücre canlılığı analizinde, 1-5 µg/ml konsantrasyonlarının hücrede koruyucu etki gösterdiğini ancak artan konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. XTT sitotoksisite analizine göre EHTA ekstraktının 24 saat IC_{50} değeri > 2000 µg/ml, 72 saat IC_{50} değeri 1525 µg/ml olarak belirlenmiştir. Xcelligence cihazında yapılan gerçek zamanlı hücre analizinde EHTA ekstraktının 24 saat IC_{50} değeri 241,539 µg/ml, 48 saat IC_{50} değeri 418,135 µg/ml ve 72 saat IC_{50} değeri 285,694 µg/ml olarak belirlenmiştir. EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerinde hücre yolağı (apoptoz ve nekroz) etkileri Annexin-V-apc ve 7AAD floresan boyaları yardımıyla akım sitometri yöntemiyle (flow sitometri) belirlenmiştir. EHTA ekstraktının artan konsantrasyonlarda HEPG2 hücrelerini apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir. Son olarak EHTA ekstraktında bulunan fenolik bileşikler DPPH metodu ve yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre DPPH metodu analizinde EHTA ekstraktı 25.000 µg/ml iken, FHTA ve FETA ekstraktları > 25.000 µg/ml olarak belirlenmiştir. HPLC analizinde 100 g numunede 100 mg referans noktasına göre EHTA ekstraktında kateşin ve vanilik asit pik vermiş, FHTA ekstraktında kateşin pik vermiş ve FETA ekstraktı ise pik vermemiştir. Araştırma sonuçlarına göre *T. anatolicum* mantarının düşük dozlarda HEPG2 hücreleri üzerinde sitostatik etkisi, yüksek dozlarda ise sitotoksik etkisi belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoprotektif etki, *T. anatolicum*, HEPG2, H_2O_2.

ABSTRACT

MS THESIS

HEPATOPROTECTIVE EFFECTS AGAINST H_2O_2-INDUCED DAMAGE IN HEPG2 CELLS OF *TRICHOLOMA ANATOLICUM* H.H.DOĞAN & İNTİNİ

Deniz ÖZKAYA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF BIOLOGY

Advisor Prof. Dr. H. Hüseyin DOĞAN
Co-Advisor: Assist. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

2015, 80 Pages

Jury
Advisor Prof. Dr. H. Hüseyin DOĞAN
Co-Advisor: Assist. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI
Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS
Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL

People have been using mushrooms in the treatment of diseases as well as food, for centuries. In the 21st century, macrofungi is used in various interdisciplinary fields as a source for researches including therapeutic based researches. Most of the edible and inedible mushroom species were used in important medical studies and their effects were begun to be used in the treatment of diseases. This study focuses on the hepatoprotective effects of *Tricholoma anatolicum*, which is endemic specie in Turkey, against oxidative stress based on hydrogen peroxide (H_2O_2) on HEPG2 liver cancer cell line.

T. anatolicum used in this study was extracted with the help of ultrasonication and fraction methods. Then the cytotoxic effects of extracts on HEPG2 liver cancer cell line were explored and their hepatoprotective effects were determined. Moreover, various concentrations of aqueous extract (EHTA) of *T. anatolicum* were determined by HEPG2 cells's 24-48-72 hours effect analysis on their cellular morphology and life cycle, TBE (Triphan Blue Exclusion), XTT and real-time cell analysis in of Xcelligence device.

Within the EHTA extract's TBE cell viability analysis on HEPG2 cells, it was determined that 1-5µg/ml concentrations were to show protective effect in the cell, while there found to be cytotoxic effect in increasing concentrations. According to XTT cytotoxicity analysis, the EHTA extract values were determined as follows: 24h IC_{50} > 2000 µg/ml, 72 hours IC_{50}. Furthermore, according to the real-time cell analysis made with Xcelligence device, EHTA extracts were found to be; 24h IC_{50} = 241.539µg/ml, 48 h IC_{50} = 418.135µg/ml, 72 h IC_{50} = 285.694µg/ml. EHTA extract's cell pathway (apoptosis and necrosis) effects on HEPG2 cells were determined with flow cytometry method with the help of Annexin V-APC and 7AAD fluorescent dye. Increasing concentrations of EHTA extracts were determined to direct HEPG2 cells to apoptosis. Finally, the phenolic compounds found in EHTA extracts were determined with the help of DPPH and high performance liquid chromatography (HPLC) methods.

According to the results of the analysis, while EHTA extract was determined to be 25,000µg/ml in DPPH method analysis, FHTA and FETA extracts were found to be > 25,000µg/ ml. Moreover, considering the HPLC analysis –according to the reference point of 100mg in 100g sample– within EHTA extracts, catechins and vanillic acid peaked, within FHTA extracts catechins peaked and there was no peak within FETA extracts. The final results revealed that *T.anatolicum*'s effect on HEPG2 was cytostatic at low doses, and cytotoxic at high doses.

Keywords: Hepatoprotective effect, *T. anatolicum,* HEPG2, H_2O_2 .

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hasan Hüseyin Doğan' a, çalışmalarıma yön veren, tecrübelerinden, bilgilerinden, sevgisinden, desteğinden ve sabrından dolayı yardımcı danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI' ya, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca destekleri ve motivasyonu için bölüm arkadaşım Çiğdem Şenkeleş'e, destek ve iyi enerjilerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Eylül Barış Paksoy' a, Tuğbanur Ergür' e, Sümeyra Bozkurt Eski ve Mert Eski' e, Zeynep Sarıca' a, İmren Saylam'a, Aybike Güneş'e, kuzenim Ozan Öğretici'e, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde çalışma ortamı yaratan sayın hocalarıma, bu zorlu süreçte beni destekleri ve güvenleriyle başarabilmeme inandıran tüm sevgili arkadaşlarıma, flow sitomtri analizi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Ayça Ceylan'a, misafirperverliğinden dolayı arkadaşım Özge Akay'a, hayata birlikte gözlerimi açtığım diğer yarım Gizay Özkaya'a, beni hayata hazırlayan yürekli abim O. Onur Özkaya'a, yüreğime dokunan güzel ablam Ö. Miraç Özkaya'a, yaşam sevinci veren can yiğenim Doruk Özkaya'a, bu yaşıma kadar benden şevkatlerini, desteklerini, güvenlerini ve en önemlisi sevgilerini esirgemeyen iyi kalpli annem Aynur Özkaya ve güçlü babam Cengiz Özkaya'a ve tüm güzel yürekli aileme içtenlikle sonsuz teşekkürler ederim.

Deniz ÖZKAYA
KONYA-2015

Canım Abim

Osman Onur ÖZKAYA' a.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT v
ÖNSÖZ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Genel Bilgiler 4
1.1.1. Radikaller 4
1.1.1.1. Biyolojide Serbest Radikaller 7
1.1.2. Serbest Radikaller ve Tanımlanmış ROS 8
1.1.2.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar 10
1.1.3. Reaktif Oksijen Türlerine (ROS) Karşı Savunma 12
1.1.3.1. Antioksidanlar (Yükseltgeme Önleyiciler) 12
1.1.3.1.1. Antioksidan Türleri 12
1.1.3.2. Antioksidan Savunma 13
1.1.4. Mantarlar 15
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 20
3. MATERYAL VE YÖNTEM 25
3.1. *Tricholoma anatolicum*' un Toplanması ve Lokasyonu 25
3.2. *Tricholoma anatolicum*' un Tanımı 25
3.3. *Tricholoma anatolicum'* un Ekstraksiyonu 26
3.3.1. *Tricholoma anatolicum'* un Ultra Saf Su İle Ekstraktının Hazırlanması 26
3.3.2. *Tricholoma anatolicum*' un Fraksiyonu 27
3.3.3. *T. anatolicum'* un Metanol Ekstraktının Evaporatör ile Uçurulması 29
3.3.4. *T. anatolicum'un*Ekstraktının Liyofilizasyonu 30
3.4. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktında Fenolik Bileşiklerin HPLC (High Performance Liquid Chromotography) İle Belirlenmesi 30
3.5. Antioksidan Aktivite Tayini 31
3.5.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)Metodu 31
3.6. Hücre Hattı ve Kültür Ortamı 32
3.7. HEPG2 Hücre Hattının *T. anatolicum* Ekstraktı ile Muamelesi 33
3.8. HEPG2 Hücre Hattının Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile Muamelesi 34
3.9. Sitotoksisite Testleri, IC_{50} Belirlenmesi 34
3.10. TBE (Mavi Trifan Boyasının Dışlanması) Method ile Hücre Sayımı 35
3.11. FLOW Sitometri Yöntemi ile Hücre Canlılığı Analizi 36
3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama 37
3.12.1. Xcellingence Sistem Gerçek Zamanlı Hücre Analizi 37
3.13. İstatistiksel Analiz 38
4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 39
4.1. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktı Üzerine Yapılan Analizler 39
4.2. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktının Fenolik Bileşiklerin Miktarları 39
4.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini 42
4.4. Sitotoksisite Test Sonuçları, IC_{50} Değerleri 43
4.4.1. TBE (Mavi Trifan Boyasının Dışlanması)Metodunun Sonuçları 43
4.4.2. XTT Metodunun Sonuçları 48
4.5. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sonuçları 50
4.5.1. Xcellingence Sistem Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sonuçları 50
4.6. FLOW Sitometri Yöntemi ile Hücre Canlılığı Analizi Sonuçları 52
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 55

5.1 Sonuçlar 55
5.2 Öneriler 58
KAYNAKLAR 59
Aruoma, O.I., 1996, Characterisation of drugs as antioxidant prophlactics,*Free Radical Biology & Medicine*, 20, 675-705. 59
Blomhoff, R., 2005, Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Current Opinion in Lipidology*, 16, 47-54. 60
Bobek P.,1991, Cholesterol-lowering effect of the mushroom Pleurotus ostreatus in hereditary hypercholesterolemic rats, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35(4):191-5... 60
Breene, W.M., 1990, Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms, *Journal of Food Protection*, 53, 883-894. 60
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$CBrCl_3$	: Bromotriklorometan
CCl_4	: Karbontetraklorür
$C_{19}H_{16}O$	: Trifenilmetanol
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat
CO_2	: Karbondioksit
dk	: Dakika
EtOAc	: Etil asetat
gr	: Gram
H_2O	: Su
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
MetOH	: Metanol
NAD^+	: Nikotinamit adenin dinükleotit
$^1O_2$	: Tekli oksijen
$\cdot O_2$	: Süperoksit anyonu
O_2	: Süperoksit radikali
·OH	: Hidroksi radikali
ROO·	: Peroksi radikali
RO·	: Alkoksi radikali
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı(Revolution per minute)
v/v	: Hacimce yüzde

Kısaltmalar

ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
A vitamini	: Retinol
CAT	: Katalaz
C vitamini	: Askorbik asit
CI	: Hücre endeksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EHTA	: *T. anatolicum* sulu ekstraksiyon ekstraktı
EC_{50}	: % 50 etkili konsantrasyon

E vitamini	: Tokoferol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	: Fötal dana serumu (fetal bovine serum)
FETA	: *T. anatolicum* etil asetatlı fraksiyon ekstraktı
FHTA	: *T. anatolicum* sulu fraksiyon ekstraktı
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-transferaz
HEPG2	: hepatoselüler karsinom hücresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromotografisi
IC_{50}	: % 50 inhibe edici konsantrasyon
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Nötrofilik miyeloperoksidaz
M. Ö.	: Milattan önce
MTT	: Difeniltetrazolyum bromür
NADPH	: Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PSK	: Polisakkaropeptit krestin
PSP	: Polisakkaropeptit
P-450	: Sitokrom enzimi
PI	: Promidyum iyodür
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial enstitünde üretilen 1640 serili besiyeri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TA	: *Tricholoma anatolicum*
TBE	: Trifan mavi boya dışlaması(Tryphan Blue Exclusion)
TML-1	: *Tricholoma mongolicum* lektini
TML-2	: *Tricholoma mongolicum* lektini
U. V.	: Ultraviyole ışını
XOD	: Ksantin oksidaz
XTT	: Tetrazolium hidroksit

1. GİRİŞ

Biyolojik organizmalarda serbest radikallerin oluşumu ve ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisindedir. Oksidatif denge sağlandığı sürece biyolojik organizmalar serbest radikallerden etkilenmemektedir. Ancak serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasında ciddi bir dengesizlik meydana gelmesi sonucunda oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres, hücrelerin DNA veya hücre membranı gibi bileşenleri ile serbest radikaller veya karsinojenlerin reaksiyona girmesi sonucunda tahrip olmuş hücrelerin durumunu tanımlayan genel bir terimdir. Oksidatif strese maruz kalan hücrelerde, hücresel hasar, savunma sistemi indüksiyonu, DNA hasarı ve kontrollü hücre ölümü (Apoptozis) gibi fizyolojik değişimler meydana gelmektedir. Ayrıca oksidatif stres sonucunda iltihap, ateroskleroz, iskemi/reperfüzyon hasarı, yaşlanma ve kanser gibi patolojik rahatsızlıklar meydana gelmektedir. Doğal yollardan aldığımız besinlerde bulunan, antioksidan ve antikanser özelliğe sahip olan maddeler bazı bileşiklerin etkilerini nötralize ederek oksidatif stres sonucunda meydana gelen patolojik rahatsızlıklar gibi toplumda erken ölümlerin başlıca nedeni olan hastalıkları önlemekte veya geciktirmektedir.

Son yıllarda bu hastalıkları önlemek için tıbbi tedavinin yanı sıra çeşitli doğal kaynaklara olan eğilim gittikçe artmaktadır. Kullanılan kaynaklardan biri de mantarlardır. Dünya'da 100.000 civarında mantar türü belirlenmiştir. Belirlenen türlerden 24.000 civarını makroskobik mantarlar oluşturuken bunların yaklaşık %50'si çeşitli yenilebilirlik özelliğine sahiptir. Yaklaşık 700 türün ise önemli farmakolojik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Eski çağlardan beri mantarlar gıda olarak kullanımının yanında tıbbi amaçla da insanoğlu tarafından değerlendirilmiştir. Yapılarında bulunan biyoaktif maddeler sayesinde başta antikanser olmak üzere bağışıklık sistemini düzenleyici, antioksidan, antiviral, antibiyotik gibi farklı tıbbi etkilere sahiptirler. Bu nedenle çeşitli ülkelerde özellikle Asya ülkelerinde alternatif yöntem olarak mantar kökenli preparatlar kullanılmaktadır. Mantarların büyük bir kısmı güçlü farmasötik ürünlere dönüştürülerek bazı hastalıkların tedavisi için önemli bir kaynak oluşturmakta ve tedavilerde olumlu sonuçlar vermeye devam etmektedir.

Bu çalışmada mantar ekstraktı kullanarak, oksidatif strese maruz kalan karaciğer kanser hücrelerinde meydana gelen hasarın engellenmesi ve hasarlı hücrelerin onarılması amaçlanmaktadır. Aynı zamanda da mantar ekstraktının hepatoprotektif etkilerinin belirlenmesi ile karaciğer kanser tedavisine yardımcı olabileceği

düşünülmektedir. Elde edilecek veriler bilime ve alternatif tıbba oldukça önemli katkılarda bulunacaktır.

Eski çağlardan beri varlığı bilinen mantarların besleyici değerlerinin yanında, uzun yıllardır dünyanın birçok ülkesinde tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır. Ayrıca, pek çok yenilemeyen ve zehirli mantar türlerinin de önemli tıbbi özellikleri olduğu saptanmıştır. Kültür koşullarında mantar üretme olanaklarının gelişmesi ile birlikte mantarların çeşitli hastalıklara karşı kullanımının da yaygınlaştığı gözlenmektedir. Mantarlar doğu kültüründe, kendilerine has kokuları ve yumuşak yapıları nedeniyle uzun yıllardır çay şeklinde ve besleyici gıda olarak kullanılmaktadır. Tatlı ve besleyici bir gıda olarak değerlendirilen birçok yabani mantar türü, dünya genelinde farklı milletler tarafından düzenli bir şekilde toplanıp direkt ana besin kaynağı olarak tüketilmektedir. Mantarlar aynı zamanda ilaç yapımında da kullanılmaktadır. İlaç olarak kullanılan mantarlara; *Agaricus blazei* Murrill, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Lentinula edodes* (Berk.) *Pegler*, *Tremella mesenterica* Retz., *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Antrodia camphorata* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H. Wu, Ryvarden & T.T. Chang *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, *Morchella esculenta* (L.) Pers., *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang & W.N. Chou *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. gibi türler örnek verilebilir.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel terapilerin insan bağışıklık sistemi üzerinde yan etkileri bulunmaktadır. Kanser immünolojisi temel kanser araştırmalarında hızla büyüyen bir alandır. Kanser hücresinin vücudun bağışıklık sisteminden kaçmasını engelleyecek yollar aranmaktadır. Birçok tıbbi mantardan elde edilen ekstraktların en önemli özelliklerinden biri de immunomodülatör olarak fonksiyon görme yetenekleridir.

Hepatoprotektif (karaciğer hücre hasarını önleme) çalışmalarda; İn vitro ve in vivo olarak oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı oluşturabilmek için karbontetraklorür (CCl_4), etanol, dimetil-nitrozamin ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallar ile oksidatif stres için in vitro koşullarda karaciğer hücre modeli olarak HEPG2 gibi hücre hatları, in vivo koşullarda da hayvan deneyleri (fare, sıçan vs.) yapılmaktadır.

Mantarların hepatoprotektif etkisini gösterebilmek için bahsettiğimiz hücre hasar modellerinde çeşitli mantar ekstraktları (sulu ve alkol ekstratları vs.) kullanılmaktadır. Hepatoprotektif etkinin gösterilebilmesi için antioksidan savunma sisteminde bahsettiğimiz SOD, CAT, GPx gibi enzimlerin değerlerindeki değişimler biyokimyasal

yollarla değerlendirilmektedir. Örneğin; HEPG2 hücre hattında oksidatif stres kaynağı olarak kullanılan etanolün yaptığı hücre hasarının onarılmasında *Antrodia camphorata* (M. Zang & C.H. Su) Sheng H.Wu, Ryvarden & T.T.Chang'nın sulu ekstraktı kullanılmıştır. Bu mantarın oksidatif stres sonucunda artan AST, ALT, ALP ve bilirubin seviyelerini düşürdüğü görülmüştür (Lu ve ark., 2007). Aynı şekilde *Antrodia cinnamomea* T.T.Chang & W.N.Chou'nın etanolik ekstresinden elde edilen Anthraquinol maddesinin de AST, ALT, ROS, NO, MDA üretimini azalttığı gözlenmiştir (Ho ve ark., 2008). *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler'in sıcak su ve etanol ekstreleri hepatik hücre hasarının klasik marker seviyelerini düşürmüştür (Akamatsu ve ark., 2004). Sıçanlarda oluşabilecek hücre hasarına karşı önceden alınan *Agaricus blazei Murrill* ekstresi GST enziminin değerlerinde değişime neden olmuştur (Barbisan ve ark., 2002). *Cordyceps* spp. ekstraktlarının etkisi ise sıçanların antioksidan GSH kompanentini belirgin olarak etkileyip antioksidan savunma mekanizmasından CAT, GPx, GR ve SOD aktivitelerini artırdığı görülmüştür (Ko ve ark., 2010).

Literatür bilgilerine göre mantarlarda yoğun olarak bulunan polisakkaritler farklı hastalıklar üzerinde tıbbi öneme sahiptirler. Mantarlar halk arasında kullanılmakta ve aynı zamanda profesyonel olarak da ilaç endüstrisinde yer almaktadırlar. Bunları oluşturan bazı polisakkarit türleri; D-β(1→3)- glukan kompleksleri, heteroglukan, polisakkarit-protein kompleksi, galaktomannan, polisakkaropeptit krestin (PSK) sayabiliriz. *Pleurotus cornucopiae* (Paulet) Rolland ekstraktı hücre hattı üzerinde oksidatif stres kaynağı olarak CCl_4 (karbontetraklorür) sonucunda oluşan hücre hasarının onarılmasında kullanılmıştır. Hücre hasarını koruma etkisi histolojik ve elektron mikroskobu bulgularıyla kanıtlanmış ve ekstre içerisinde D-β-(1→3)-glukan, ergosterol, mannitol, fenolik bileşikler, linoleik asit, peptidler ve diğer karbohidratlar bulunmuştur (El Bohi ve ark., 2009). *Antrodia cinnamomae* ekstraktının etanolün oluşturduğu hücre membranındaki sitotoksik ve apoptotik etkiyi azalttığı belirlenmiş ve aynı zamanda bu mantarda polisakkarit ve triterpenoidlerin oldukça fazla olduğu tesit edilmiştir (Ho ve ark., 2008). *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. sulu ve alkol ekstrelerinin akut karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmış ve etkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda mantarın sıcak su ekstresi de böbrek doku hasarına karşı koruyucu etki göstermiş ve bu etkiyi membran lipit peroksidasyonu ve serbest radikal oluşumunu azaltarak yapmıştır. Mantarın ekstrelerinde yüksek oranda antioksidan ve radikal süpürme özelliği de belirlenmiştir (Liu ve ark., 1979).

Anti kanser polisakkaridleri antibiyotiklere karşı direnç gösteren viral, bakteriyal, fungal ve protozoal enfeksiyonları önlemek için vücudun humoral bağışıklığını harekete geçirirler. Mantarlar tümör hücrelerinin üremesini önlemeye yarayan farklı içeriklere sahiptirler. Bazı önemli mantar türleri ve antikanser içerikleri aşağıdaki gibidir; AHCC (Active Hexose Correlated Compound) olarak bilinen "Lentinan" *Lentinula edodes* (Shiitake)'de (Chihara ve ark.,1970); PSK olarak adlandırılan polisakkaropeptid krestin *Coriolus versicolor*' da (Cui ve Chisti, 2003; βD-glukan, aktif heteroglukan ve protein kompleksleri *Ganoderma lucidum* (Reishi) da (Mizuno ve ark. 1984); PSP olarak adlandırılan polisakkaropeptid kompleksi *Tricholoma* sp' de (Mizuno ve ark. 1984), TML-1, TML-2 *Tricholoma mongolicum*' da (Wang ve ark., 1995); siklofosfamit *Agaricus blazei*' de (Delmanto ve ark., 2001) bulunmaktadır.

Yukarıda belirtilen aktif maddeler farklı kanser türleri üzerinde önemli etkilere sahiptirler. Çalışmada kullanacağımız *T. anatolicum*'da halk tarafından tanınan ve gıda olarak tüketilen bir tür olmasının yanında ekonomik değere de sahiptir. Ülkemizde endemik bir tür olduğu içinde ayrıca bir öneme sahiptir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek verilerin ileriki kanser araştırmalarına referans olması amaçlanmaktadır. Ayrıca *T. anatolicum*'un yalnızca gıda olarak tüketilmesi yerine, sağlık açısından da kullanılabilir özelliğinin ortaya çıkarılması ile ekonomik katma değerinin daha da artırılması oldukça önemlidir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Radikaller

Antioksidanların oluşum süreci, serbest radikallerle başlamaktadır. Serbest radikaller yüksek aktiviteye sahip olan; kirli havalarda, sigara dumanında (karbon monoksit, nikotin, katran, vs.), radyasyonda (ısınım), bitki koruma ilaçlarında (insektisitler, fungusitler, herbisitler, nematisitler, vs.), bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında bulunmaktadır. Vücut metabolizmasında yer alan serbest radikaller bulunması gereken orandan fazla olduğu zamanlarda, hücrelere saldırarak onları tahrip eder. Hücrelerde meydana gelen tahribatta öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşmakta ve kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlamaktadır (Floyd, 1990; Uğuzlar, 2009).

1900'lü yıllarda Gomberg'in trifenilmetanol ($C_{19}H_{16}O$) radikalinin varlığını ispatlamasıyla serbest radikallerle ilgili ilk çalışmalar başlamıştır (Gomberg, 1900). Serbest radikaller, bir orbitalde sadece bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal türlerdir. Radikallerin reaksiyona girme kabiliyetleri farklılık göstermesine rağmen, genellikle radikal olmayan türlere oranla daha az kararlıdırlar. En basit serbest radikal, bir proton ve bir elektron ihtiva eden hidrojen atomudur. Hemen her radikal türü, herhangi bir radikali veya molekülü farklı bir mekanizma ile etkileyebilir. Bu tür etkileşimlerin seçiciliği, radikallerin konsantrasyonuna, radikaldeki ortaklanmamış elektronların delokalizasyonuna ve radikallerin etkileştiği moleküllerinde bulunan zayıf bağlara bağlıdır. Birçok biyolojik molekülde, sadece ortaklanmış elektronlar içeren radikal olmayan türlerin kimyasal yapısı üzerine yoğun araştırmalar ve tartışmalar bulunmaktadır (Weiss, 1935; Waters, 1943; Hey, 1973; Cadoğan, 1973; Moad, 1995; Perkins, 1996; Uğuzlar, 2009). 1960'lı yılların başında süperoksit (O_2-) radikali, ksantin oksidaz dahil birçok enzim ile ilgisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 1968'de sellüler toksisiteye sebebiyet veren süperoksit radikalinin, çözeltilerde mevcut olduğu da bulundu (McCord, 1969; Michelson, 1977; Aruoma, 1993; Uguzlar, 2009). Toksikolojide, tıpta, biyolojide ve gıda ile farmasötik sanayinde serbest radikaller büyük bir ilgi alanına sahip olmaktadır. Lipit peroksidasyonunda serbest radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar, gıda endüstrisinde imalat süreçleri boyunca karşılaşılan en önemli sorunların başında gelir. İmalatçılar, lipit içeren gıdaların oksidasyonunu antioksidanları kullanarak yavaşlatmayı amaçlarlar. Bunun yanı sıra kliniklerde ve biyomedikal sektöründe de organizmayı, reaktif oksijen türleri tarafından meydana getirilen hasarın ortadan kaldırılmasında antioksidanlarla ilgilenmişlerdir (Frankel, 1980; Block, 1992; Aruoma, 1993, 1996; Papas, 1993; Duthie, 1996; Pezzuto, 1997; Uğuzlar, 2009).

Diğer bir deyişle serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümler içeren yapılardır. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere "oksidan moleküller'' veya reaktif oksijen türleri de denmektedir (Çavdar ve ark., 1997). Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle kolayca etkileşimde bulunarak oksidatif stres oluşumuna neden olurlar. Serbest radikaller hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış etkenlerle etkileşerek de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmalarda bulunan pro-oksidan ile antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde radikaller hasara yol açabilme özelliğine

sahiptir. Oluşan bu hasar yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, hipertansiyon ve kanser gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın oluşumunda belli bir oranda oksidatif stres ile bağlantısı olduğu kabul edilmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2004). Canlı organizmalarda serbest radikallerin olumsuz etkisinden korunmak için anti oksidatif korunma sistemi mevcuttur (Tunalıer ve ark., 2002).

Radyasyon, virüsler, ultraviole ışınları, sigara dumanı, enfeksiyonlar, stres, yağ metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasal maddeler, haşere kontrol ilaçları ve bunlar gibi daha birçok etken serbest radikal kaynağı olarak görülür. Serbest radikaller gıda maddelerinde bulunabilecekleri gibi, vücuttaki metabolik olaylar sonucunda da oluşabilmektedir. Strese bağlı olarak veya vücuttaki zararlı oluşumları etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi tarafından oluşturulan serbest radikaller vücut metabolizmasında bir denge halinde bulunurlar. Şayet serbest radikal üretimi fazla olur ve koruyucu etkiye sahip antioksidanlar yetersiz kalırsa vücuttaki serbest radikal-antioksidan dengesi bozularak hasar meydana gelir. Örneğin, serbest radikaller DNA moleküllerinin yapısını bozarak kansere sebep olabileceği gibi, pankreasta fazla birikimi sonucunda şeker hastalığına, gözde katarakta, kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarına da sebep olabilir. Oluşan fazla miktardaki serbest radikaller kronik yorgunluk ve bitkinlik gibi yan etkileri vardır. İnsan vücudunda serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar karşısında gıda takviyesi veya metabolik olaylar ile bazı tedbirler alınmaktadır. Bahsedilen maddelerin vücutta oluşturabileceği zararlı etkileri en aza indirilebilmesi için tedbirler alınabilir. Vücutta hasar oluşumuna sebep olabilecek olan zararlı maddelerin etkisinin engellenmesinde en etkili yollardan birisi de antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyici ya da oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliktedir (Baykal ve ark., 2002). Genellikle antioksidan polifenolik yapıda olup neredeyse sebzeler, meyveler gibi tüm bitkilerde, mantarlarda, mikroorganizmalarda ve hayvansal dokularda bulunmaktadır. Flavonoidler, tokoferoller, karotenoidler ve askorbik asit en önemli antioksidanlar içerişinde yer almaktadır (Yanishlieva, 2001; Hudson, 1990; Shahidi, 2000). Polifenolik yapıya sahip flavonoidler bitkilere büyük ölçüde renk veren maddeler ihtiva eder ve nerdeyse 4000 civarında flavonoid bileşiğinin kimyasal içeriği aydınlatılmıştır (Murray, 1996). Canlı sistemlerinde yer alan tüm fizyolojik oluşumlar; hormon, iz elementi ve enzimler gibi farklı ajanlar tarafından kontrol edilen oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının karmaşık kombinasyonlarını barındırır. Canlılardaki redoks dengesinde

oluşabilecek herhangi bir değişim, hücrelerin ve doku fonksiyonlarının dejenerasyona uğramalarına neden olabilir. Değişik oksidasyon reaksiyonlarını antioksidan maddeler düzenlemekte ve dokularda bu maddeler doğal bir şekilde bulunur. Fakat antioksidan telafi sistemlerinde bulunan bazı bileşenlerin endojen sentezinde ya da antioksidan sentezinde meydana gelebilecek herhangi bir eksiklik, değişik hastalıkların oluşumuna zemin oluşturur. Hücreler birçok savunma mekanizması tarafından kontrol altındadır. Organizmalar bünyelerinde gerçekleşen normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı organizmanın kendisini koruması için bu mekanizmalara gerek duymaktadırlar (Fridovich, 1976). Vücudumuz da serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen ve onları tanıyabilen bir savunma sistemine sahiptir. Antioksidanların ve enzimlerin birlikte oluşturduğu bu sistem; serbest radikallerin hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çekerek onları etkisiz hale getirmektedir (Miguel ve ark., 1982).

Serbest oksijen radikalleri, bünyelerinde taşıdıkları ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest oksijen radikal oluşumu ile antioksidanların oluşturduğu savunma mekanizması arasındaki dengesizlik oluştuğu takdirde, serbest oksijen radikal düzeyi artmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği doku hasarının önemli mekanizmalarının başında hücre zarlarındaki lipidlerin peroksidasyonudur. Sağlıklı dokularda düşük seviyede olan lipid peroksidasyonun artması, serbest oksijen radikallerinin dokularda meydana getirdiği hasarın göstergesi olarak kabul görmektedir (Yarıktaş ve ark., 2003). Antioksidanlar ile ilgili birçok tanım olmasına rağmen en genel tanımı, lipit peroksidasyonunun oluşumunu geciktiren veya oluşmuş reaksiyonların yavaşlamasını sağlayan kimyasal bileşiklerdir (Elitok, 1996).

1.1.1.1. Biyolojide Serbest Radikaller

Bazı biyolojik olayların gerçekleşmesinde serbest radikaller önemli rol oynar, bunların bazıları yaşam için gereklidir, örneğin bakterilerin nötrofil granülositler tarafından hücre içinde öldürülmesidir. Aynı zamanda bazı hücre sinyalizasyon süreçlerinde serbest radikallerin yer aldığı görülmüştür. Buna redoks sinyalizasyonu denilmiştir (Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L., 2007).

Serbest oksijen radikallerinin en önemlileri süperoksit ve hidroksil radikalleridir. İndirgenme tepkimelerinde moleküler oksijenden meydana gelirler. Ancak, reaktif özellik taşıdıklarından ötürü, bu serbest radikaller hücre hasarının oluşumunu

kolaylaştıran yan reaksiyonlara girerler. Serbest radikaller ve DNA arasında oluşan reaksiyonların sonucunda, mutasyonların oluştuğu ve bunların hücre döngüsünü negatif etkilediği düşünülmekte ve birçok kanser tipinin oluşum nedeni olarak görülmektedir. Yaşlanma belirtileri (ateroskleroz gibi) vücutta oluşan serbest radikallerin oksidasyonuna atfedilir. Buna ek olarak, alkole bağlı karaciğer hasarında serbest radikallerin etkisi vardır. Sigara dumanında bulunan radikaller akciğerde bulunan alfa-1 antitripsini baskıladığına dair bulgular vardır. Bu süreç amfizem oluşum sürecini hızlandırır.

Serbest radikallerin bu süreçte yardımcı rol aldıkları düşünülen diğer hastalıklar arasında Parkinson hastalığı, yaşlılık ve ilaç nedenli sağırlık, şizofreni ve Alzheimer hastalığı da yer almaktadır. Hemokromatoz (demir depo hastalığı), klasik bir serbest radikal sendrom olup: hareket bozukluğuna, psikoz, deri pigmenti melanin bozukluğuna, sağırlık, atrit ve diyabetes mellitus gibi serbest radikallerle ilişkilendirilmiş hastalıklara sebep olur. Yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rol oynadığı teoriler bulunmakta ve buna karşın mitohomesis süreci serbest radikallere mağruz kalmanın yaşam süresini uzatabileceğini akıllara getirmektedir.

Serbest radikaller yaşam için gerekli olduğundan, vücutta serbest radikallerin meydana getirdiği hasarın onarılması için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri sayılabilir. Antioksidanlar bu savunma mekanizmalarında önemli rol oynar. Bu başlıca antioksanlar, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve polifenollerdir. Ayrıca, bilirubin ve ürik asit de bazı serbest radikalleri etkisiz hale getirerek antioksidan gibi davranabilirler. Bilirübin hemoglobinin yıkımında oluşur, ürik asit ise pürin türevlerinin yıkımı sonucu meydana gelir. Ancak aşırı miktarda bilirubinin vücutta bulunması sarılığa neden olabilir, bu da merkezî sinir sistemini olumsuz etkiler. Aşırı ürik asit ise gut hastalığının oluşum nedenidir (Rhodes C.J.,Taylor ve Francis, 2000).

1.1.2. Serbest Radikaller ve Tanımlanmış ROS

Oksijen insan yaşamında vazgeçilmezdir, solunum yoluyla alınan oksijenin büyük bir kısmı (yaklaşık %90) elektron taşıma sisteminde, kalan kısmı da oksijen gerektiren diğer reaksiyonlar için kullanılmaktadır. Normalde metabolik olarak üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücutta yoğunlaştığında zarar verme olasılığına sahiptir (Diplock, 1998). Reaktif oksijen türlerinde çoğunluğu serbest radikallerin oluşturduğu,

normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldıklarında, kimyasal reaksiyona girme potansiyeli daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar, 1996). Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabiletisini kaybetmiş bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi biyolojik materyallere zarar verirler. Bu zararın yaşlanmayı tetiklediği ve ayrıca kalp-damar hastalıklarına, çeşitli kanser türlerine, katarakt, bağışıklık sisteminin zayıflamasına, sinir sisteminde dejeneratif hastalıklara sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock, 1998).

Oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açan etkenler, canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular kabul edilmektedir. Tekli oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu ($\cdot O_2$-), hidroksi ($\cdot OH$), peroksi ($ROO\cdot$) ve alkoksi ($RO\cdot$) radikalleri başlıca radikallerdir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Reaktif oksijen türlerinin oluşturabileceği hasara karşılık vücutta farklı doğal savunma sistemleri bulunmakta ve serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadırlar. Bu sistemler farklı hücre gruplarında bulunarak ve farklı serbest radikaller üzerinde etkili oldukları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock, 1998). Çizelge 1'de pro oksidan faktörleri ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge gösterilmektedir.

Çizelge 1. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock, 1998)

Oksidan	Antioksidan Savunma
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz, Katalaz
Egzersiz	Glutatiyon peroksidaz
Çevre kirleticiler	Glutatiyon
Ateşli hastalıklar	Ubikinon
Radyasyon	Selenyum
Çoklu doymamış yağ asitleri	Ürik asit
ile zengin bir diyet	E vitamini
İskemi	C vitamini
	β-karoten ve diğer karotenoidler
	Karsinojenler

Oksidasyonların oluşumuna neden olan serbest radikalleri yakalama ve onları dengede tutma yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" denir (Elliot, 1999). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; var olan radikaller ile reaksiyona girerek onların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumlarını engelleyen bileşiklerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatiyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemlerinin yer aldığı birincil antioksidan kategorisi, serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğindedir. Bu enzim sistemleri, serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırarak bir hücre grubundan diğerine geçişlerini engelleyebilmektedirler (Diplock, 1998). C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilurubin ve polifenoller gibi bileşikler ise ikincil antioksidan kategorisinde yer almaktadırlar. İkincil antioksidanlar olarak adlandırılan bu bileşikler, oksijen radikalini yakalayarak radikal zincir reaksiyonlarını kırmaktadırlar (Ou et al., 2002).

1.1.2.1. Serbest Radikal Oluşturan Başlıca Mekanizmalar

- **Otooksidasyon**

Serbest radikal zincir reaksiyonlarında atmosferik oksijenin katalizlenmesi olayına otooksidasyon denir (Nawar, 1996).

- **Geçiş Metal İyonlarının Etkisi**

Geçiş metal iyonları arasında yer alan demir ve bakır iyonları canlı sistemlerde serbest radikal oluşumu sağlayan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

- **Fotooksidasyon**

Oksidasyonlarda başlatıcı görevi üstlenen peroksitlerin oluşumunda fotokimyasal iz yolları oldukça önem taşımaktadır.

- **Enzimatik Oksidasyonlar**

Vücutta bulunan lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi enzimlerin aktivitesinin sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) üretilmektedir (Meydani, 2001).

∗ **Ksantin Oksidaz (XOD)**

Canlı sistemlerde ROS oluşumuna neden olan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir. Ksantin oksidaz (XOD), pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD+'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimidir, ancak dokularda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside ederek ve proteolizise neden olan bir oksidaz enzimine dönüşür. Süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri XOD'ın faaliyeti sonucunda meydana gelmektedir. XOD beyinde ödeme, iskemiye, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarların ortaya çıkamasına sebep olur, ayrıca hepatit ve beyin tümörü gibi hastalıklarda XOD'ın serum düzeylerini arttığı belirtilmektedir (Lavelli, 2000).

∗ **NADPH Oksidaz**

Serbest radikal oluşumuna neden olan diğer bir enzim de NADPH oksidazdır. NADPH oksidaz enzimi nötrofillerin plazma zarında bulunmaktadır. Mitokondri organelleri tarafından alınan oksijenin yaklaşık %1-4'ü süperoksit anyonu üretiminde kullanılır. Üretilen süperoksit anyonunun yaklaşık % 20'si hücrelere geri gönderilir. Fagosit hücrelerinde bulunan makrofajlar ve monositler O_2 alımını arttırarak, NADPH oksdiaz enzimi aktif hale gelir, bu sayede oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürerek ekstra selüler sıvılarda artış sağlarlar (Duthie et al., 1989).

∗ **Nötrofil Miyeloperoksidaz (MPO)**

Nötrofilik miyeloperoksidaz (MPO) enzimi canlı sistemlerde bulunan güçlü oksidan kaynaklarından birisidir. MPO enzimi, hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonunu sağlayarak hipoklorik asit üretimini katalizlerler. Bu reaksiyonun sonucunda oluşan toksisite savunma sistemindeki bakterilerin öldürülmesine katkı sağlar. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asit ise α1-antiproteinaz'ı

inaktive ederek sağlıklı insan dokularında iltihaplanmalara neden olmaktadır (Lavelli, 2000).

- **Halojenlenmiş Hidrokarbonlar**

Serbest radikal oluşumuna neden olan diğer olaylar; toksik halojenlenmiş hidrokarbonların içme sularını kontamine etmesi ve azot oksitlerin neden olduğu hava kirleticileridir. Biyolojik sistemlerde Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan ($CBrCl_3$) gibi hidrokarbonların oksidatif hasarın oluşmasında etkili oldukları bildirilmektedir (Chen ve Tappel, 1996).

1.1.3. Reaktif Oksijen Türlerine (ROS) Karşı Savunma

Canlı hücre gruplarında bulunan protein, karbohidrat, lipid ve DNA gibi kaynaklarda solunum yoluyla alınan oksijen oksidasyona uğrayarak ROS türlerinin oluşumuna neden olur. Vücutta ROS'ların aşırı birikiminin önlenmesi için belli maddeler tarafından dönüştürülmesi gerekmektedir. Vücutta okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu engelleyen ya da yavaşlatan maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir.

1.1.3.1. Antioksidanlar (Yükseltgeme Önleyiciler)

Canlılarda, kimyasal süreçler (prosesler), özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini engellerler. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini en aza indirgedikleri gibi, hücre yıkımını da yavaşlattıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir hayat yaşama şansını yükseltir (https://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan).

1.1.3.1.1. Antioksidan Türleri

Hücrelerde bulunduklara yerlere göre farklılık gösteren antioksidan savunma elemanları üç başlık altında toplanırlar.

- İntraselüler Antioksidanlar

  Süperoksit dismutaz (SOD)
  Katalaz (CAT)
  Glutatyon peroksidaz (GSH)
  Sitokrom oksidaz
- Membran Antioksidanlar

  Vitamin E
  Koenzim Q
  β-Karoten
- Ekstraselüler Antioksidanlar

  Albumin
  Ürik asit
  Askorbik asit
  Bilirubin
  Transferrin
  Laktoferrin
  Haptoglobin
  Seruloplazmin

1.1.3.2. Antioksidan Savunma

Hücre içinde bulunan enzimatik antioksidanlar, hücre dışında yer alan enzimatik olmayan antioksidanlara göre daha etkilidir. Antioksidanların etkileri iki başlık altında toplanırlar.

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

a) Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki
b) Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki
c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a.Oksidan oluşumunun engellenmesi-Süpürme etkisi (Scavenging)

Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir.

Antioksidanlar tarafından oksidan oluşumunun engellenmesi iki yolla gerçekleşir (Örn: Enzimler).

- Fiziksel engelleme

Hücreler davranışsal olarak kaçınma sergileyerek, oluşturduğu bariyerler sayesinde hücresel düzeyinde, organ düzeyinde ve organizma düzeyinde fiziksel engelleme sağlanır.

- Biyokimyasal engelleme
  - Oksidan Moleküllerin Kontrolü
    Geçiş metal kenetleme maddeleri
    O_2 redüksiyonunun katalitik kontrolü
  - Prooksidan Enzimlerin Kontrolü
    Uyaranların blokajı
    Enzimlerin inhibisyonu

Önleyici antioksidan örnekleri arasında; Anti-enflamatuar ajanlar, Nitrik oksit sentez inhibatörleri, Metal kenetleme maddeleri (metallothionein, transferrin, lactoferrin), NADHP oksidaz inhibatörleri, Ksantin oksidaz inhibatörleri yer almaktadır.

b.Oksidanları durdurma-Söndürme etkisi (Quenching)

Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktif hale gelmelerini sağlayan mekanizmadır. Bu mekanizmada yer alan antioksidanlar çeşitlilik gösterir.

- Klasik Antioksidanlar

Prooksidanların oluşumunu durdurma, sonrasında oluşacak hasarın engellenmesinde ve hücrede kritik bölgelere taşınımını engellemede görev alır.

Klasik antioksidanlar durdurma reaksiyonunu gerçekleştirirken bazı önemli hususları göz önünde bulundurur. Bunlar: reaksiyon hızı (hız sabiti), in vivo engelleyicilerin konsantrasyonunun oranı, reaksiyonunun detoksifikasyon yolunun olabilitesi ve katalitik olarak dönüştürülebilme ihtimalidir.

- Zincir-kıran Antioksidanlar

Lipid peroksidasyonu

ROO • (peroksil radikalleri): çoğu zaman zincir taşıyan radikalleridir.
Zincir kıran antioksidanlar ile peroksil radikallerinin reaksiyona girmesi:

∗ Hücresel Antioksidanlar

Küçük moleküller

- Suda çözünen: glutatyon, ürik asit, askorbat (C vitamini)
- Yağda çözünen: α-tokoferol (E vitamini), β-karoten, koenzim Q

Proteinler

- Hücre içi: SOD (I ve II), glutatyon peroksidaz, katalaz
- Hücre zarı: SOD (III), ec GPx, plazma proteinleri (yumurta akı)
- Hücre dışı: fosfolipid hidroperoksit GPx (PHGPx)

c.Oksidanların neden olduğu hasarın onarımı (Repair)

d.Radikal zincir reaksiyonunu kırma (Chain Breaking)

ROS'u ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (Ör: Hemoglobin, seruloplazmin, mineraller).

1.1.4. Mantarlar

Mantarlar tarih boyunca, dünya üzerinde farklı toplumlar tarafından lezzetli ve besleyici besin olarak bilinmiş ve tüketilmiştir. Birçok kültürde, mantarların zehirli türleri ve yenilebilir türlerini ayırt edici pratik bilgiler toplumlarda nesilden nesile aktarmıştır. Öncelikle Doğu ülkeleri olmak üzere dünyanın birçok yerinde, bazı mantar türleri insan sağlığı açısından faydalı olduğu fark edilmiş ve yaygın olarak kullanmıştır. Fakat bazı ülkelerde mantar zehirlenmesinden çekinildiği için mantar kullanımı çok fazla rağbet gösterilmemiştir (Smith ve ark., 2002).

50 milyon yıldan fazla bir süredir mantarları tüketen ve onları besin olarak kullanan Attini (Formicidae) familyası karıncaları ve farklı birçok termit grubu biyolojik araştırmalarda doğal sınırlama olarak görev yapmaktadır (Mueller, 1998). İnsan ırkının gruplar halinde yaşamını sürdürmeye başlamasıyla birlikte, doğada çeşitli hastalıklarla mücadele biyolojik araştırmaların başlıca konusu olmuştur. Edinilen bilgiler bir sonraki nesile iletilerek yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde sözlü veya metinsel olarak kaydedilmiştir. Günümüzde doğal ilaçların, saf ve etkili olduğu

belirlenmiş, bu nedenle kemoterapötik kimyasal maddelerde de kullanılmaktadır (Lahiri, 2010).

Mantarlar üzerinde yapılan çalışmalar 4000 yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Antik Roma halkı mantarların gök fırtınaları esnasında Jüpiter tarafından yeryüzüne yıldırımla gönderdiğine inanmış ve mantarlara "Tanrıların gıdası" ismini vermişlerdir. Mısır halkı ise mantarları "Tanrı Osiris' den bir armağan" olarak kabul görmüşlerdir. Çin de ise mantarlar "hayat iksiri" olarak bilinmektedir (Smith ve ark., 2002).

Kuzey Afrika'da mantar tüketiminin en eski arkeolojik kanıtı, M.Ö en az 5000 yıllarında Cezayir'de bulunan mağara duvarlarında resim olarak tasvirlendiği görülmüştür. Resimde dansöz yüzündeki maske ve dönemin kaya resimlerindeki tipik duruşu ile görünmektedir. Bu arkeolojik kanıt değeri taşıyan resimde bir şaman ve halüsinojik bir mantar resmedilmiştir (Şekil 1.1.4.1). Avrupada yer alan Fransa'nın Bego dağında yapılan kazı çalışmalarında, mağara duvarlarında resmedilen şekiller şamanistik bir öğe olan Amanita dışında, mağara duvarlarında çeşitli mantarlarda figür olarak kullanılmıştır. Mantarların geçmişi hakkında diğer önemli arkeolojik bir belgede ise antik Yunan kültüründe bulunmuştur. Aristo, Platon ve Sofokles 'in mantarları besin olarak tükettiği ve dini törenlerde kullandıklarına inanılır.



Şekil 1.1.4.1. M.Ö. 3500 yılında Kuzey Cezayir'de Tassili'de bir mağarada bulunmuş elinde mantar tutan şaman figürü (Smith ve ark., 2002)

Mısır firavunları da mantarı tanrıların besini olduğuna inandıkları ve kabul gördükleri için halk tarafından tüketilmesini yasaklamışlardır. Roma imparatorluğunda mantarın güç sağladığına inanıldığından, ordularda lejyonerler besin olarak tüketmişlerdir. Ortaçağ döneminde simyacılar mantarların reenkarnasyonu

simgelediğini ve sihirli olduğuna inandıklarından dolayı iksir, ilaç ve zehir yapımında kullanmışlardır.

Antik çağlarda mantar kullanımının en baskın özelliklerinden biri bazı mantarların psikoreaktif halüsinojenik etkileri ile alakalıdır. Çeşitli mantarların antik çağda dini inanışlarda ve dini ritüellerinde kullanıldığına dair yaygın bir literatür vardır. Araştırmalar, halüsinojenik küçük mantarlar olan Psilocybe spp. ve Panaeolus spp.' in Orta Amerika'da ve *Amanita muscaria* (L.) Lam.'nın Kuzey Avrupa'da, Sibirya'da ve Sanara bölgesinde paleolitik zamanları da kapsayan yaygın kullanımını göstermiştir. Günümüze kadar yapılan detaylı araştırmalar ve toplanan bilgiler, dinin ilkel ritüellerinde halüsinojenik mantarların kullanımını belirtmektedir. Orta Amerika' da M.Ö 3000 yıllarına kadar uzanan birçok mantar taşları vardır. Bu taşlar Guatemala'daki maya kazı bölgelerinde tespit edilmiştir (Ghaffari ve ark., 2012; Smith ve ark., 2002), (Şekil 1.1.4.2.).



Şekil 1.1.4.2. Orta Amerika'da yaklaşık 3000 yıl öncesinde bulunan mantar heykelcikleri (Smith ve ark., 2002)

Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, Çin tıbbında uzun zamandır önemli bir yere sahiptir ve Fu Zheng terapisi olarak adlandırılmaktadır. Mantarların ürettikleri bileşiklerin tıbbi özelliğe sahip olmasından dolayı mantarlar, hastalık direncini artırmak ve vücut fonksiyonlarının normal seyrinde ilerlemesi için Uzak Doğu ülkelerinde çok eski zamanlardan beri hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.1.4.3).



Şekil 1.1.4.3. 1600'lü yılların başında Çin'de saraylarda imparatorların şifalı olduğuna inandığı Reishi (*Ganoderma lucidum*) mantarı tutan adam resmi

1960'lı yıllardan günümüze tıbbi özelliklere sahip mantarlar hakkında yapılan araştırmalar ışığında mantarların tamamının kullanılmasından ziyade daha çok mantar ekstraktlarının elde edilip, onların etki mekanizmaları hakkında bilgiler bulunmaya çalışılmıştır. Bu araştırmalar şunu göstermiştir ki, mantarların direkt olarak bakteri, virüs veya kanser hücrelerine etki etmediği fakat bağışıklık sistemini düzenleyip, güçlendiği tespit edilmiştir (Smith ve ark., 2002).

Bütün hastalıkların tedavilerinde en önemli rolü vücudun bağışıklık sistemi üstlenmektedir. Bağışıklık sistemini zayıflatan sebeplerin ortadan kaldırılması, tedavide ilk adımdır ve bağışıklık sisteminin güçlenmesiyle vücut hastalıklara karşı daha dirençli duruma gelmekte ve iyileşme süreci kısalmaktadır. İlaçlardan bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyecek sonuçların alınamaması, insanları son yıllarda alternatif tedavi yöntemlerine başvurmaya itmiştir. Bu hususta alternatif tıp olarak adlandırılan yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Mantarlardan ve doğal bitkilerden elde edilen ham veya içerikleri belirlenmiş ekstraktlar son zamanlarda epeyce çok kullanılır hale gelmiştir. Bu ekstraktlar doğrudan tedavi edici olarak kullanılabildiği gibi, vücutta bağışıklık sistemini desteklemek adına uygulanan tedavilere ek materyaller olarak da tercih edilmektedirler. Anti kanser çalışmalar üzerine yapılan araştırmalarda günümüzde mantarlar oldukça yaygın kullanılmasına karşın ülkemizde bu konu üzerinde fazla sayıda çalışmaya rastlanılmamıştır. Ülkemiz toprak verimliliği ve iklim çeşitliliği sayesinde mantar türleri açısından zengin olmasına rağmen, mantarlar tıbbi amaçlar için pek tercih edilmemektedir. Ülkemizde yetişen ve toplanan farklı mantar türleri yurt

dışına ihraç edilmekte fakat bu mantarlar üzerinde detaylı bir araştırma ne yazık ki yapılmamaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Tricholoma anatolicum* örnek verilebilir.

Tricholoma anatolicum ülkemizde endemik bir tür olup sonbahar aylarında toplanarak herhangi bir işlem görmeden doğrudan Japonya'ya ihraç edilmekte, önemli ticari kaynak olarak görülen bu mantarlar hakkında herhangi detaylı bir araştırma yürütülmemesi ülkemizin milli değerlerini koruma stratejisi açısından büyük bir dezavantajdır.

Yenilebilir nitelikte olan mantar türü *Tricholoma anatolicum* ekstraktının kanser hücrelerinin üremeleri üzerindeki ve oluşturulan oksidatif stres ortamına karşı etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan *Tricholoma anatolicum* su ekstraktı elde edildikten sonra HEPG2 hücreleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre hepatoprotektif özellikte ve antikanser aktivite göstermesi farmakolojik olarak katkı sağlaması düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Atomik veya moleküler yapılarda ortaklanmamış elektron bölümlerine serbest radikal denir. Serbest radikaller başka moleküller ile elektron alışverişine girme potansiyelindedirler (Çavdar ve ark., 1997). Bunun sonucunda oluşan dengesizlik oksidatif strese sebep verir. Bir maddenin antioksidan aktivite gösterip göstermediği ortamdaki serbest radikalleri süpürüp süpüremediği ile ilişkilidir. IC_{50} değerleri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar etkilidir (Pourmorad ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda fenolik bileşik olan kateşin; antimikrobiyal, antikanser, antialerjik ve antioksidan aktivitesi belirlenmiştir (Kondo ve ark., 2000).

Serbest radikaller çok kararsız olduklarından, normal metabolizma yolu ile çoğu kez hücrelerde bulunan antioksidanlar ile etkisiz hale getirilirler. Hücrelerde CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarına karşı antioksidan içeriğini arttırmak önemli etkisizleştirme yollarından biridir. Oksidatif strese bağlı karaciğer patolojileri önlemek için doğal antioksidanların kullanımında artış vardır (Harish ve Shivanandappa, 2008; Dhanasekaran ve ark., 2009; Wang ve ark., 2004). Hücrelerde ROS nötralize eden önemli savunma mekanizmaları, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler içerir (Tsai ve ark., 2009).

Reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, aerobik organizmaların solunumu sırasında gerçekleşir. Aşırı kararsız ROS' lar, vücutta farklı gruplar ya da maddeler ile istenmeyen reaksiyona girmesi sonucunda, hücrelerde ya da dokularda hasar meydana geldiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, çok sayıda çalışma, kontrolsüz lipid peroksidasyonun meydana gelmesinde, Parkinson, artrit, miyokard enfarktüsü, Alzheimer, kanser, kalpdamar hastalığı dahil olmak üzere pek çok hastalığın ve karaciğer hasarı gelişiminde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Qian ve ark., 2008; Blomhoff, 2005). Bu nedenle son birkaç yıl içerisinde, insan beslenmesi ve gıdalardan elde edilen antioksidanların biyokimyasının, ROS ile indüklenen hasarın azaltılması veya önlenebilmesi için araştırmalar üzerinde durulmaktadır.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu en yaygın hastalık karaciğer hasarıdır ve steatozdan kronik hepatite, siroz ve hepatosellüler karsinoma kadar ilerlemesi ile karakterizedir (Srivastava ve Shivanandappa, 2010; Jin ve ark., 2005). Karaciğer hastalıklarının etiyolojisi, asetaminofen, bromobenzen, etanol, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve karbon tetraklorür gibi çeşitli bileşikleri ($CC1_4$), kapsamaktadır (Adesanoye ve Farombi, 2010).

Düşük reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeyi, sinyal transdüksiyonu ve gen ifadesinin modülasyonunda yararlı bir işlev görür, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ROS'lar, DNA ve diğer biyolojik makro moleküller üzerinde son derece zararlıdır (Ames B. ve ark.,1993, Halliwell B. ve Gutteridge J., 1999). Geçmiş yıllarda, DNA ROS-kaynaklı hasar mekanizmalarının, kanser ve çeşitli yaşa bağlı hastalıkların etiyolojisiyle ilgili yoğun çalışmalar yapılmıştır (Cerutti P.,1985; Marnett L., 2000). Aşırı ve/veya verimsiz üretilen hücre içi antioksidan savunma sistemlerinden kaynaklanan ROS birikimi DNA hasarına neden olur (Halliwell B., 1999). ROS zararlı etkilerini besin takviyeleri ve önleyici tedaviler ile dengelemek adına çeşitli doğal ürünlerde antioksidanların belirlenmesi için çalışmalara odaklanmıştır. Geleneksel, meyve, sebze ve yeşil çay' da askorbik asit, α-tokoferol, karotenoidler, flavonoidler ve polifenoller dâhil olmak üzere düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar doğal zengin kaynaklar olarak görülmektedir. Yakın zamanda mantarlarda, doğal antioksidan kaynağı potansiyeli incelenmiştir.

Mantarların fenolik bileşik içerikleri, antioksidan ve anti kanser aktiviteleri ile iligili bilimsel çalışmalar oldukça kapsamlı ve uzun bir geçmişe sahiptir. *Tricholoma* sp.'nin misel kültürünün, immunomodulatör ve anti tümör faaliyetleri incelenip barındırdığı polisakkarit-peptid kompleksinin makrofajları aktif hale getirerek T-hücrelerinin çoğalmasını uyardığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Tricholoma* cinsinin birçok türü bazı kanser tedavilerinde doğrudan kullanılmaktadır (Wang ve ark., 1995).

Eurotium chevalieri misellerinden izole edilmiş bir fenolik bileşik olan flavoglausin antioksidan kapasitesi % 0.05 olarak tespit edilmiştir (Elmastaş ve ark., 2007). Yenilebilir mantarlar doğal antioksidan potansiyeline sahiptir. Bu nedenle içerdikleri fenolikler lipit oksidasyonunu indükleme yeteneğine sahiptir. *Ganoderma lucidum, Phellinus rimosus, Pleurotus florida* ve *Pleurotus pulmonaris*' in antioksidan ve antitümör aktiviteleri belirlenmiştir (Thekkuttuparambil ve ark., 2007).

Serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hücre hasarı, kalp hastalığı ve diyabet gibi rahatsızlıkların başlangıcını yavaşlatan ve önleyen Ergothionein, Pennsylvania State Mantar Araştırma Laboratuvarında Agaricus sp.'lerden izole edilmiştir. Önemli seviyelerde içerdiği güçlü oksidanlar süpürücü olarak antioksidan aktivite göstermiştir. Agaricus sp.'lerde bulunan Ergothioneine, yanı sıra mineraller, esansiyel amino asitler, vitaminler ve lifler bakımından zengin olması ve kalorisi düşük olduğu için günümüzde mantar yararlı bir gıda maddesi olarak çekici hale gelmektedir (Mattila ve ark., 2002).

Biyolojik etkilerin çoğu serbest radikal süpürücü aktiviteye ve antioksidan aktiviteye dayanmaktadır (Middleton ve ark., 2000). Antioksidanlar olarak mantar özlerinin kullanımı giderek popüler hale gelmektedir (Mau ve ark., 2002; Lo ve Cheung, 2005; Elmastaş ve ark., 2007; Tsai ve ark., 2007). Araştırma grubları tarafından, yabani yenilebilir mantarların antioksidan özelliklerinin, hayvan eritrositlerde ve beyin hücre zarlarında, özellikle serbest radikal süpürücü aktivitesi ve lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi gösterdikleri belirtilmiştir (Barros ve ark., 2007a, 2008a, 2008b).

Mantarlar, tıbbi ve farmakolojik özellikleri nedeniyle mantara dayalı beslenmede büyük ilgi çekmektedir. Basidomycota bölümünden olan *Phellinus linteus* aromatik bileşikler ve polisakaritler açısından zengin bir mantardır. Geleneksel doğu tıbbında 2000 yıldan fazladır tümörler, enflamasyon ve lenf hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (Han S. ve ark., 1999; Yang Q. ve Jong S., 1989). Araştırmanın büyük bir bölümü, *P. linteus'* un anti-tümör (Kim ve ark. 2004), immünomodüle edici (Lim ve ark., 2004) ve antioksidan aktivitesi (Park ve Ark., 2004) hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca Jeon ve Ark. tarafından karaciğer koruyucu etkileri bildirilmiştir (Jeon ve ark., 2003). *P. linteus* HEPG2 hücrelerinde takrin kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon ve toksisitesine karşı önemli bir koruyucu etki göstermiştir. *P. linteus*, Asya ülkelerinde yaygın kullanılan en iyi geleneksel tıbbi mantarlardan biridir. *P. linteus'*ta kaffeik asit ve hispidin gibi çeşitli aromatik bileşiklerden olan başlıca tıbbi bileşenler; polisakaritler ve β-hidroksibenzaldehitler bulunmaktadır (Santos ve ark., 2003). Bu bileşenlerin bir kısmı ROS' a karşı koruma sağlayabilir. Bu etki, glutatyon (GSH) seviyesinde, antioksidan enzim aktivitelerinin indüklenmesi ve artan kabiliyetlerini en aza indirgenmesi olarak tespit edilmiştir (Park ve ark., 2004; Park ve ark., 2001; Song ve ark., 2003).

Birkaç mantar türünde antioksidan gücü göstermek için demir indirgeyen antioksidan güç (FRAP) testi kullanılmıştır (Benzie L. ve ark., 1998). Çok sayıda mantar türünde bulunan polisakkaroproteinlerin, aktif oksijen türlerini temizlemek için kullanıldığı rapor edilmiştir (Liu F. ve ark., 1997). Shiitake mantarı (*Lentinula edodes)*' ından izole edilen termo antioksidan proteini olan 2-dezoksiriboz ve Φ×174 DNA'nın hidroksil radikali ile oksidatif bozunmasını bastırmıştır (Kawakishi S. ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalara göre birçok yenilebilir mantarın güçlü antioksidanlara sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Mantarlarda bulunan antioksidanlarçoğunlukla fenolik bileşikler (fenolik asitler ve flavonoidler) olup, tokoferoller, askorbik asit ve

karotenoidler onları takip eder. Bu moleküller çoğunlukla Finlandiya, Hindistan, Kore, Polonya, Portekiz, Tayvan ve Türkiye'de bulunan pek çok farklı mantar türünde nicelleştirilmiştir (Ferreira ve ark., 2009). Çeşitli fitokimyasal maddeler olan Kawaratake misellerinin (*Trametes versicolor*) kültüründen elde edilen "krestin" (PSK), Shiitake (*Lentinus edodes*), den elde edilmiş "Lentinan", Suehirotake (*Schizophyllum commune*) sıvısı kültüründen ''Schizophyllan" (Sonifilan)'dan sitostatik polisakkarit ilaçlar geliştirilmiş ve bu tıbbi mantarlardan izole edilmiştir (Mizuno, 1993). Lentinan ve Schizophyllan' da saf beta-glukanlar, PSK'da da proteinlere bağlı polisakaritler vardır (Larone, 2002). Bu üç sitostatik polisakkarit ilacın, bulaşıcı hastalıkların çeşitli formlarına karşı savunmayı güçlendirme özellikleri ve kendilerine has biyolojik aktiviteleri vardır. Bu immün kuvvetlendiriciler (veya bağışıklık başlatıcılar) da "biyolojik tepki değiştiricileri" olarak kabul edilmiştir (Zjawiony, 2004; Zaidman ve ark., 2005).

Yaygın olarak sebze, meyve ve diyetlerin önemli bir bölümünü oluşturan birçok bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunan fenolik bileşikler, kronik ve dejeneratif hastalıkların oluşma riskini azaltan, en güçlü ve terapötik biyoaktif maddelerdir (Luximon-Ramma ve ark., 2003, 2005; Soobrattee ve ark., 2005).

Doğu kültürlerde, mantarların tıbbi özellikleri geniş bir yelpazeye sahip olduğu için özel bir grup olarak kabul edilmiştir (Chang S. ve Buswell J., 1996). Değişik modern teknikler ile mantarların, anti-kanser, anti-tümör, anti-viral, immünomodülatör, hipokolesterolemik ve hepatoprotektif aktiviteler sergiledikleri, ayrıca çok sayıda biyolojik aktif mantar bileşenlerinin varlığı belirlenmiştir (Hsu H. ve ark.,1997, Yang Q. ve ark., 1992).

Doğal mantarlar, düşük sodyum, yüksek lif kaynağıdır ve hemen hemen yağ ya da kolesterol içermez. Bazı mantarlar tıbbi mantar olarak adlandırılırlar, besin ve toksik olmayan ilaçlarlar için önemli bir kaynak oluştururlar (Wasser ve Weis, 1999). Aslında, mantarlar antik çağlardan beri dünya çapında halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Mantarlar, trombosit toplanmasının önlenmesi, kan kolesterol konsantrasyonlarının azaltılması (Jeong et al., 2010; Aletor ve Aladetimi, 1995) (Borchers ve ark., 1999), kalp hastalığının önlenmesi ya da azaltılması, kan glukoz düzeylerinin azaltılması (Manzi ve Pizzoferrato, 2000) ve aynı zamanda bakteri, virüs, mantar ve parazit patojenlerin yol açtığı enfeksiyonların hafifletilmesi veya önlenmesi gibi birçok tıbbi özellikleri tespit edilmiştir (Breene, 1990).

Basidiomycetes ailesine ait olan *Agaricus bisporus* Murill çok popüler yenilebilir tıbbi mantar olup Japonya'da sağlıklı gıda pazarında özellikle kültüre alınmıştır. *A. Bisporus*'un, karaciğer lipid peroksidasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Lin ve ark., 1998). Buna ek olarak, aynı zamanda *A. bisporus*, kanser, diyabet, damar sertliği, hepatit ve kronik hastalıklar da dahil olmak üzere bir dizi hastalığın önlenmesi için gıda olarak kullanılmaktadır (Takaku ve ark., 2001; Itoh ve ark., 1994).

Basidiomycetes familyasından *Boletus edulis* fruktifikasyonunun ekstraktı ve diğer Homobasidiomycetes familyası ekstraktları, Sarkoma-180 fare hücre hattına karşı test edilmiş ve anti tümör aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Lucas ve ark., 1957). 1960'lı yıllarda, tıbbi mantarlardan izole edilen doğal ürün olan calvacin anti tümör ajan olarak kullanılmıştır. *Calvatia gigantea* 'dan izole edilen calvacin, Sarkoma-180 hücre hattı, meme adeno karsinoma 755, lösemi, L-1210 ve HeLa hücre hatları dahil olmak üzere birçok deneyde tümörlere karşı etkili olduğu bulunmuştur (Lucas ve ark., 1958). Basidiomycetes sınıfının yaklaşık 650 türünün anti-tümör aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Mizuno, 1995; Wasser, 2002).

Yenilebilir mantar türü *Pleurotus ostreatus*, istiridye mantarı olarak da bilinir ve ticari öneme sahiptir. *P. ostreatus*, anti kanser aktiviteleri, immünomodülatör etkileri ve antiviral, antibiyotik, anti-enflamatuar ve kolesterol düşürme faaliyetleri gibi tıbbi yararları tüm dünyada bilinmektedir (Bobek P., 1991; Wang H. ve ark., 2000). *P. ostreatus'*un fruktifikasyonunun su ekstraktları ve bu türün miselleri, nötrofiller tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) artırılmasında ve immünomodülatör özellik içeren immünokompetan hücrelerde bir role sahiptir (Shamtsyan M.M. ve ark., 2004). Coğrafi çeşitlilik sayesinde mantar polisakkaritleri ve bunların yapıları değişebilir. Mantarlar çoğunlukla mevsimlik yetişirler ve sürekli kültürleri için miselleri kullanılır.Kültür ortamındaki misel ve fruktifikasyonlarından elde edilen polisakkaritlerin, immünomodülatör, anti-tümör faaliyetleri tespit edilmiştir. Basidiomycetes sınıfındaki çoğu mantarda polisakkarit kaynağının sınırsız olduğuna inanılmakta ve çoğunlukla anti-tümör ve immün sistemi uyarıcı etkileri tespit edilmiştir (Wasser S.P. ve ark.,1999).

Tricholoma sp.'nin misel kültürünün, immunomodulatör ve anti tümör faaliyetleri incelenerek barındırdığı polisakkarit-peptid kompleksinin makrofajları aktif hale getirerek T-hücrelerinin çoğalmasını uyardığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Tricholoma* cinsinin birçok türü bazı kanser tedavilerinde doğrudan kullanılmaktadır (Wang ve ark., 1995).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Tricholoma anatolicum*' un Toplanması ve Lokasyonu

Gerçekleştirilen tez çalışmasında daha önceden karaciğer kanser hücresi olan HEPG2 üzerinde H_2O_2 kaynaklı hasara karşı hepatoprotektif etkileri belirlenmeyen yenilebilir özellikte olan *Tricholoma anatolicum* Doğan & Intini seçilmiştir. *Tricholoma anatolicum* Türkiye'ye özgü endemik bir türdür.

Çalışmamızda kullandığımız mantar, yüksek yapılı şapkalı mantarlardan olup yöre halkı tarafından sevilerek tüketilen ve yurt dışından da çok rağbet görüp ihraç edilen türlerden biridir. Amerika'da bol miktarda yetişen *Tricholoma magnivelare* ve Japonya'daki *Tricholoma matsutake*'ye benzerlik göstermesine rağmen kendine has koku ve lezzetiyle bu türlerden kolaylıkla ayırt edilmektedir. Ülkemizde yalnızca Akdeniz bölgesinde Toros dağlarında sedir ormanlarında yetişir. Halk tarafından "Katran mantarı" olarak bilinmektedir.

Çalışmada kullanılan örnekler ADANA-Feke, Aytepesi'nden *Cedrus libani* ormanında, 10.10.2012 tarihinde, 36741505D-4186069K koordinatlarında, 1436m yükseklikte toplanmış ve HD 9323 nolu kayıt numarasıyla Selçuk Üniversitesi Mantarcılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Fungaryumunda saklanmaktadır.

3.2. *Tricholoma anatolicum*' un Tanımı

Regnum: Myceteae
Divisio: Basidiomycota
Classis: Basidiomycetes
Ordo: Agaricales
Familia: Tricholomataceae
Species: *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini, Tricholoma anatolicum Spec. Nov.: A New Member of The Matsutake Group, Micol. e Veget. Medit., 18, 2: 135-142 (2003).

- **Makroskobik ve mikroskobik Özellikleri**

∗ **Şapka;** 4-20 cm çapında, önce sapa bitişik topuz şeklinde, sonra açılarak yarı kubbe şeklinden düzgünleşir. Gençken beyaz-krem, gelişme ilerleyince sarımsı kreme döner. Yüzeyi ince yünümsü tüylü, kenarında yünümsü velar kalıntılar asılı bulunur (Şekil 3.2.1).

∗ **Etli kısım;** 2-5 cm kalınlığında, beyaz, sıkı yapılı ve dolgun, katran kokusunda ve tadı çok güzeldir.

∗ **Lameller;** krem beyaz, sapa ince bir girinti yaparak birleşir.

∗ **Sap;** 4-10 x 2-5 cm, silindirik ve tabana doğru biraz incelmektedir. Önce beyaz, sonra krem beyazdan krem sarıya döner. Üzerinde ince yünümsü yapıda velar kalıntılar ve annulus bulunur.

∗ **Sporlar;** 6-7,5 x 4-5 μ, geniş eliptik veya subgloboz, renksiz, siyanofiliktir. Spor baskısı krem beyazdır.

∗ **Yetişme yeri özellikleri;** Sedir ormanı içinde kumlu yerlerde sedir ağacı ve Astragalus' ların dibinde ektomikorhizal yaşamaktadır.



Şekil 3.2.1. *Tricholoma anatolicum* H.H.Doğan & Intini

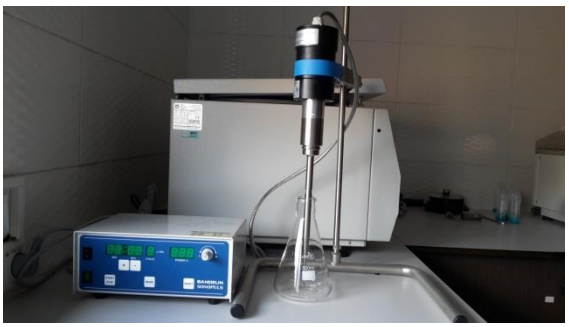
3.3. *Tricholoma anatolicum'* un Ekstraksiyonu

Toplanan mantar örnekleri 37°C' de kurutma dolabında yaklaşık 3-5 günde kurutulmuştur. Kurutulan örnekler değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen mantardan 50 gr tartılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan *T. anatolicum* için solvent olarak ultra saf su kullanılmıştır.

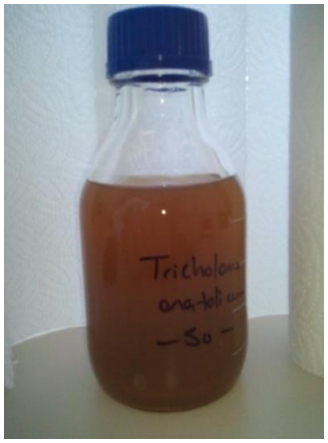
3.3.1. *Tricholoma anatolicum'* un Ultra Saf Su İle Ekstraktının Hazırlanması

Ekstraksiyona başlandığında ilk önce toz haline getirilen *T. anatolicum*'dan 50 gr tartılmıştır. Tartılan mantar ve 250 ml ultra saf su beher içerisine konularak 25-37 ºC sıcaklıkta ultrasonik homojenizatör cihazı (Bandelin SONOPULS MS73) (Şekil 3.3.1.1) ile 1 saat ultrasonikasyona tabii tutulmuştur. Ultrasonikasyon sonrasında sıvı ekstrakt

falkonlara eşit olacak şekilde dağıtılarak 8500 rpm de 15 dk soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernant kısım başka bir şişeye aktarılmıştır. Pellet toplanarak üzerine tekrar 200 ml ultra saf su konulmuş ve 8500 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernant kısım alınmıştır. Pellet üzerine 150 ml ultra saf su ilave edilerek 1 saat daha ultrasonikatör ile parçalanması sağlanmıştır. Parçalama işlemi bittikten sonra son olarak 15 dk daha santrifüj edilmiştir (Şekil.3.3.1.2). Protokol sırasında örneğin fitokimyasallarının sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40 ºC nin altında tutulmasına özellikle dikkat edilmiştir.



Şekil 3.3.1.1. Ultrasonik homojenizatör cihazı (Bandelin SONOPULS MS73) ile toz halindeki mantarın ultrasonikasyonu yapıldı.



Şekil 3.3.1.2. Toz haline getirilmiş *T. anatolicum*'un su ile ekstrakte edilmiş hali

3.3.2. *Tricholoma anatolicum*' un Fraksiyonu

Fraksiyona başlandığında ilk önce toz haline getirilen *T. anatolicum*'dan 40 gr tartılmıştır. Tartılan toz halindeki mantar üzerine 400 ml MetOH (%70) ile şişe içerisine

konularak 50 °C sıcaklıkta 150 rpm de 24 saat shaker cihazında işleme tabii tutulmuştur (Şekil 3.3.2.1. A, B, 3.3.2.2.).



Şekil 3.3.2.1. (A) Tartılan toz haline getirilmiş *T. anatolicum* (TA), (B) TA ile %70 MetOH karışımı



Şekil 3.3.2.2. *T. anatolicum* (TA) ve %70 MetOH karışımının 50 °C sıcaklıkta 150 rpm de 24 saat shaker cihazında işleme tabi tutulması.

Bu işlem sonrasında 300 ml *T. anatolicum* MetOH karışımı ile 300 ml hekzan karıştırılıp ayırma hunisine konularak *T. anatolicum* ekstraktında bulunan yağların çözülmesi sağlanmıştır. Ayırma hunisinde iki karışım arasında faz farkı gerçekleştikten sonra ortamdan hekzan uzaklaştırılmıştır. TA-MetOH karışımında hiçbir kayıp olmamıştır. Aynı işlem bu sefer 300 ml -MetOH karışımı ile 300 ml kloroform karıştırılıp ayırma hunisine konularak *T. anatolicum* ekstraktının içinde kalan yağların çözülmesi ve şekerlerin ayrıştırılması sağlanır. Ayırma hunisinde iki karışım arasında

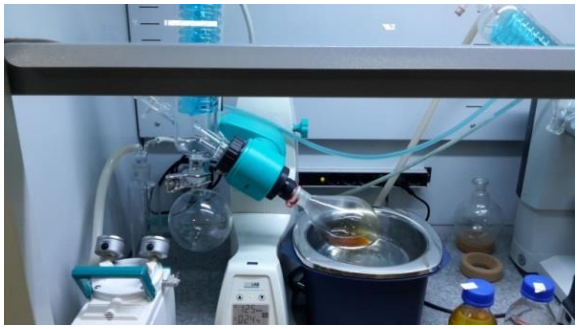
faz farkı meydana geldikten sonra ortamdan *T. anatolicum* -MetOH karışımı uzaklaştırılır. Aynı işlem son olarak 300 ml *T. anatolicum* -MetOH karışımı ile 300 ml etil asetat (EtOAc) karıştırılıp ayırma hunisine konularak *T. anatolicum* ekstraktında kalan şekerlerin ve lipidlerim çözülmesi sağlanmıştır. Faz farkı oluştuktan sonra *T. anatolicum* -MetOH karışımı ayırma hunisinden alınmıştır (Şekil 3.3.2.3. A, B,C).



Şekil 4.4.2.4. (A) *T. anatolicum*-MetOH ile Hekzan karışımının ayırma hunisindeki faz farkı, (B) *T. anatolicum*-MetOH ile Kloroform karışımının ayırma hunisindeki faz farkı, (C) *T. anatolicum* MetOH ile Etil Asetat karışımının ayırma hunisindeki faz farkı

3.3.3. *T. anatolicum'* un Metanol Ekstraktının Evaporatör ile Uçurulması

T. anatolicum-Metanol ekstraktı rotary evaporatorde (IKA RV10) 25°C de 200-220 rpm ayarlanılarak çözücüler tamamen uçurulmuştur (Şekil 3.3.3.1.).



Şekil 3.3.3.1. Mantar ekstraktının evaporatör işlemi

3.3.4. *T. anatolicum'un*Ekstraktının Liyofilizasyonu

Mantar ekstraktı filtre yardımıyla süzüldükten sonra +4°C de saklanmıştır. Daha sonra -80 °C de (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC-U410 premium) dondurulmak üzere 1 gece bekletilen ekstrakt, hücrelere uygulama aşamasında toz halinde kullanılacağı için liyofilizasyon cihazı (SCANVAC) ile -110 ºC'de 3-4 gün boyunca bekletilerek kurutulmuştur (Şekil 3.3.4.1). Liyofilize edilen ekstrakt +4 °C de saklanmıştır (Şekil 3.3.4.2).



Şekil 3.3.4.1. *T. anatolicum*'un liyofilize işlemi



Şekil 3.3.4.2. *T. anatolicum* ekstraktının liyofilizasyon işleminden sonraki toz hali

3.4. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktında Fenolik Bileşiklerin HPLC (High Performance Liquid Chromotography) İle Belirlenmesi

Bu aşamada *T. anatolicum*'un EHTA, FHTA ve FETA ekstraktlarının içerdiği önemli fenolik bileşiklerin analizi için Yüksek Performans Sıvı Kromotografisi (HPLC) ile (Shimadzu-HPLC), INERTSIL ODS-3 kolonu (5µm; 4,6 x 250 mm) ve UV-VIS dedektörü ile belirlenmiştir : Gallic Acid, Protocatechuic Acid, Catechin, 4-

Hydroxybenzoic Acid, Vanillic, Cafeic Acid, Syringic Acid, Chlorogenic Acid, Rutin Trihydrate, Trans-P-Coumaric Acid, Trans Ferulic Acid, Myricetin, Trans Resveratrol, Quercetin, Trans Cinnamic Acid, Naringenin, Kaempferol. Standartlar ve metanolik ekstraktlar 30°C de, UV-VIS dedektörü ile 280-330 nm dalga boylarında, akış hızı 1,0 ml/dk, mobil faz olarak A (dH20-gAc: glacial asetik asit_100-0,05) B (ACN: asetonitril) ile analiz gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.1).

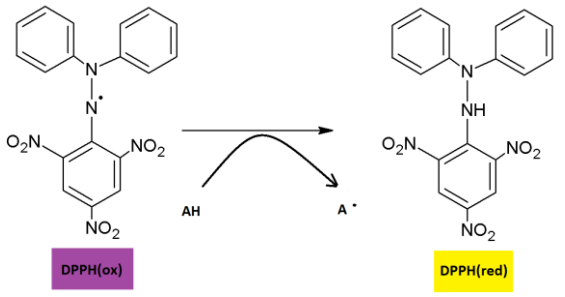
Çizelge 3.4.1. HPLC gradiyent prosedörü

TIME					
0,10	Controller	Start	%	Start	%
0,10	Pumps	B,Conc	8	A,Conc	92
2,00	Pumps	B,Conc	10	A,Conc	90
27,00	Pumps	B,Conc	30	A,Conc	70
37,00	Pumps	B,Conc	56	A,Conc	44
37,10	Pumps	B,Conc	8	A,Conc	92
45,00	Pumps	B,Conc	8	A,Conc	92
45,10	Controller	Stop		Stop	

3.5. Antioksidan Aktivite Tayini

3.5.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)Metodu

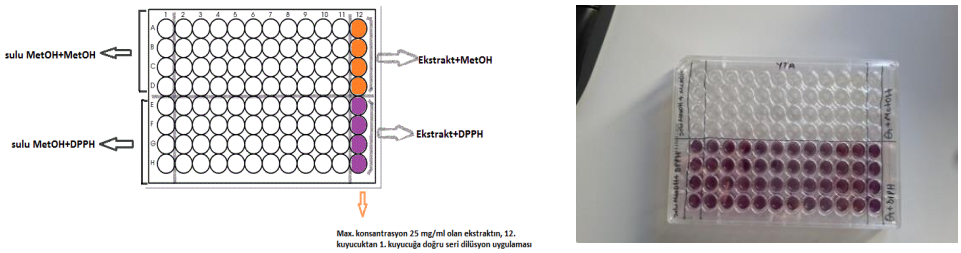
Serbest radikal yakalama yöntemlerinden biri olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kararlı ve sentetik bir radikaldir. Antioksidanın serbest radikal yakalama yeteneğinin ölçümü antioksidan aktivite olarak tanımlanır (Pokorny ve Ark., 2001). DPPH• antioksidandan gelen hidrojeni bünyesine kabul eder. DPPH oluşumuyla mor renkli DPPH• sarı renge döner. Kullanılan numunedeki antioksidan etkisi DPPH• 'in ortadan kaybolması ile doğru orantılıdır (Şekil 3. 5.1.1).



Şekil 3.5.1.1. DPPH• kimyasalının H emilimi sonucunda antioksidan aktivitesi

T. anatolicum'un sulu, MetOH 'lu ekstraktlarının antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. 50 mg tartılan ekstraktlar %20 su, %80 MetOH karışımı ile çözülmüştür. Ekstraktların max. konsantrasyonu 25 mg/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu

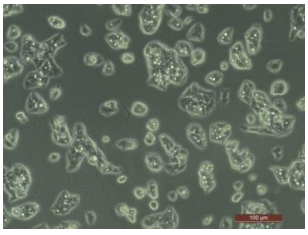
plakada seri dilüsyon yapılmıştır. Plakanın ilk dört sırasına ekstrakt + MetOH, diğer dört sırasına ise ekstrakt + DPPH eklenmiştir (Şekil 3.5.1.2). 30 dk. bekleme süresinden sonra *T. anatolicum*'un ekstraktlarındaki antioksidan aktivitesi, 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve EC_{50} (%50'sinin etkili olduğu konsantrasyon) değerlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir.



Şekil 3.5.1.2. Ekstraktın DPPH metodu için 96 kuyucuklu plakadaki yerleşimi

3.6. Hücre Hattı ve Kültür Ortamı

Karaciğer kanserine model hücre hatlarından biri olan HEPG2 hücreleri, 15 yaşında Kafkas etnik kökenli bir erkek hastanın karaciğer epitel dokusundan elde edilmiştir. HEPG2 hücreleri tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hattıdır. Hücrelerin kültür ortamı olarak %10 (v/v) fötal dana serumu (fetal bovine serum, FBS), içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Bakteri enfeksiyonunu önlemek için RPMI-1640 besiyerine gentamisin (1mg/ml) eklenerek, hücreler 37°C'de, %5'lik CO_2 inkübatörde üretilmiştir (Şekil 3.6.1, 3.6.2). Yapışkan hücreler, hücre kültür kabının %70'ini kapladığında tripsin-EDTA ile yeni kültür ortamına pasajlanmıştır. Çalışma sırasında, hücreler sıvı nitrogen içinde dondurularak saklanmıştır.



Şekil 3.6.1. Karaciğer kanserine model hücre hatlarından biri olan HEPG2 hücrelerinin × 10 objektifte mikroskobik görüntüsü



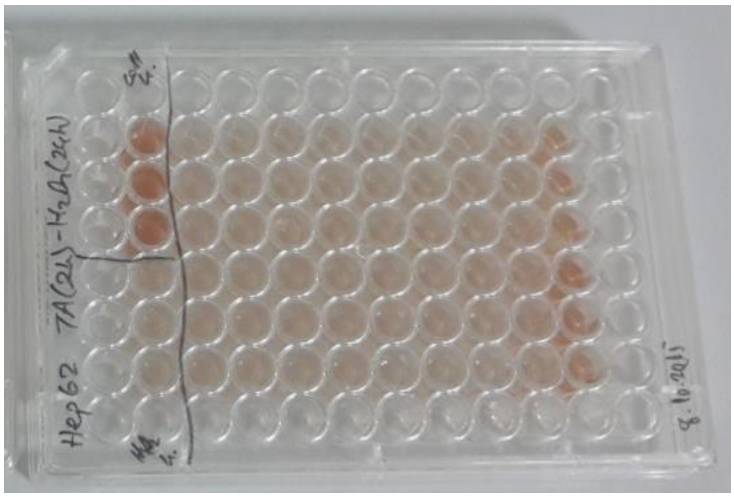
Şekil 3.6.2. CO_2 inkübatöründe kültür ortamlarında büyütülen HEPG2 hücreler

3.7. HEPG2 Hücre Hattının *T. anatolicum* Ekstraktı ile Muamelesi

Sitotoksisite testleri için;

- XTT metodunda; 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 1×10^5 hücre ekilirken (Şekil 3.7.1),
- Trypan blue metodunda ise; 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 2×10^5 hücre ekilir ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. (Şekil 3.7.2).

T. anatolicum sulu ekstraktından (EHTA) 10 mg tartılıp RPMI-1640 besiyeri ile muamele edilerek 2 set (10 dk. , 35°C) sonikatör uygulaması ile çözdürülerek plakalara eklenip 24 saat inkübasyona bırakılıp deney için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.7.1. XTT metodu için 96 kuyucuklu plakalara ekilen HEPG2 hücrelerinin 48 saat inkübasyonu sonrası EHTA ekstraktı ile muamelesi



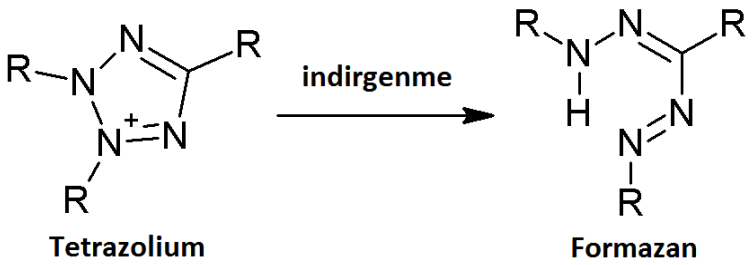
Şekil 3.7.2. Trypan blue metodu için 6 kuyucuklu plakalara ekilen HEPG2 hücrelerinin 48 saat inkübasyonu sonrası EHTA ekstraktı ile muamelesi

3.8. HEPG2 Hücre Hattının Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile Muamelesi

HEPG2 hücre hattı üzerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) oksidatif stres kaynağı olarak uygulanmıştır. *T. anatolicum* ekstraktı eklendikten 24 saat sonra plakalara 2.27 µM hidrojen peroksit eklenip 2 saat inkübasyona bırakılarak hücreler sitotoksisite deneyleri için hazır hale getirilmiştir.

3.9. Sitotoksisite Testleri, IC_{50} Belirlenmesi

Hücrelerde sitotoksik maddeler veya büyüme faktörleri gibi kimyasalları uygulanması ile canlı hücre sayısını tespit etmek için sitotoksisite testleri kullanılmaktadır. Sitotoksisite analizlerinde 3-[4,5- Dimethylthiazol-2-yl] 1-2,5-diphenyltetrazolium bromide (XTT) ajanı kullanılmıştır. Tetrazolium tuzlarının indirgenerek formazan kristaline dönüşümü sonucunda kullanılan materyalin sitotoksik potansiyeli belirlenmiştir (Şekil 3.9.1). *T. anatolicum* ekstratının HEPG2 hücre hattına karşı sitotoksik etkisi 96 kuyucuklu kültür kaplarında test edilmiştir. *T. anatolicum* ekstraktı yüksek dozdan (2000 µg/ml) düşük doza (10 µg/ml) yatay olarak seyreltilmiştir. Kontrol (besiyer) kuyucukları hariç her göze $5x10^3$ hücre ektikten sonra 48 saat 37°C de inkübe edilmiştir. Her göze XTT solüsyonu eklenerek canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerinin oluşması için 4 saat bekletilmiştir. Hücre üremesindeki inhibisyon, kromojenik ürünün 460-650 nm (referans 630 nm) dalga boylarında ELISA okuyucu ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve IC_{50} (hücrelerin %50'sinin yaşadığı kimyasal konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir.



Şekil 3.9.1. Tetrazolium tuzlarının indirgenerek formazan kristaline dönüşümü

3.10. TBE (Mavi Trifan Boyasının Dışlanması) Method ile Hücre Sayımı

Hücre canlılığını belirlemek için (3Z,3'Z) -3,3'-[(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-diyl)di(1Z)hydrazin-2-yl-1-ylidene]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonic acid) (tryan blue) denilen diazo boya maddesi kullanılmıştır. *T. anatolicum* ekstraktı ile muamele edilen HEPG2 hücre hattında hücre canlılığı tespit edilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kaplarına 10^5/ml ekilen HEPG2 hücre hattı 48 saat 37°C de inkübe edilir. Sonrasında makromantar ekstraktı ile muamele edilen hücre hattı 24 saat 37°C de inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk Hank's salt solution ile yıkandıktan sonra hücreler Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılır ve Tripsin-EDTA' nın hücre üzerindeki etkisini yok etmek için her kuyucuğa RPMI-1640 besiyerinden eklenir. Sayım için hazırlanan hücre solüsyonlarından 100 µl alınıp üzerine trypan blue boya maddesinden 100 µl eklenip iyice karıştırıldıktan sonra Thoma lamında sayım yapılır. Canlı hücreler metabolik olarak aktif olduklarından dolayı bünyesine giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler metabolik olarak inaktif olduklarından dolayı boya maddesini bünyesine alır, ancak hücre dışına çıkartamaz ve mavi renkte görülür. Makromantar ekstraktının çeşitli konsantrasyonları hücre canlılığına (cell viability) karşı belli bir oran vermektedir. Bu oran sonucunda IC_{50} değeri elde edilir. Hücre canlılığı (%) olarak hesaplanmıştır.

$$(\%)\text{Hücre canlılığı} = [\mathbf{Ab\text{-}Ac} / \mathbf{Bb\text{-}Bc}] \times 100$$

Ab: ekstrakt ile muamele edilmiş hücrelerin ortalaması

Ac: ekstrakt ile muamele edilmiş hücre barındırmayan medium ortalaması

Bb: kontrol hücrelerin ortalaması

Bc: hücre barındırmayan medium ortalaması

3.11. FLOW Sitometri Yöntemi ile Hücre Canlılığı Analizi

Flow sitometri yöntemi, partiküllerin veya hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesi işlemidir. Akım sitometrisi ile süspansiyon halindeki partieküller ya da hücreler, lazer ışığı ile aydınlatılan bölmeden geçirilerek, hücrelerin ışıkla temas ettiği anda verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrelerin büyüklük, granülaritesi gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi, hücrelere bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece partiküllerin ya da hücrelerin canlılığı, immün fenotipi, DNA içeriği, hücre membran potansiyeli, enzim aktiviteleri gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (Dunphy, 2004).

Hücre ölümünün iki metodu olan kontrollü hücre ölümü (apoptoz) ve kontrolsüz hücre ölümü (nekroz) temelde morofolojik, biyokimyasal ve biyolojik farklılıklarına dayalıdır (Majno, 1995). Apoptoz; hücre gelişiminin düzgün ilerlemesi ve hücrelerin hayatta kalması için gerekli olan programlanmış hücre ölümüdür. Bazı zamanlarda hücre, gelişme sırasında aşırı üretilir, örnek verilirse fetüs el ve ayak parmaklarının oluşumu, yetişkin beyin nöral gelişimi (Hutchins, 1998) ve üreme organlarının gelişimi apoptoz olayı ile ortaya çıkmaktadır (Meier, 2000). Apoptoz oluşum nedenleri olarak, DNA hasarına neden olan kimyasallar, U.V. ışınları, oksidatif stres, DNA tamir mekanizmasındaki aksaklıklar ve hücre yüzeyi reseptörlerinin bağlanması sayılmaktadır (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html). Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, kusurlu olan hücrelerin giderilmesinde, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlama apoptozun avantajları olarak kabul edilmektedir. Nekroz; doku ölümü olarak da bilinen, çok sayıda hücrenin, dokunun ya da organın geri dönüşümsüz hasar görmesi sonucunda oluşan patolojik ölümdür. Nekroz oluşum

nedenleri kanser, zehirlenme, enfarktüs, yaralanma, enflamasyon ve enfeksiyon olabilir. Hücre ölümünün iki farklı karakterdeki mekanizmaları olan apoptoz ve nekroz için flow sitometri yöntemi kullanılmıştır. Tüm ölçümler floresan aktivite akım sitometrisi (Flow Cytometry BD FACSAria III) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11.1).



Şekil 3.11.1. Akım sitometre sistemi (FACS AriaIII)

6 kuyucuklu plakalara $2x10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekilen HEPG2 hücreleri, 25 µg/ml, 250 µg/ml ve 1000 µg/ml *T. anatolicum* su ekstraktı ile 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin *T. anatolicum* ekstraktıyla muamele edilmesiyle oluşan apoptoz ve nekroz, Annexin-V-apc/7AAD floresan boyaları ile flow sitometride ölçülmüştür.

3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama

3.12.1. Xcellingence Sistem Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Sistem hücre kültürü E-plakalarının zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü yapar (Roche Diagnostics GmbH., 2008) (Şekil 3.12.1.1). Hiçbir işaretleme yapmadan gerçek zamanlı olarak analiz eder. Hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir (Xing JZ. ve Ark., 2005).



Şekil 3.12.1.1. Xcellingence Sistem Gerçek Zamanlı Hücre Analizinde kullanılan E-plate

T. anatolicum ekstraktının HEPG2 (insan karaciğer karsinoma) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisine RT-CES 16X kullanılarak (ACEA Biosciences, San Diego, CA) bakılmıştır. CO_2 inkübatörü içinde tutulan 16 kuyucuklu E-plakalar içerisine 150.000/ml ekilen HEPG2 (insan karaciğer karsinoma) hücreleri %10 FBS (Fetal sığır serumu) ve %1 Gentamisin takviye edilmiş RPMI-1640 besiyeriyle kültüre edilmiştir. HEPG2 hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Cihaza yerleştirilen E-plakalardaki HEPG2 hücrelerinin hücre katsayısı 1.00'e ulaştıktan sonra *T. anatolicum* ekstraktının çeşitli konsantrasyonları (1-5-25-50-100-250-500 µg/ml) eklenmiştir. *T. anatolicum* ekstraktının 24 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen kuyucuklara H_2O_2 eklenmiştir. Eklenen H_2O_2 'in 2 saat inkübasyonu sonrasında HEPG2 hücrelerinin durumu gözlenmiştir. Hücre proliferasyon indeksi için her bir kuyucuktaki veriler on beş dakikada bir eş zamanlı impedans ölçümü ile sayısal veri aktarımı sağlayarak deney sonunda her bir kuyucuğun ortalama CI değerini hesaplamaktadır.

3.13. İstatistiksel Analiz

Belirtilen analiz sürecinde, tüm deneyler üç tekrar halinde yapılmıştır. Deney sonuçları ortalama ± standart sapma olarak ifade edilir. Veri analizi ve grafikler GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oksidatif stres oluşturulmuş ve oluşturulmamış durumlar arasındaki özütün konsantrasyonlarının etkisini belirlemek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır.

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktı Üzerine Yapılan Analizler

Mantarın toz haline getirilmesi işleminden sonra ultra saf su ve metanol solüsyonları ile sonikatör cihazı kullanılarak ekstraktlar hazır hale getirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında liyofilizatör cihazı yardımıyla kurutularak toz haline getirilen mantar örneklerinde en yüksek verimlilik, su ile yapılan ekstraksiyonda sağlanmıştır. Metanolle yapılan ekstraksiyonda evaporatör cihazı ile alkolü uzaklaştırma işlemi sonucunda ekstraktın miktarında büyük miktarda azalma olmaktadır. Su ile yapılan ekstraksiyonda ise bu işleme gerek kalmadığından dolayı direk liyofilizasyon işlemiyle yoğunlaştırılarak toz haline getirildiği için daha fazla verim elde edilir.

Çizelge 4.1.1. Mantarların liyofilizatör sonrasındaki verimlilikleri

	Su (gr)	Metanol (gr)
Tricholoma anatolicum	3.9353	0.9571

Elde edilen mantar ekstraktı kullanılarak, içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin HPLC ile tayini, sitotoksisite testi ve IC_{50} değerinin belirlenmesi, hepatoprotektif etkisinin belirlenmesi için analizler yapılmıştır.

4.2. *Tricholoma anatolicum* Ekstraktının Fenolik Bileşiklerin Miktarları

Meyve ve sebzelerde, tüm bitkisel kökenli gıdalarda farklı nitelikte ve farklı miktarda pek çok fenolik bileşik bulunmaktadır. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelere kendilerine has tatlarını veren bileşiklerdir. Fenolik bileşikler insan sağlığı açısından işlevleri, bulundukları gıdalarda tat ve koku oluşumunu sağlaması, anti mikrobiyal, anti oksidatif etki, anti kanser, anti biyotik, anti viral, anti fungal vs. gibi önemli tedavi edici etkilere sahiptir. Meyve ve sebzelerde olduğu gibi mantarlarda da fenolik bileşik miktarı oldukça fazladır. Bu nedenle içerdikleri fenolik bileşiklerin miktarını tayin edebilmek adına yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır.

Çizelge 4.2.1. Fenolik bileşen standartları ve dalga boyları

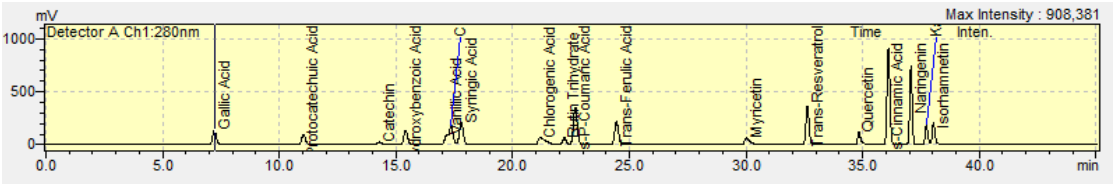
Fenolik Bileşen Standartları	EHTA	FHTA	FETA	nm
Gallik asit	4.832	1.380	4.730	330
Protokateşik asit	6.123	3.516	1.092	330
Kateşin	14.374	21.798	24.342	330
4-hidroksibenzoik asit	7.009	11.875	4.402	280
Vanilik asit	6.414	1.276	2.502	280
Kafeik asit	0.187	0.043	0.040	330
Sirincik asit	0.104	0.156	0.848	280
Klorocenik asit	0.075	No peak	0.050	280
Rutin trihidrat	2.651	No peak	0.438	280
Trans-P-komarik asit	0.019	0.046	0.419	280
Trans ferulik asit	0.987	0.030	0.164	280
Mirisetin	0.211	No peak	0.093	280
Trans-Resveratrol	0.019	No peak	0.027	280
Kuarsetin	0.489	0.601	0.630	280
Trans sinnamik asit	1.320	0.570	1.063	280
Narincenin	0.359	0.305	0.314	280
Kaemferol	No peak	No peak	No peak	-
Isorhamnetin	2.164	1.578	1.680	280

Ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen sulu (H_2O) ekstraksiyon mantar ekstraktı (EHTA), fraksiyon yöntemiyle elde edilen sulu (H_2O) fraksiyon mantar ekstraktı (FHTA) ve etil asetatlı (EtOAc) fraksiyon mantar ekstraktı (FETA) ndan 10 mg tartılmıştır. Tartılan örneklere 1 ml ultra saf su ardından 1 ml metanol ilave edilmiş ve çözülmesi sağlanmıştır. Hazır hale getirilen örnekler HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

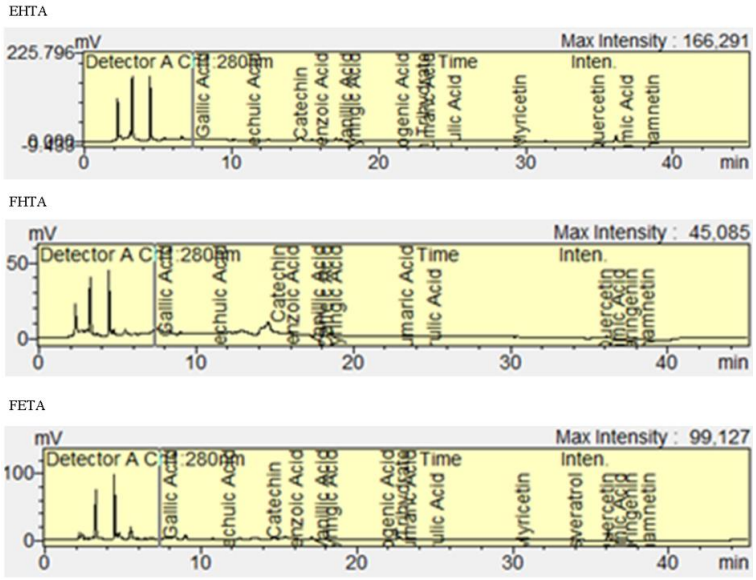
Çizelge 4.2.2. Mantar ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikler

Fenolik Bileşik Standartları	EHTA		FHTA		FETA	
	Ort.	Standart Sapma	Ort.	Standart Sapma	Ort.	Standart Sapma
Gallik asit	28,75	6,27	61,81	4,74	11,07	1,37
Protokateşik asit	55,77	24,85	36,43	9,45	13,09	2,21
Kateşin	185,51	15,99	871,93	532,48	32,55	31,42
4-Hidroksibenzoik asit	46,99	5,50	30,09	0,91	68,73	5,18
Vanillik asit	138,78	20,92	15,43	2,25	60,21	7,42
Kaffeik asit	3,39	5,87	3,63	3,14	0,00	0,00
Siringik asit	9,39	5,78	3,37	4,06	15,57	3,84
Klorogenik asit	8,07	4,41	0,25	0,43	2,11	1,71
Rutin Trihidrat	5,60	6,15	0,00	0,00	9,88	8,26
Trans-P-Kumarik asit	1,42	1,03	0,81	0,01	9,08	1,38
Trans-Ferulik asit	6,29	0,63	0,56	0,10	4,79	2,09
Mirisetin	3,35	2,18	0,00	0,00	0,97	0,11
Trans-Resveratrol	0,37	0,36	0,00	0,00	0,53	0,23
Kuersetin	7,64	2,08	12,62	0,72	13,71	0,27
Trans-Sinnamik asit	15,57	1,24	9,24	0,78	20,33	1,09
Naringenin	0,00	0,00	3,64	0,54	2,79	1,38
Kaempferol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Isorhamnetin	39,22	1,66	28,15	0,83	28,86	0,51

HPLC cihazında mantar ekstraktlarındaki fenolik bileşik miktarları ölçülmüştür. Fenolik metot kalibrasyon verilerindeki kromotogram görünümüne göre mantar ekstraktlarının kromotogram görünümleri de alınmıştır (Şekil4.2.1, 4.2.2).



Şekil 4.2.1. HPLC cihazının kalibrasyon kromotogram görünümü

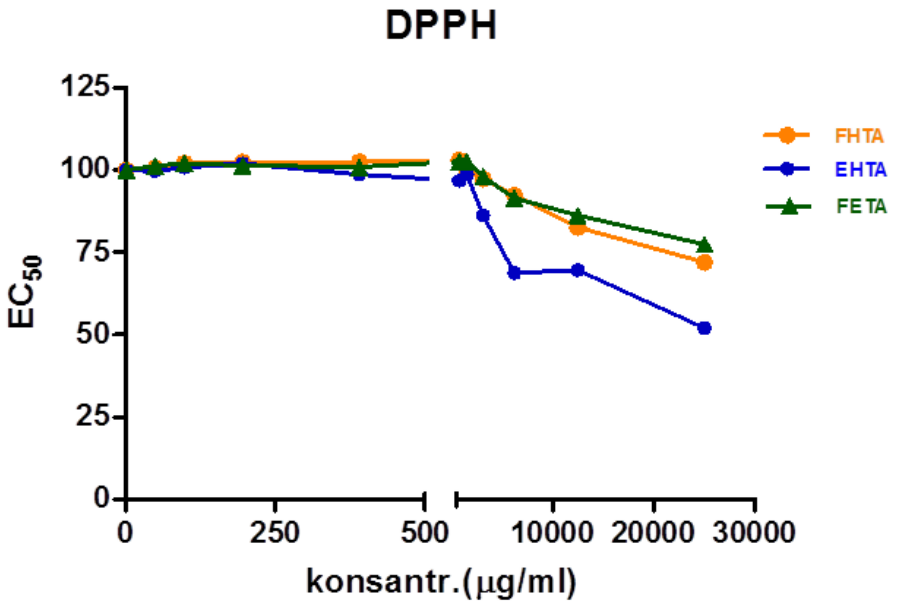


Şekil 5.2.2. Mantar ekstraktları olan EHTA, FHTA ve FETA 'nın kromotogram görünümleri

Kalibrasyon kromotogram görünümüne göre mantar ekstraktlarında genel olarak fenolik bileşik içerdiğini gösteren pik görünmemektedir. EHTA ekstraktında, kateşin ve vanilik asit pik verirken, FHTA ekstraktında ise sadece kateşin pik vermiştir. FETA ekstraktında, fenolik bileşik içeriği çok düşüktür ve pik vermemiştir.

4.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

T. anatolicum'un sulu ve MetOH ile fraksiyondan elde edilen ekstrakt antioksidan aktivitesi DPPH metodu ile belirlenmiştir. 50 mg tartılan mantar ekstraktları %80 MetOH ile çözdürüldükten sonra en yüksek konsantrasyonları 25 mg/ml olacak şekilde seri dilüsyon uygulanmıştır. İnkübasyon süresinden sonra ekstraktların antioksidan aktivitesi, 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunlukları belirlenmiştir. Ekstraktlardaki antioksidan miktarları EC_{50} (%50'sinin etkili olduğu konsantrasyon) değerlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. *T. anatolicum* ekstraktlarının EC_{50} değerlerinin GraphPad Prism 5.01 programında gösterimi

Çizelge 4.3.1. *T. anatolicum* ekstraktlarının DPPH metodu sonucunda elde edilen EC_{50} (%50'sinin etkili olduğu konsantrasyon) değerleri

Ekstrakt Adı	EC_{50} (µg/ml)
EHTA	25.000
FETA	> 25.000
FHTA	> 25.000
Quarsetin	100

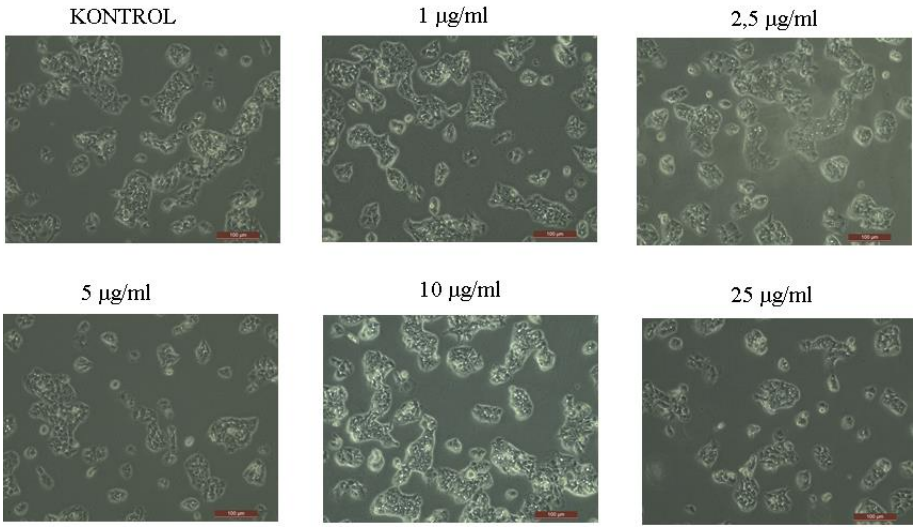
4.4. Sitotoksisite Test Sonuçları, IC_{50} Değerleri

T. anatolicum'dan elde edilen sulu ekstraktın (EHTA) HEPG2 karaciğer kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. TBE, XTT ve Xcelligence gibi çeşitli sitotoksisite metodlarında HEPG2 hücre hattı üzerinde mantarın sulu ekstraktının sitotoksik etkisine ve hepatoprotektif etkisine bakılmıştır.

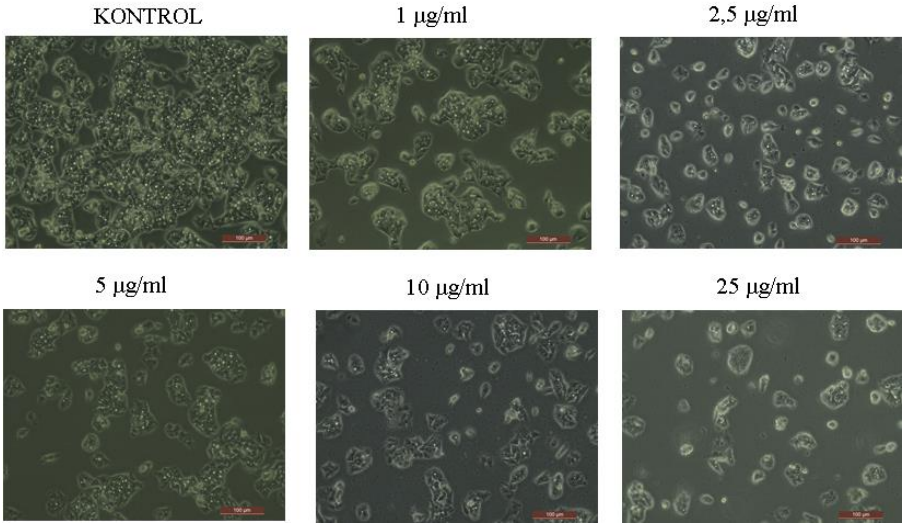
4.4.1. TBE (Mavi Trifan Boyasının Dışlanması)Metodunun Sonuçları

HEPG2 hücreleri *T. anatolicum* sulu ekstraktından (EHTA) 12,551025-50-100-250-500 µg/ml konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. EHTA ekstraktının HEPG2 hücre hattı üzerindeki etkili olup olmadığı mikroskopta gözlenmiş ve konsantrasyon arttıkça HEPG2 hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin arttı belirlenmiştir.

EHTA ekstraktının en yüksek 25 µg/ml olduğu belirli doz aralıkları HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve heapotoprotektif etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre düşük doz aralıklarında HEPG2 hücrelerinin morfolojilerinde değişiklik gözlenmezken, yüksek doz aralıklarında hücrelerin boyutlarında küçülme ve hücrelerde şekil değişikliği gözlenmiştir. Düşük doz aralıklarında EHTA ekstraktının H_2O_2 'e göre hepatoprotektif etki (koruyucu etkisi) gözlenmiştir. Ancak 10-25 µg/ml konsantrasyonlarında sitotoksik etki gözlenmiştir (Şekil 4.4.1.1, 4.4.1.2, 4.4.1.3).

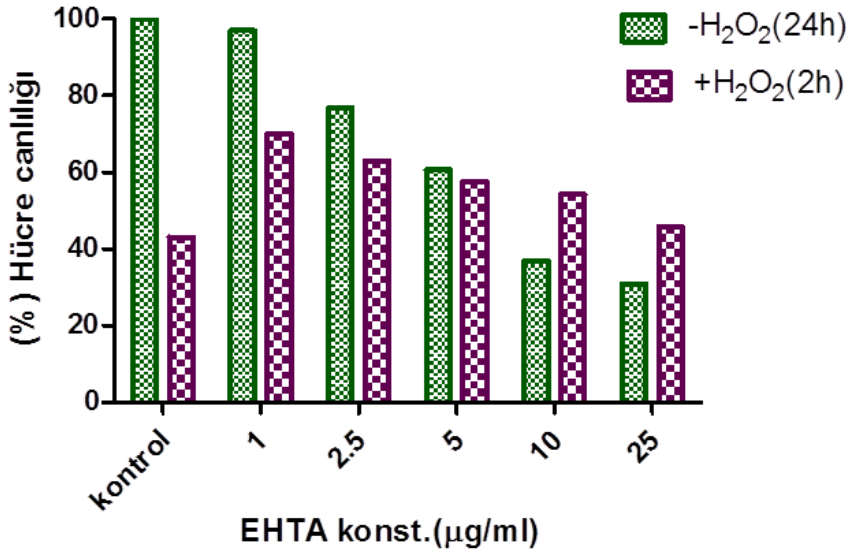


Şekil 4.4.1.1. HEPG2 hücrelerine en yüksek konsantrasyon 25 µg/ml olan EHTA ekstraktının eklenmesinden 24 saat sonrası



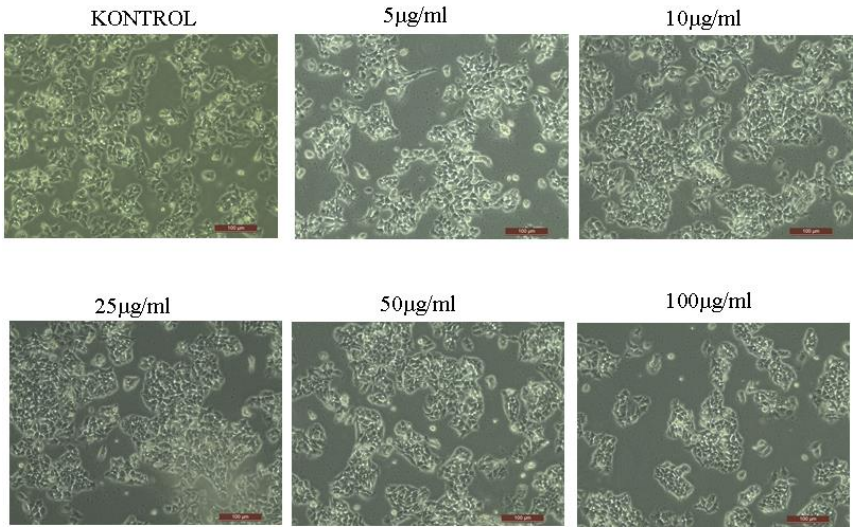
Şekil 4.4.1.2. HEPG2 hücreleri ile en yüksek 25 µg/ml olan EHTA ekstraktlarının ekli olduğu 6 kuyucuklu kültür plakasına H_2O_2 eklenmesinden 2 saat sonrası

EHTA ekstraktının artan konsantrasyonları HEPG2 hücrelerinde % hücre canlılığını azalttığı grafikte görülmektedir. Ancak EHTA ekstraktı artan konsantrasyonları ile H_2O_2 birlikte HEPG2 hücrelerinde % hücre canlılığını arttırdığı grafikte görülmektedir. EHTA ekstraktı düşük dozlarda HEPG2 hücrelerinde H_2O_2 varlığında koruma sağlamaktadır.

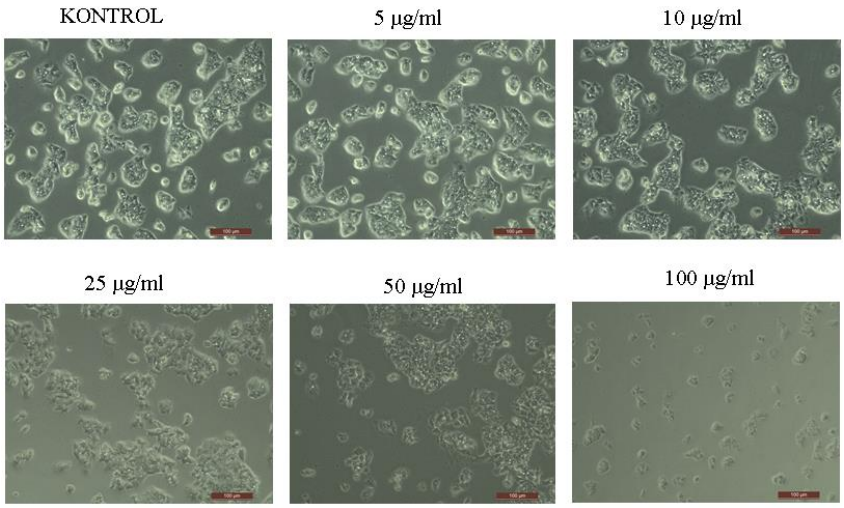


Şekil 4.4.1.3. HEPG2 hücre hattı üzerinde en yüksek 25 µg/ml olan TA ekstraktının ve H_2O_2 etkileri

En yüksek 100 µg/ml olan EHTA ekstraktının HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve hepatoprotektif etkilerine bakılmıştır. Düşük doz aralıklarında EHTA ekstraktı HEPG2 hücre gruplarının kopmasına neden olmuştur. Ancak yüksek dozlarda hücreler boyut olarak küçülmeye ve yapıştıkları yüzeyden kalkmaya başlamıştır. EHTA ekstraktının H_2O_2 ile birlikte HEPG2 hücresine uygulandığı kuyucuklarda ise düşük dozlarda hücre gruplarında kopmalar gözlenmiştir. Ancak yüksek doz aralıklarında EHTA ekstraktı ile H_2O_2 birlikte hücrelerin morfolojilerinin bozulmasına ve ölümüne neden olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 10 µg/ml-25 µg/ml olan EHTA konsantrasyonlarında H_2O_2'nin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruma sağlanırken, yükselen dozlarda EHTA ekstraktının sitotoksik etkisi koruyucu etkisini baskılamaktadır (Şekil 4.4.1.4, 4.4.1.5)

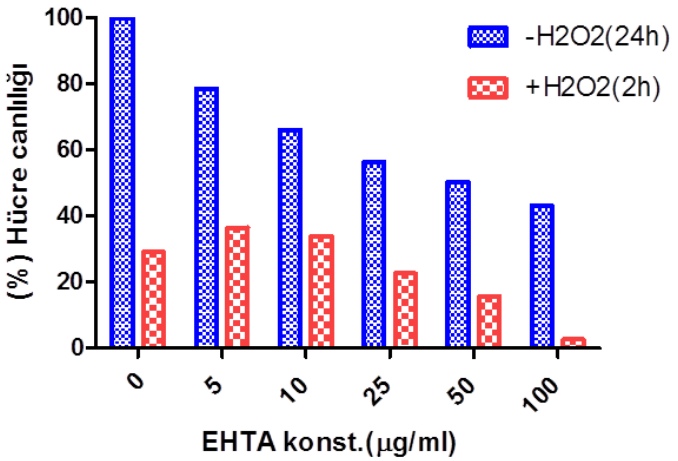


Şekil 4.4.1.4. HEPG2 hücrelerine en yüksek konsantrasyon 100 µg/ml olan EHTA ekstraktının eklenmesinden 24 saat sonrası



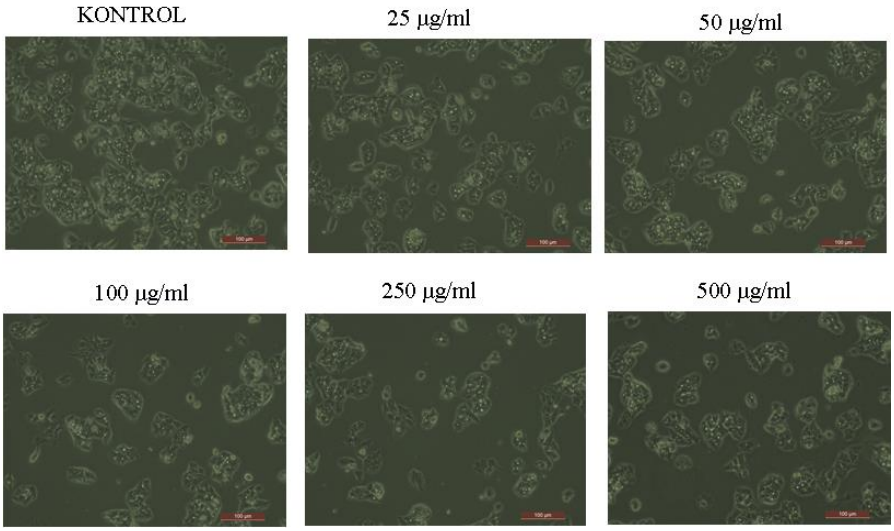
Şekil 4.4.1.4. HEPG2 hücreleri ile en yüksek 100 µg/ml olan EHTA ekstraktlarının ekli olduğu 6 kuyucuklu kültür plakasına H_2O_2 eklenmesinden 2 saat sonrası

En yüksek 100 µg/ml olan EHTA ekstraktının uygulandığı HEPG2 hücrelerinde artan dozlarda % hücre canlılığının azaldığı, EHTA ekstraktının artan konsantrasyonlarının H_2O_2 ile birlikte uygulandığı hücrelerde ise sitotoksik etki grafikte görülmektedir.

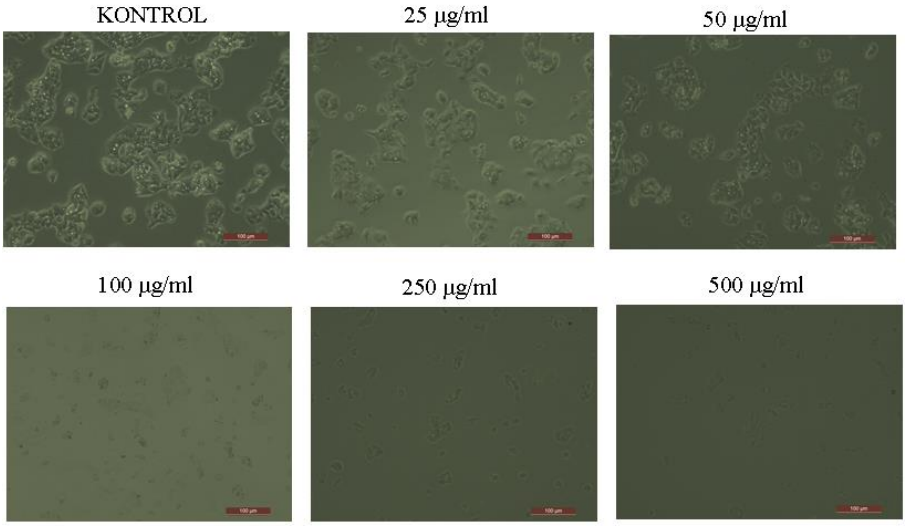


Şekil 4.4.1.5. HEPG2 hücre hattı üzerinde en yüksek 100 µg/ml olan EHTA ekstraktının ve H_2O_2 etkileri

En yüksek 500 µg/ml olan EHTA ekstraktının HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve hepatoprotektif etkilerine bakılmıştır. Düşük dozlarda EHTA ekstraktı ile H_2O_2 birlikte hücrelerin morfolojilerinde çok az etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 25 µg/ml olan EHTA konsantrasyonlarında H_2O_2'nin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruma az da olsa görülürken, yükselen dozlarda EHTA ekstraktının sitotoksik etkisi koruyucu etkisini baskılamaktadır. 100 µg/ml-250 µg/ml EHTA konsantrasyonlarında yapışan HEPG2 hücreleri kalkmaya başlamış ve hücrelerde şekil bozukluğu gözlenmiştir. 500 µg/ml EHTA konsantrasyonun olduğu kuyucuktaki hücreler ise tamamen ölmüştür (Şekil 4.4.1.6, 4.4.1.7, 4.4.1.8).

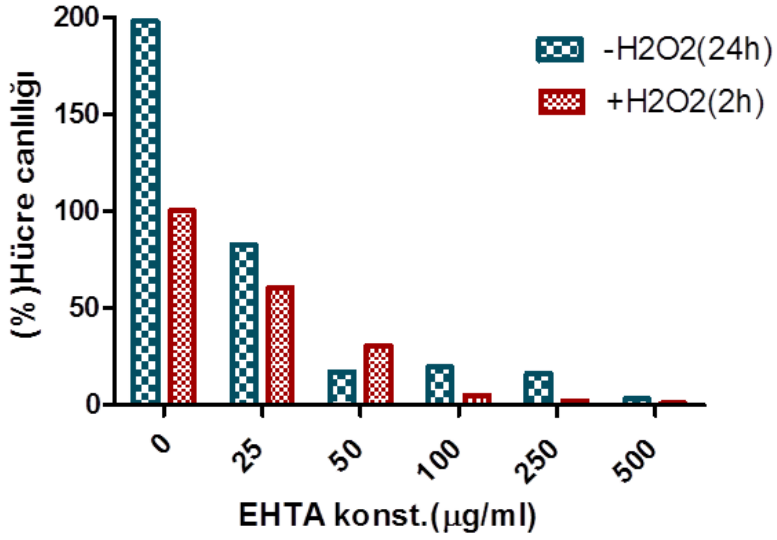


Şekil 4.4.1.6. HEPG2 hücrelerine en yüksek konsantrasyon 500 µg/ml olan EHTA ekstraktının eklenmesinden 24 saat sonrası



Şekil 4.4.1.7. HEPG2 hücreleri ile en yüksek 500 µg/ml olan EHTA ekstraktlarının ekli olduğu 6 kuyucuklu kültür plakasına H_2O_2 eklenmesinden 2 saat sonrası

HEPG2 hücrelerine artan dozlarda uygulanan EHTA ekstraktı 50 µg/ml'den sonra % hücre canlılığını en aza indirdiği gözlenirken, EHTA ekstraktı ile H_2O_2 birlikte uygulandığı HEPG2 hücrelerinde yüksek dozların sitotoksik olduğu grafikte görülmektedir.



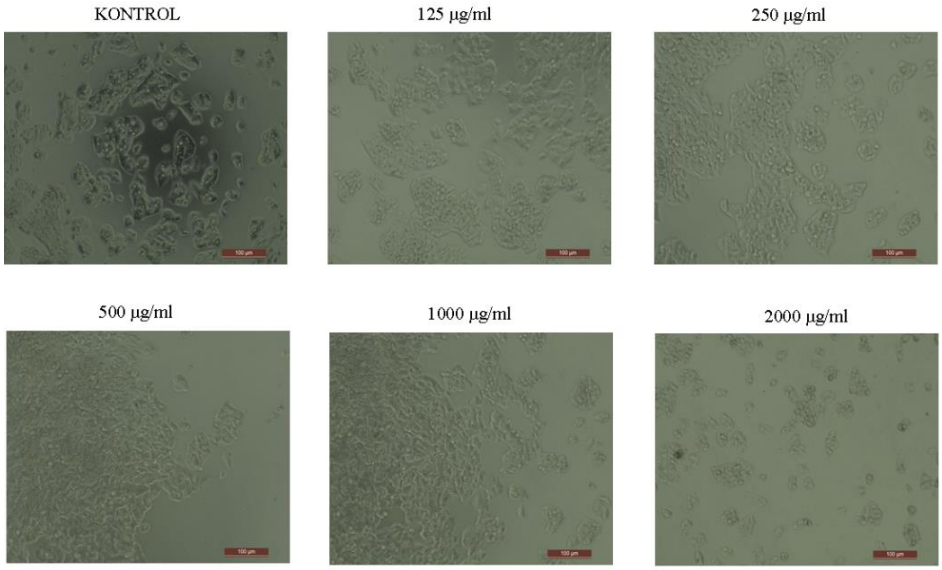
Şekil 4.4.1.8. HEPG2 hücre hattı üzerinde en yüksek 500 µg/ml olan EHTA ekstraktının ve H_2O_2 etkileri

4.4.2. XTT Metodunun Sonuçları

96 kuyucuklu kültür plakalarına ekilen 10^5/ml HEPG2 hücreleri 24 saat plaka yüzeyine tutunması ve büyümesi beklenmiştir. İnkübasyon sonrasında HEPG2 hücrelerine EHTA ekstraktından, en yüksek 2000 µg/ml konsantrasyonundan seri

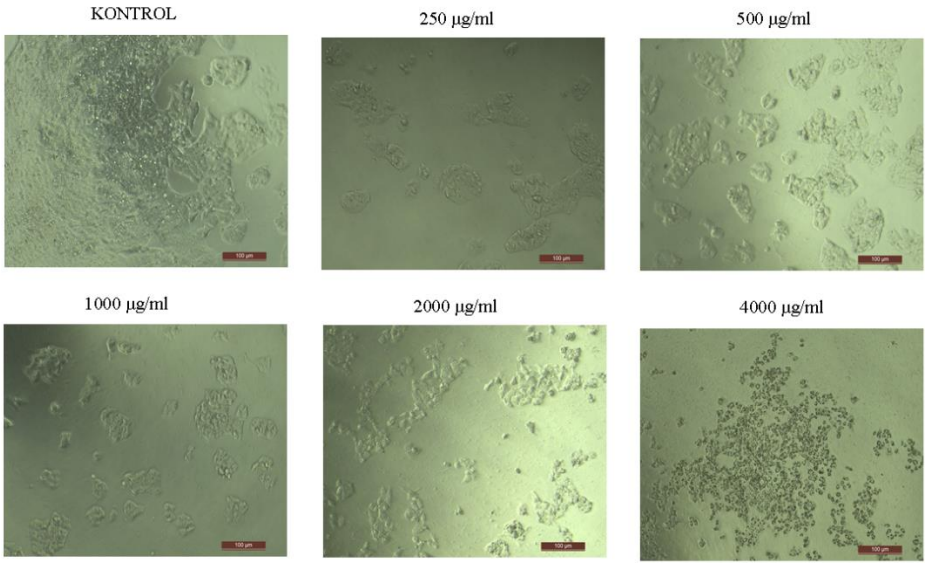
dilüsyon şeklinde 24 saat ve aynı şekilde en yüksek 4000 µg/ml konsantrasyonundan seri dilüsyon şeklinde 72 saat uygulanmıştır. EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerinde etkili olup olmadığı mikroskopta değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.2.1, 4.4.2.2). EHTA ekstraktının artan konsantrasyonlarında HEPG2 hücrelerinde morfolojik bozulmalar gözlenmiştir.

En yüksek 2000 µg/ml olan EHTA ekstraktının HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve hepatoprotektif etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 24 saat boyunca uygulanan EHTA ekstraktı, artan dozlarda sitotoksik etkisi hepatoprotektif etkisini baskılamaktadır (Şekil 4.4.2.3).



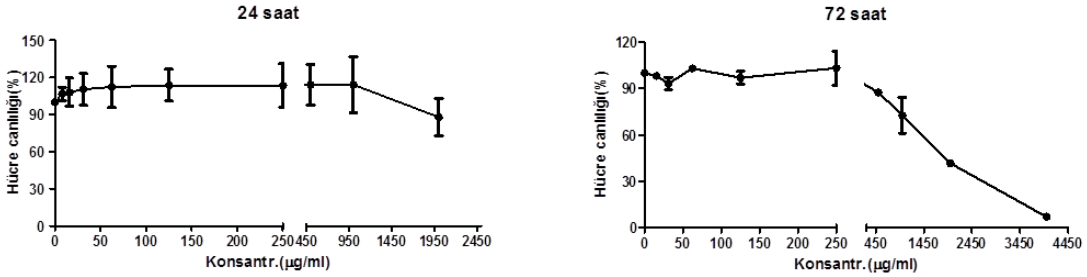
Şekil 4.4.2.1. HEPG2 hücre hattı üzerinde EHTA ekstraktının 24 saat en yüksek 2000 µg/ml olan konsantrasyonun mikroskop görüntüleri

En yüksek 4000 µg/ml olan EHTA ekstraktının HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitostatik etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, EHTA ekstraktının artan dozları 0-72 saatleri içerisinde HEPG2 hücrelerinin büyümesini durduğu ve hücre sayısında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Ancak HEPG2 hücrelerinde EHTA ekstraktı, 72. saatten sonra sitotoksik etki göstermeye başlamıştır (Şekil 4.4.2.2).



Şekil 4.4.2.2. HEPG2 hücre hattı üzerinde EHTA ekstraktının 72 saat en yüksek 4000 µg/ml olan konsantrasyonun mikroskop görüntüleri

EHTA ekstraktı HEPG2 hücrelerinde 24-72 saat uygulanmış ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. EHTA ekstraktının 24 saat IC_{50} değeri > 2000 µg/ml, 72 saat IC_{50} değeri 1525 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.2.3).



Şekil 4.4.2.3. HEPG2 hücre hattı üzerinde EHTA ekstraktının 24 saat en yüksek 2000 µg/ml olan konsantrasyonun ve 72 saat en yüksek 4000 µg/ml olan konsantrasyonun etkilerinin konsantrasyonlara bağlı (%) hücre canlılığının x-y dağılım grafiği

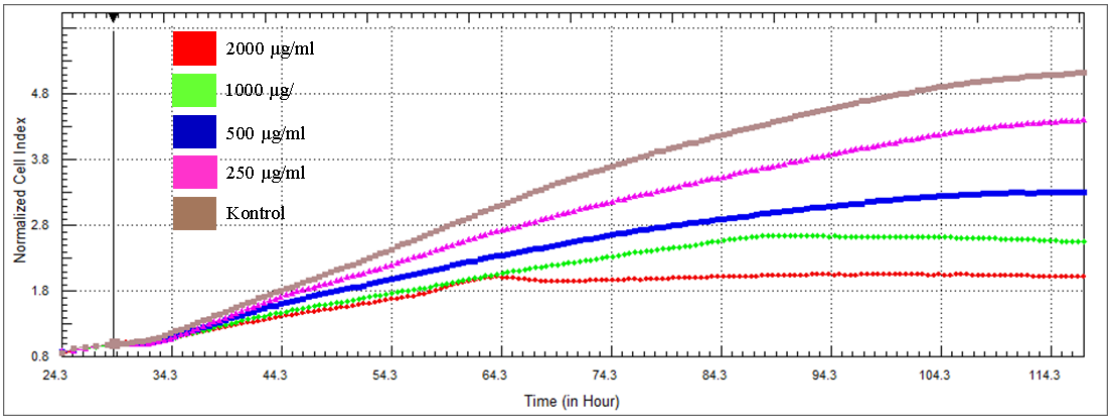
4.5. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sonuçları

4.5.1. Xcellingence Sistem Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sonuçları

RT-CES 16X kullanılarak (ACEA Biosciences, San Diego, CA) cihazına yerleştirilen 16 kuyucuklu E-plakalara ekilen HEPG2 karaciğer kanser hücrelerinde EHTA ekstraktının sitotoksik ve sitostatik etkisine bakılmıştır.

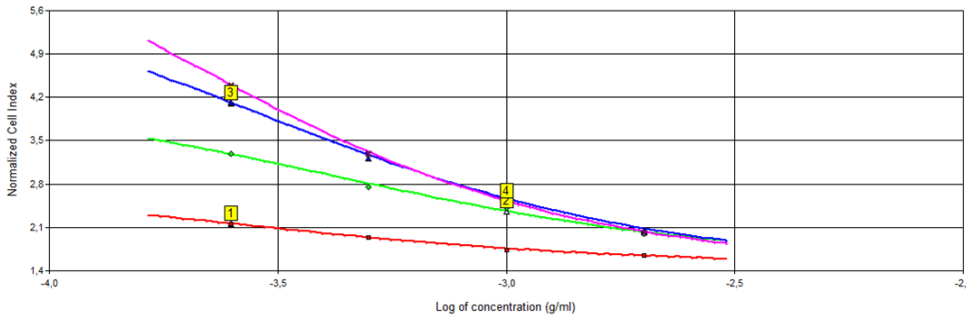
EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi için 250-500-1000-2000 µg/ml konsantrasyonları uygulanmıştır. E-plakaya 10^5/ml ekilen

HEPG2 hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre katsayısının 1.00'e ulaşması sonucunda belirlenen kuyucuklara hazırlanan EHTA ekstrakt konsantrasyonları eklenmiştir. Hücre kontrol ve besiyeri kontrole ise besiyeri eklenmiştir (Şekil 4.5.1.1).



Şekil 4.5.1.1. EHTA ekstrakt konsantrasyonlarının 87 saat uygulandığı HEPG2 hücrelerinin hücre endeks-zaman grafiği

Xcelligence sistemini kullanarak HEPG2 hücre hattı üzerinde 24-48-72-87 saat *T. anatolicum* ekstraktının 250-500-1000-2000 µg/ml konsantrasyonları uygulanmıştır. Sonuçlar doz cevap eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 5.4.5). Elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri 24 saatte 241.539 µg/ml, 48 saatte 418.135 µg/ml, 72 saatte 285.694 µg/ml ve 87 saatte 185.495 µg/ml olarak saptanmıştır (Şekil 4.5.1.2).



Saat	IC_{50} Değerleri(µg/ml)
(1) 24 saat	241,539
(2) 48 saat	418,135
(3) 72 saat	285,694
(4) 87 saat	185,495

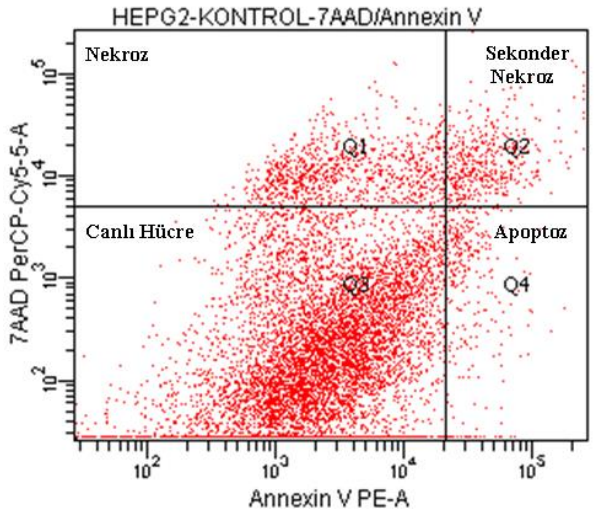
Şekil 5.4.3.1.2. EHTA ekstrakt konsantrasyonlarının 24-48-72-87 saat uygulandığı HEPG2 hücrelerinin IC_{50} eğri grafiği

4.6. FLOW Sitometri Yöntemi ile Hücre Canlılığı Analizi Sonuçları

Flow sitometri yönteminde, akım sitometrisi ile süspansiyon halindeki HEPG2 hücreleri, lazer ışığı ile aydınlatılan bölmeden geçirilerek, hücrelerin ışıkla temas ettiği anda verdikleri sinyallere göre dört farklı bölge oluşmaktadır. Bu bölgeler dot plot grafiğinde Q1, Q2, Q3 ve Q4 olarak gösterilmektedir. Q1 bölgesi, hücrelerin nekroza uğradığını, Q2 bölgesi, hücrelerin apoptoza ve nekroza uğradığını, Q3 bölgesi, hücrelerin canlı olduğunu ve normal metabolik aktivitelerini sergilediğini ve Q4 bölgesiyse, hücrelerin apoptoza uğradığını göstermektedir. Hücre canlılığı analizinde Annexin-V-apc ve 7AAD adında iki tane floresan boya kullanılmaktadır. 7AAD floresan boyası canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılırken, Annexin-V-apc floresan boyası hücrelerin ölüm safhalarını belirlenmesinde kullanılmaktadır.

HEPG2 hücreleri $2x10^5$ hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara ekilen HEPG2 hücrelerinin plaka yüzeyine tutunmaları için beklendikten sonra *T. anatolicum* ekstraktının 25 µg/ml, 250 µg/ml ve 1000 µg/ml olarak belirlenen konsantrasyonlar ile 72 saat muamele edilmiştir. *T. anatolicum* ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerindeki antikanser etkisine flow sitometri yöntemi ile bakılmıştır.

Unstained dot blot grafiği, akım sitometri cihazında (Flow Cytometry BD FACSAria III) içerisinde floresan boya bulundurmayan hücre süspansiyonun ölçüldüğü grafiktir (Şekil 4.6.1). Bu ölçümün amacı, hücrelerde otofloresan özellik varsa indirgenmesinin sağlandığı kalibrasyon işlemidir. Bu işlemden sonraki tüm ölçümler unstained dot plot (nokta alan) grafiğine göre alınır. Dot plot (nokta alan) grafiğinde, ölçülen her bir nokta bir hücreyi göstermektedir. Dot plot grafiği ile iki floresan antikorunu da bünyesinde barındıran hücreler tespit edilir.

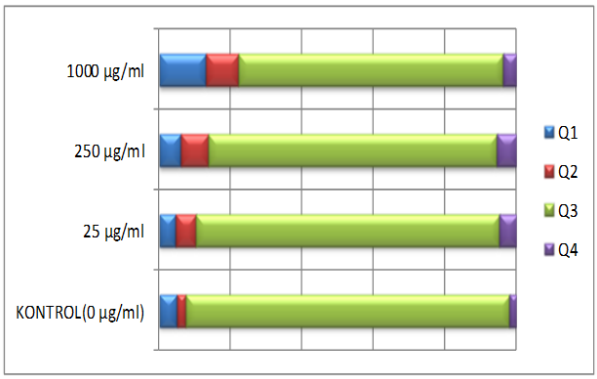


Şekil 4.6.1. Dot plot grafiğinde Q1, Q2, Q3 ve Q4 bölgeleri

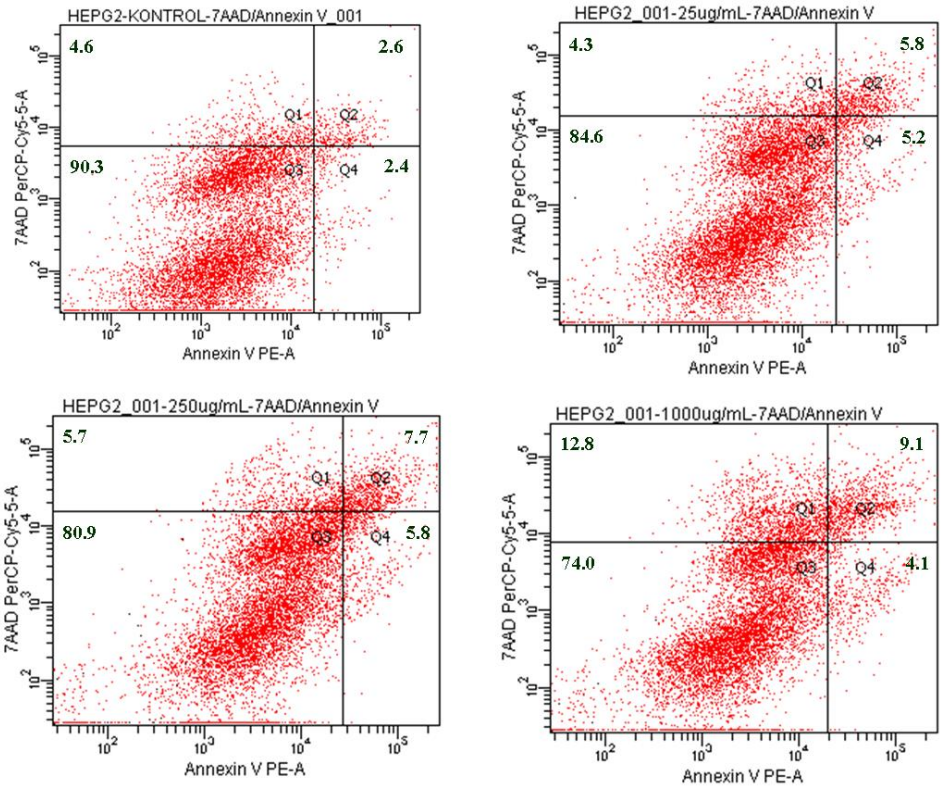
Çizelge 4.6.1. EHTA ekstrakt 0-25-250-1000 µg/ml konsantrasyonlarının HEPG2 hücreleriyle 72 saat muamelesi sonucunda akım sitometri yöntemiyle elde edilen popülasyon (%) değerleri

Konst.(µg/m)	Popülasyon Tüm Sonuçlar (%)			
	Q1 (Nekroz)	Q2 (Sekonder Nekroz)	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Apotoz)
KONTROL	4.6	2.6	90.3	2.4
25	4.3	5.8	84.6	5.2
250	5.7	7.7	80.9	5.8
1000	12.8	9.1	74.0	4.1

Flow sitometri yöntemi kullanılarak HEPG2 hücre hattı üzerinde 72 saat EHTA ekstrakt 0-25-250-1000 µg/ml konsantrasyonları uygulanmıştır. Sonuçlar doza bağlı olarak hücrelerin hangi hücre ölümüne uğradığı barr grafiğinde gösterilmiştir (Şekil4.6.2). Elde edilen sonuçlar 7AAD PerCp-Cy5-5-A-Annexin-V PE-A dot plot grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 5.4.4.3). Elde edilen sonuçlara göre kontrol (0 µg/ml) grubunda sol alt kadranda yer alan her iki floresan antikoru da taşımayan canlı hücre popülasyonu % 90.3 iken, yükselen konsantrsyonlarda canlı hücre popülasyonunun % oranı düşmektedir. 1000 µg/ml olan en yüksek konsantrasyonda sağ üst kadranda yer alan her iki floresan antikorunu da taşıyan ölü hücre popülasyonu % 9.1 iken, azalan konsantrasyonlarda ölü hücre popülasyonunun % oranı düşmektedir.



Şekil 4.6.2 EHTA ekstraktı 0-25-250-1000 µg/ml konstrasyonlarının 72 saat boyunca HEPG2 hücreleriyle muamelesi sonucu akım sitometrisi ile elde edilen popülasyon(%) değerlerinin barr grafiği



Şekil 5.4.4.3 EHTA ekstraktı 0-25-250-1000 µg/ml konstrasyonlarının 72 saat boyunca HEPG2 hücreleriyle muamelesi sonucu akım sitometrisi ile alınan dot plot grafikleri

Flow sitometri metodu kullanılarak yapılan çalışmalar *T. anatolicum* ekstraktının HEPG2 karaciğer kanser hücreleri üzerindeki doza bağlı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. HEPG2 hücre popülasyonunda doza bağlı olarak HEPG2 hücrelerinin ölümleri (apoptoz/nekroz) gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Dünyanın her yerinde bulunan ve yeryüzünde 1,5 milyon mantar türü olduğu düşünülmekte, 100.000 mantar türünün tanımlandığı ve bunların içinden yaklaşık 2500 adedinin yenilebildiği kaydedilmiştir (Tamer A.U., 2005). Mantarlar antik çağlarda, dini inanışlarda ve dini ritüellerde oldukça yaygın kullanılmıştır. Kabiledeki yerliler, sihirli ve halüsinojenik etkisi olduğuna inandıkları için ilaç, zehir ve iksir yapımında kullanmışlardır. Aynı zamanda insan diyetinde tadı ve aromasından dolayı uzun süredir tüketilmektedir.

Çalışmamızda ilk olarak *T. anatolicum* sulu ekstraksiyonu (EHTA), sulu fraksiyonu (FHTA) ve etil asetat fraksiyonu (FETA) sonucu elde edilen ekstraktlarının yüzde verimlilikleri araştırılmıştır. EHTA ekstraktı FETA ve FHTA ekstraktlarına oranla 3 kat daha fazla verimli olduğu tespit edilmiştir. *T. anatolicum* ekstraktlarının antioksidan aktivite değerlendirmesi için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)metodu 96 kuyucuklu mikro plakalarda uygulanmıştır. Yüksek konsantrasyonlara çıkıldığı için absorbansı fazla vermektedir. Bu nedenle zemin değeri (background) alınmıştır. Literatürde yapılan bir çalışmada, DPPH kontrol kuyucuklarına 300 µl DPPH ve metanol kontrol kuyucuklarına, 20 µl metanol + 280 µl DPPH ilave edilmiştir. Reaksiyonda DPPH ile ekstraktın pigmentleri arasındaki girişimi ortadan kaldırmak için, ekstraktın (20 µl) absorbansı, DPPH' sız metanol 280 µl' de ölçülmüştür (Uyar ve ark., 2011). DPPH metodu ile uygulanan artan konsantrasyonlarda IC_{50} değeri düşmektedir.

Diğer bir yandan mantarlar fenolik bileşik bakımından zengin gıdalardır. İçerdikleri birçok bileşik anti fungal, anti viral, anti mikrobiyal, anti kanser gibi etkiye sahiptir. Bu nedenle *T. anatolicum*' un yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC)yöntemi ile fenolik bileşik içeriği belirlenmiştir. HPLC metodunda uygulanan 100 g numunede bulunan 100 mg referans noktasına göre, EHTA ekstraktı kateşin ve vanilik asit fenolikleri için pik verirken, FHTA ekstraktı sadece kateşin fenoliği için pik vermiş ve FETA ekstraktı ise fenolik içeriğine dair pik vermemiştir. Kateşin antioksidan, anti-diyabetik, bir anti-inflamatuar, anti-mutajenik, anti-kanserojen ve antimikrobiyal aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri olan ve yeşil çayda bulunan ana fenolik bileşiklerden biridir (Jullian ve ark., 2007). Literatürdeki sonuçlara göre polar ekstraklar (su ve metanol), polar olmayan ekstraktlara (etil asetat)

göre daha fazla polar bileşik ihtiva ettiğinden dolayı daha yüksek antioksidan kapasitesi göstermiştir(Josiana ve ark.,2010). Sonuç olarak HPLC ve DPPH metodunda elde edilen sonuçlar birbirine paralel çıkmıştır. Uygulanan her iki metottaki sonuçlarda, fenolik içeriği literatürdeki lineer değerin çok altında olduğundan EHTA ekstraktının konsantrasyonlarına bağlı hepatoprotektif etkisi belirlenememiştir.

Anti kanser ajanlarının doza bağlı olarak hücre proliferasyonlarını etkiledikleri bilinmektedir. Kullanılan ajanların, her bir hücre tipine göre farklılık gösterdikleri literatürde yer almaktadır. Literatürde yer alan çalışmalardan bir tanesinde, metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrial enzimlerin, tetrazolyum tuzu azaltılmış XTT' nin ve portakal renkli formazan ürünün ELISA plaka okuyucusu kullanılarak ölçüldüğü ancak tripan mavi boyamada canlı hücre sayısı, canlı hücre sayımlarının sonucunda yüzde hücre canlılığı olarak dönüştürülmesiyle ölçüldüğü belirtilmektedir (Sakallı E., 2010). Hücre canlılığının belirlendiği XTT deneyleri ve TBE deneyleri birbirinden farklılık göstermektedir. XTT metodu indirek test olup hücrenin metabolik(mitokondrial aktivitelerine göre canlı olup olmadıkları) aktivitesine dayanırken, TBE metodu direk test olup hücrenin canlılığına dayanmaktadır. EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT deneyleri ile belirlenmiştir. XTT deney sonuçlarına göre 24 saat IC_{50} değeri > 2000 µg/ml, 72 saat IC_{50} değeri ise 1525 µg/ml olarak belirlenmiştir. *T. anatolicum* ekstraktı EHTA, karaciğer kanser hücre hattına uygulanmış ve doza bağlı aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, HEPG2 hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda EHTA ekstraktı ile H_2O_2 birlikte koruyucu etki göstermektedir. Ancak EHTA konsantrasyonları arttıkça EHTA - H_2O_2 birlikte toksik etkisi artmaktadır. Bütün tekrarlanan deney sonuçlarına göre 1-5 µg/ml konsantrasyonlarında EHTA ekstraktının HEPG2 hücrelerinde koruyucu etkisi görülmüştür. Fakat EHTA ekstraktının konsantrasyonu arttıkça koruyucu etki yerine sitotoksik etki gözlenmiştir. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda EHTA ekstraktı ile H_2O_2 etkileşim içine girmeye başladığı için koruyucu etki kaybedilmiştir. H_2O_2'in kullanımı homojen olmadığı ve 37 °C'de buharlaşma meydana geldiğinden dolayı bir diğer metotlarda uygulanmamıştır. Bu nedenle 24 saat aralığının değiştirilmesine karar verilmiştir. Ayrıca EHTA ekstraktı ve H_2O_2 kimyasalının aynı anda bulunmasının engellenmesi amacıyla yeni deney planı hazırlanmıştır.

Çeşitli anti kanser ajanların ve bitkisel özlerin sitotoksik aktivitesi genellikle DNA hasarına ve apoptoza neden olur (Rixe ve Fojo, 2007). Sitostatik reaksiyonların yanısıra, kanser hücrelerinin çoğalmasını önleme ile hücre döngüsünün bloke olmasına

ya da gecikmesini sağlamak için epirubisin ve siklofosfamid (kanserli hücre çoğalmasını durdurma) ve toksik sisplatin (karaciğer kanser hücre çoğalmasını durdurma) gibi sitositatik ilaçlar kanser tedavilerinde kullanılır (El-Mirve ark., 1998). Gerçek zamanlı hücre analizine göre EHTA ekstraktının 250-500-1000-2000 µg/ml konsantrasyonlarının 24-48-72-87 saat ile HEPG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve sitostatik etkileri belirlenmiştir. Sonuçlara göre, 24-48 saat arasında EHTA ekstraktının IC_{50} değeri iki katına çıkmış ve sitotoksik etki göstermiş, ancak 48 saat sonrasında EHTA ekstraktının HEPG2 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri yarı yarıya düşmüştür. Ayrıca HEPG2 hücreleri 87. saatin sonunda dahi HEPG2 hücrelerinin hücre indeksi 1.00'in altına düşmediği gözlenmiştir. Uygulanan EHTA ekstraktının zamana bağlı bir şekilde HEPG2 hücre canlılığında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle EHTA ekstraktının HEPG2 hücrelerinde 48 saat sonrasında sitostatik etki gösterdiği bulunmuştur. Hücre canlılığının araştırıldığı metotlarda IC_{50} değerleri farklılık göstermektedir. Sitostatik ilaçlar, antitümör etkilerini kanser hücrelerinin spesifik hücre yapılarını veya metabolik yolaklarını bozarak göstermektedirler (Block ve ark., 2007). Bu nedenle uygulanacak metodun seçimi önem taşımaktadır.

T. anatolicum'un sulu ekstraktı (EHTA), HEPG2 hücre hattı üzerindeki etkisi Annexin-V-apc ve 7AAD floresan boyalar yardımıyla akım sitometri yöntemiyle belirlenmiştir. EHTA ekstraktının 72 saat boyunca HEPG2 hücreleri ile muamelesi sonucunda HEPG2 hücre yolağındaki etkileri (apoptoz ve nekroz) gözlenmiştir. EHTA ekstraktının artan konsanrtrasyonlarında, Annexin-V-apc ve 7AAD olan iki floresan antikorunu taşımayan canlı hücre popülasyonunun (Q3 bölgesi) %'si azalmaktadır. Aynı zamanda artan konsantrasyonlar ile birlikte iki floresan antikoru taşıyan canlı hücre popülasyonunun (Q2 bölgesi) %'si artmaktadır. EHTA ekstraktının 1000 µg/ml konsantrasyonu diğer konsantrasyonlarına göre, HEPG2 hücrelerinin morfolojisini bozduğunu ve hücrelerin direk nekroza (kontrolsüz hücre ölümü) uğramalarına sebep olmuştur. Aynı şekilde EHTA ekstraktının 250 µg/ml konsantrasyonu diğer konsantrasyonlarına göre, HEPG2 hücrelerini apoptoza (kontrollü hücre ölümü) uğramalarını tetiklemiştir. Elde edilen sonuçlar, EHTA ekstraktının artan konsantrasyonları, HEPG2 hücre hattı üzerinde hücre ölümünü arttırdığını göstermiştir.

5.2 Öneriler

Türkiye'de endemik bir tür olan *T. anatolicum*, dış ülkelere ihracatta büyük bir pazar payına sahiptir. Türkiye'de yetişen, maddi açıdan gelir sağlayan bu mantarın biyolojik etkileri çok az bilinmektedir. Çalışmamızda *T. anatolicum*'un HEPG2 karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mantarın sulu ve metanolik ekstraktlarının fenolik bileşik içerikleri birbirinden farklı ve sulu ekstraktı daha fazla fenolik içerik barındırmaktadır. *T. anatolicum*'un sulu ekstraktı düşük dozlarda HEPG2 hücrelerinde H_2O_2 karşı bir koruma gösterirken, yüksek dozlarda sitotoksik etki göstermiştir. Mantarın sulu ekstraktı HEPG2 hücre yolağındaki (apoptoz ve nekroz) değişikliklere flow sitometri yöntemiyle bakılmıştır.

Bu mantar ile yapılacak olan daha sonraki çalışmalarda bu ekstraktın içeriğindeki maddeler araştırılarak, etken madde tespit edilmeleridir. Etken maddeler saflaştırılarak kanser hücreleri üzerinde uygulanabilir ve hedef odaklı çalışılabilir. Mantarın kanser hücre yolaklarındaki etkileri, hücre membran geçirgenliğine bağlı olan promidyum iyodür (PI) lekeleme yöntemiyle hücre boyutuyla DNA miktarı kıyaslanarak apoptotik hücre popülasyonu tayini uygulanabilir ve mantar ekstraktının hücredeki moleküler etkileri belirlenebilir. *T. anatolicum*'un moleküler boyutta biyolojik etkilerinin araştırılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

Adesanoye, O.A., Farombi, E.O., 2010, Hepatoprotective effects of Vernonia amygdalina (astereaceae) in rats treated with carbon tetrachloride, *Experimental And Toxicologic Pathology*, 62, 197-206.

Akamatsu S., Watanabe, A., Tamesada M., Nakamura R., Hayashi S., Kodama D., Kawase M., Yagi K., 2004, Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1957-1960.

Aletor, V.A., Aladetimi, O.O., 1995, Compositional studies on edible tropical species of mushrooms, *Food Chemistry.*, 54 (3), 265-268.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., 1993, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 90:7915-22.

Amstrong D., 1998, Free radicals and antioxidant protocols, Methods in molecular biology, volüme 108, *Humana Press*, Toronto, New Jersey.

Aruoma, O. I., 1993, Free radicals and foods, *Chemistry in Britain*, 29, 210-214.

Aruoma, O.I., 1996, Characterisation of drugs as antioxidant prophlactics,*Free Radical Biology & Medicine*, 20, 675-705.

Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R., 2008a, Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays, *Food Chemistry*, 111, 61-66.

Barros, L., Venturini, B., Baptista, P., Estevinho, L., Ferreira, I.C.F.R., 2008b, Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study, *J. Agric, Food Chemistry*, 56, 3856-3862.

Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C., 2008c, Optimization of the determination of tocopherols in Agaricus sp. Edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method, *Food Chemistry*, 110, 1046-1050.

Baykal, Y., Gök, F., Erikçi, S., 2002, Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar, *Sendrom Aylık Tıp Dergisi*, 14 (1):94-100.

Benzie, I.F.F., Wu, I., Buswell, J.A., 1998, Antioxidant activities of mushrooms and mushroom products, Abstracts of the Second International Conference on Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, *Health and Disease*, Helsinki, Finland, Abstract No. WI/3.

Block, G., Pattersen, B. and Subar, A., 1992. Vegetables and cancer preventation: A review of the epidemiological evidence, Nutrition Cancer, 18, 1-29.

Block, K. I., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A., Gyllenhaal, C., 2007, Impact of antioxidant suplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials, *Cancer Treatment Reviews*, 33(5), 407-418.

Blomhoff, R., 2005, Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Current Opinion in Lipidology*, 16, 47-54.

Bobek P.,1991, Cholesterol-lowering effect of the mushroom Pleurotus ostreatus in hereditary hypercholesterolemic rats, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35(4):191-5.

Borchers, A.T. et al., 1999, Mushrooms, tumors and immunity, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* ,221 (4), 281-293.

Breene, W.M., 1990, Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms, *Journal of Food Protection***,** 53, 883-894.

Cadogan, J. I. G., 1973, Prınciples of free radicals chemistry, *The Chemical Society*, London.

Chang S.T., Buswell J.A., 1996, Mushroom nutriceuticals, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,12: 473-6.

Chen, H. and Tappel, A.L. 1996, Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by $CBrCl_3$ in liver, lung, kidney, heart, and spleen, *J. Agric, Food Chemistry*, 44(3), 854-858.

Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y., Fukuoka F., 1970, Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, (an Edible Mushroom), *Cancer Research*, 30, 2776-2781.

Cui J., Chisti Y., 2003, Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses, and Production, *Biotechnology Advances*, 21,109-122.

Çakatay U, Kayalı R, 2006, Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi, *Cerrahpasa tıp dergisi*, 37, 162-167.

Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T, 1997, Reaktif oksijen partikülleri veAntioksidan savunma, *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4, 92-95.

Delmanto R.D., Lima P.L A., Sugui M.M., Eira A.F., Salvadori D.M.F., Speir G., Ribeiro L.R., 2001, Antimutagenic Effect of *Agaricus blazei* Murrill Mushroom

On The Genotoxicity Induced By Cyclophosphamide, *Mutation Research*, 496, 15-21.

Dhanasekaran, M., Ignacimuthu, S., Agastian, P., 2009, Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from Cassia tora L on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats, *Phytomedicine* 16, 891-895.

Diplock A., 1998, Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients, *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium.

Duthie,S. J., Ma, A., Ross, M. A. and Collin, A. R., 1996, Antioxidant suplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes, *Cancer Research and Treatment*, 56, 1291-1295.

Duthie G.G., Wahle K.W.J., and James W.P.T., 1989, Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease, *Nutrition Research Reviews* 2, 51-62.

Elitok, E., 1996, Et Teknolojisinde Antioksidantların Kullanımı, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Semineri, Ankara.

Elliot J.G., 1999, Application of antioxidant vitamins in foods and beverages, *Food Technology* 53(2), 46-48.

Elmastas M., Isildak O., Turkekul I., Temur N., 2007, Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms, *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 337-345.

El-Mir M.Y., Serrano M.A., Macias R.I., Dominguez M.F., Monte M.J., Marin J.J., 1998, In vitro test to determine the effect of cytostatic drugs on co-cultured rat hepatocytes and hepatoma cells, *International Journal of Experimental Pathology*,79(2), 109-15.

Frankel, E. N., 1980, Lipit oxidation, *Progress in Lipid Research*, 19,1-22.

Ferreira I.C.F.R., Barros L. and Abreu Rui M.V.,2009, Antioxidants in Wild Mushrooms, *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.

Floyd R., 1990, Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Brain iscchemia Fased J. 4., 2587-2597.

Fridovich, I., 1976, Biological effects of superoxide radical, *Archives of biochemistry and Biophsics*, 247, 1-11.

Gomberg, M., 1900, An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl, *Journal of the American Chemical Society 22*, 757-771.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., 1990, The Antioxidants of Human Extracellular Fluids, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, Vol. 280, No. 1, July, pp. 1-8.

Halliwell, B., Guttridge, J.M.C., 1990, Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press*, Oxford, 2nd Eds.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, *Methods Enzymology*,186; 1-85.

Halliwell B., 1996, Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them, *Advances in Pharmacology*, Volume 38, 1996, Pages -320.

Harish, R., Shivanandappa, T., 2008, Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Phyllanthus niruri, *Food Chemistry*, 95, 180-185.

Hey, D.H. and Waters, W. A., 1973, Some organic reaction involvingthe occurence of free radicals in solution, *Chem. Reviews*, 21,169-208.

Ho Y.C., Lin M.T., Duan K.J., Chen Y.S., 2008, The hepatoprotective activity against ethanol-induced cytotoxicity by aqueous extract of Antrodia cinnamomea, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39, 441-447.

Hsu H.C., Hsu C.I., Lin R.H., Cao C.L., Lin J.Y.,1997, Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from Volvariella volvacea, *Biochemical Journal*, 323:557-65.

Hudson BJF, 1990, Food Antioxidants, Elsevier Applied Science Publishers, New York, *Elsevier*, New York, pp. 253-307.

Itoh, H., Ito, H., Amano, H., Noda, H., 1994, Inhibitory action of a (1fi6) -beta-D-glucan-protein complex (F III-2-b) isolated from Agaricus blazei Murill (‘himematsutake’) on Meth A fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism, *The Japanese Journal of Pharmacology* 66, 265-271.

Jeon, T.I., Hwang, S.G., Lim, B.O., Park, D.K., 2003, Extracts of Phellinus linteus grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats, *Biotechnology Letters* 25, 2093-2096.

Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B.K., et al., 2010, White button mushroom (Agaricus bisporus) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats, *Nutrition Research* 30 (1), 49-56.

Jin, Y.S., Sa, J.H., Shim, T.H., Rhee, H.I., Wang, M.H., 2005, Hepatoprotective and antioxidant effects of Morus bombycis Koidzumi on CCl4-induced liver damage, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 991-995.

Josiana A. V., Sandrina A. H., Anabela M., Gabriela M. A., Helena V., Isabel C.F.R.F., 2010, Wild mushrooms Clitocybe alexandri and Lepista inversa: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines, *Food and Chemical Toxicology* 48, 2881-2884.

Jullian C., Miranda S., Zapata-Torres G., Mendizábal F., Olea-Azar C.,2007, Studies ofinclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechinby

NMR and molecular modeling, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 3217-3224.

Kalacˇ P., 2009, Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review, *Food Chemistry* 113, 9-16.

Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2001, Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health, *International Journal of Food Science & Technology* 36; 703-725.

Kawakishi S., Tanigawa M., Antioxidative protein in Japanese mushroom. In: Hiramatsu M., Yoshikawa T, Inoue M., 1997, editors, Food and Free Radicals, New York: *Plenum Press*, p. 67–73.

Kim, G. Y., Oh, W. K., Shin, B. C., Shin, Y. I., Park, Y. C., Ahn, S. C., Lee, J. D., Bae, Y. S., Kwak, J. Y., Park, Y. M., 2004, Proteoglycan isolated from Phellinus linteus inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c + CD8 + DC and type I helper T cell-dominant immune state, *FEBS Letters* 576, 391-400.

Kinsella, J. E., Frackel, E., German, B., & Kanner, J., 1993, Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technology*, 47, 85-89.

Ko W.S., Hsu S.L., Chyau C.C., Chen K.C., Peng R.Y., 2010, Compound *Cordyceps* TCM-700C exhibits potent hepatoprotective capability in animal model, *Fitoterapia*, 81, 1-7.

Kondo K., Kurihara M., Fukuhara K., Tanaka T., Suzuki T., Miyata N., Toyoda M., 2000, Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation, *Tetrahedron Letters* 41, 485-488.

Lahiri S.S., 2010, Bioprospecting of certain mushrooms isolated from South Gujarat.

Larone, D.H., 2002, Medically Important Fungi, fourth ed. Amer Society for Microbiology, USA.

Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A., 2000, Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation, *J. Agric. Food Chemistry* 48(5), 1442-1448.

Lim, B.O., Yamada, K., Cho, B.G., Jeon, T., Hwang, S.G., Park, T., Kang, S.A., Park, D.K., 2004, Comparative study on the modulation of IgE and cytokine production by Phellinus linteus grown on germinated brown Rice, Phellinus linteus and germinated brown rice in murine splenocytes, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 2391-2394.

Lin, S., Zhu, P., Liao, H., 1998, Bloking effect of mushroom beverages on carbon tetra chloride induced rat liver peroxidation, *Zhongguo Gonggong Welsheng Xuebao* 17, 15-15.

Liu G., Bao T., Wei H., Song Z., 1979, Some pharmacological actions of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma japonicum* (FR) Llyod on mouse liver (author's trans), *Yao Xue Xue Bao*, 14, 284-287.

Liu F., Ooi V.E.C., Chang S.T., 1997, Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts, *Life Sciences*, 60:763-71.

Lo, K.M., Cheung, P.C.K., 2005, Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of Agrocybe aegerita var. alba, *Food Chemistry*,89, 533-539.

Lu Z.M., Tao W.Y., Zou X.L., Fu H.Z., Ao Z.H., 2007, Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatica toxicity in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 160-164.

Lucas E.H., Montesano R., Pepper M.S., Hafner M., Sablon E.,1957, Tumor inhibitors in Boletus edulis and other holobasidiomycetes, *Antibiot Chemother* 7, 1-4.

Lucas E.H., Byerrum M., Clarke D.A., Reilly H.C., Stevens J.A., Stock C.C., 1958, Production of oncostatic principles in vivo and in vitro by species of the genus Calvatia, *Antibiotics annual* 6, 493- 496.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.K., Dexter, D.T., Aruoma, O.I., 2005, Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas, *Food Research International* 38, 357-367.

Manzi, P., Pizzoferrato, L., 2000, Beta glucans in edible mushrooms, *Food Chem.*,68, 315–318. Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacological Reviews*, 52, 673-839.

Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C., 2002, Antioxidant properties of several medicinal mushrooms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6072-6077.

Mizuno, T., 1993, Food function and medicinal effect of mushroom fungi, *Foods & Food Ingredıents Journal Of Japan*,158, 55-70.

Mizuno T., 1995, Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi, *Food Reviews International* 11, 7-12.

McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase, An enzymatic function for erythrocuperin (Hemocuprein), *Journal of Biological Chemistry*, 224,6049-6055.

Meydani M., 2001, Antioxidants and cognitive function, ILSI, *Nutrition Reviews*, 59(8), S75-S82.

Michelson, A.M., McCord, J.M. and Fridovich, I., 1977, Superoxide and Superoxide dismutasees, *Academic Press*, London, 351-365.

Miguel J,Fleming J., 1982, Antioxidation, metabolic rate and aging in Drosophila, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 1-159.

Mizuno T., Kato N., Totsuka A., Takenaka K., Shinkai K., Shimizu M., 1984, Fractionation, Structural Features and Antitumour Activity of Water-Soluble Polysaccharides from "Reishi" the Fruit Body of *Ganoderma lucidum*, *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 58, 871-880.

Moad, G. and Solomon, D.H., 1995, The chmistry of free radical poliymerization, Pergamon, Oxford.

Mueller U.G., Stephen A.R., Schultz T.R., 1998, The evolution of agriculture in ants, *Science*, 281,2034-8.

Murray, M.T., 1996, Encyclopedia of Nutritional Supplements, California, Prima Publishing, 1, 320-331.

Nawar, W., 1996, Lipids in Food Chemistry, *4th Ed. O. R. Fennema (Ed), Marcel Dekker, Inc*, New York, 1067s, USA.

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., and Deemer E.K., 2002, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study, *J. Agric. Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128.

Jayakumar T., Thomas P.A., Geraldine P., 2009, In vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus, *Innovative Food Science and Emerging*10, 228-234.

Pacher P., Beckman JS. & Liaudet L., 2007, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiological Reviews* 87: 315-424.

Park, J., Lee, B.R., Jin, L.H., Kim, C.K., Choi, K.S., Bahn, J.H., Lee, K.S., Kwon, H.Y., Chang, H.W., Baek, N. I., Lee, E.H., Kang, J.H., Cho, S. W., Choi, S.Y., 2001, The stimulatory effect of Garnoderma lucidum and Phellinus linteus on the antioxidant enzyme catalase, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 34, 144-149.

Park, I.H., Chung, S.K., Lee, K.B., Yoo, Y.C., Kim, S.K., Kim, G.S., Song, K.S., 2004, An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of Phellinus linteus, *Archives of Pharmacal Research* 27, 615-618.

Papas, A.M., 1993, Oil-soluble antioxidantsin foods, *Toxicology and Industrial Health*, 9, 123-149.

Perkins, M.J., 1996, Radical Chemistry, *Ellis Horwood*, London.

Pezzuto,J.M., 1997, Planderived anticancer agents, *Biochemical Pharmacology*, 53,121-133.

Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N., 2006, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal of Biotechnology*, 5 (11), 1142-1145.

Qian, Z.J., Jung, W.K., Kim, S.K., 2008, Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Rana catesbeiana shaw, *Bioresource Technology*, 99, 1690-1698.

Rixe O, Fojo T., 2007, Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient, *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7280-7.

Roche Diagnostics GmbH., 2008, Introduction of the RTCA SP Instrument, RTCA SP Instrument Operator‘s Manual, *A. Acea Biosciences*, Inc., pp. 14-16.

Sakallı E., 2010, Comparatıve Effects Of Emodın On Bıologıcal Actıvıtıes Of Mcf-7 And Mda-231 Cell Lines, Yüksek Lisans tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Santos, J.H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C., Van Houten, B., 2003, Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death, *The Journal of Biological Chemistry* 278, 1728-1734.

Shahidi, F., 2007, Nurtaceuticals and functional foods in health promotion and disease risk reduction, *International Union of Food Science and Technology*, Shanghai, China.

Shahidi, F., & Ho, C. T.,2007, Antioxidant measurement and applications. ACS Symposium Series 956, Washington, DC, *American Chemical Society*.

Shamtsyan M.M., Konusova V.G., Goloshchev A.M., Maksimova Y.O., Panchenko A.V., Petrishchev N.N., et al., 2004, Immunomodulating and anti-tumor effects of basidiomycetes Pleurotus ostreatus (jacq.: fr.) P. Kumm. and P. cornucopiae (Pau. Ex Pers.) Rollan, *The Journal of Biological Chemistry*, 4(3),157-61.

Smith J.E., Rowan N.J., Sullivian R., 2002, Medicinal mushrooms:Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, *University of Strathclyde*.

Song, Y.S., Kim, S.H., Sa, J.H., Jin, C., Lim, C.J., Park, E.H., 2003, Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom Phellinus linteus, *Journal of Ethnopharmacology* 88, 113–116.

Srivastava, A., Shivanandappa, T., 2010, Hepatoprotective effect of the root extract of Decalepis hamiltonii against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats, *Food Chemistry* 118, 411-417.

Śtipek Stanislav a kol., 2000, Antioxidanty a volně radikàly ve zdravi a nemoci, Grada.

Tamer A.U., 2005. Mikolojiye Giriş Kitabı, Uludağ Üni. Fen Edebiyat Fak Ders Notları, No:1.

Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H., 2001, Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action, *Journal of Nutrition* 131, 1409-1413.

Tsai, S.Y., Tsai, H.L., Mau, J.L., 2007, Antioxidant properties of Agaricus blazei, Agrocybe cylindracea, and Boletus edulis, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 40, 1392-1402.

Tsai, C.F., Hsu, Y.W., Chen, W.K., Chang, W.H., Yen, C.C., Ho, Y.C., Lu, F.J., 2009, Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice, *Food and Chemical Toxicology* 47, 2031- 2036.

Thekkuttuparambil A.A., Kainoor K., 2007, Janardhanan. Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40, 157-162.

Tunalıer Z, Öztürk N, Kosar M, Baser KHC, Duman H, Kırımer N, 2002, Bazı sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bilesikler yönünden incelenmesi, *Bitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı*.

Uguzlar H., 2009, Antalya'da yetisen A*raceae arum*'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, 1-28, 45-49, 70-73.

Uyar P., Coruh N., İscan M., 2014, Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of Rheum ribes ethyl acetate extracts, *Journal of Plant Sciences*, 2(6), 339-346.

Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun XB, Wang X, et al., 2008, Dynamic monitoring on microelectronic sensors, *Chemical Research in Toxicology*,18,154-61.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J.,2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

Wang H.X., Liu W.K., Ooi V.E.C., Chang S.T., 1995, Immunomodulatory and Antitumor and Antitumor Activities of a Polysacharide-Peptide Complex from a Mycelial Culture of *Tricholoma* sp. a Local Edible Mushroom, *Life Sciences*, 57, 3, 269-281.

Wang H., Ng T.B., 2000, Isolation of a novel ubiquitin-like protein from Pleurotus ostreatus mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation inhibitory and ribonuclease activities, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 587-93.

Wang, B.J., Liu, C.T., Tseng, C.Y., Wu, C.P., Yu, Z.R., 2004, Hepatoprotective and antioxidant effects of Bupleurum kaoi Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO2 on CCl4-induced liver damage, *Food Chemistry Toxicology* 42, 609-617.

Wasser S.P., Weis A.L.,1999, Therapeutic effect of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, *Critical Reviews in Immunology*, 19(1), 65-96.

Wasser S.P., Weis A.L.,1999, Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives, *International Journal of Medicinal Mushrooms*,1, 31-62.

Wasser S.P., 2002, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258-274.

Waters, W.A., 1943, Achemical interpretation of the mechanism of oxidation by dehydrogenase enzymes, Trans. Faraday Soc. 39,140-151.Weiss, L., 1935. Investigation of free radical H2O in solution, *Transactions of the Faraday Society*, 31, 668-681.

Weijl, N. I., Cleton, F. J., Osanto, S. ,1997, Free radicals and antioxidants in chemo-therapy-induced toxicity, *Cancer Treatment Reviews*, 23(4), 209-240.

Wright J.S., Johnson E. R., & DiLabio G. A.,2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173-1183.

Yaltirak T., Aslim B., Ozturk S., Alli H., 2009, Antimicrobial and antioxidant activities of Russula delica Fr, *Food Chemistry Toxicology* 47, 2052-2056.

Yang Q.Y., Jong S.C., Li X.Y., Zhou J.X., Chen R.T., Xu L.Z.,1992, Antitumor and immunomodulating activities of the polysaccharide-peptide (PSP) of Coriolus versicolor, *Journal of Immunology and Immunopharmacology*,10, 29-34.

Yanishlieva NV, Pokomy J, Gordon, M. 2001, Inhibiting Oxidation in Antioxidants in Food: Practical Applications., CRC press LLC and Woodhead Publishing Ltd, New York, USA, 288s.

Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z., Delibaş, N., 2003, Başboyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Isparta, 2003:10-(4) / 65 -67.

Yun, W., Hall IR & Evans, L.A., 1997, Ectomycorrhizal Fungi with Edible Fruiting Bodies 1. Tricholoma matsutake and Related Fungi, *Economic Botany* 51: 311-327.

Zaidman, B., Yassin, M., Mahajana, J., Wasser, S.P., 2005, Medicinal mushrooms modulators of molecular targets as cancer therapeutics, *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 453-468.

Zjawiony, J.K., 2004, Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore), Fungi, *Journal of Natural Products* 67, 300-310.

Hutchins, 1998 ve Meier, 2000, http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html (Ziyaret Tarihi:10/ 10/ 2015).

https://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan (Ziyaret Tarihi:15/ 11/ 2015).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Deniz ÖZKAYA
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Altındağ 02/ 03/ 1990
Telefon : 0 506 888 33 53
e-mail : denizozkaya7@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**A. Adnan Saygun Lisesi, Çiğli, İZMİR**	**2008**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA**	**2013**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA**	**2015**
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

POSTERLER

Özkaya D., Arpacı U.P., Doğan H.H., 2015. In-vitro Cytotoxic and Apoptotic Activity of Edible Mushroom *Tricholoma anatolicum* H.H.Doğan & Intini Extracts Against HEPG2 Cells, 40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) July 4-9, Berlin / Germany.

Özkaya D., Uyar.P., Doğan H.H., 2014. Fomes fomentarius'un Tümörojenik ve Non-tümörojenik Kolon Epitel Hücrelerindeki Büyüme Önleyici ve Apoptozis İndükleyici Etkisi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran, Eskişehir/Türkiye.