T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FUNGAL KAYNAKLI HETEROPOLİSAKKARİTLERİN BAZI BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİ İLE LPS İNDÜKLÜ BV-2 HÜCRELERİNDE ANTİİNFLAMATUAR POTANSİYELİNİN ÖLÇÜLMESİ

Hazırlayan
Berrak ALTINSOY

Danışman
Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Doktora Tezi

Haziran 2015
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FUNGAL KAYNAKLI HETEROPOLİSAKKARİTLERİN BAZI BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİ İLE LPS İNDÜKLÜ BV-2 HÜCRELERİNDE ANTİİNFLAMATUAR POTANSİYELİNİN ÖLÇÜLMESİ

Hazırlayan
Berrak ALTINSOY

Danışman
Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Doktora Tezi

Haziran 2015
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı- Soyadı: Berrak ALTINSOY

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Fungal Kaynaklı Heteropolisakkaritlerin Bazı Biyoaktivite Özellikleri İle LPS indüklü BV-2 Hücrelerinde Antiinflamatuar Potansiyelinin Ölçülmesi" adlı **Doktora Tezi,** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Berrak ALTINSOY

Danışman

Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. İlhan DEMİRHAN

Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK danışmanlığında Berrak ALTINSOY tarafından hazırlanan **"Fungal Kaynaklı Heteropolisakkaritlerin Bazı Biyoaktivite Özellikleri İle LPS indüklü BV-2 Hücrelerinde Antiinflamatuar Potansiyelinin Ölçülmesi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

12/06/2015

JÜRİ: **İMZA:**

Danışman: Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK
Erciyes Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Belma ASLIM
Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulu'nun.....tarih ve.....
sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilgi, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK'e ve Prof.Dr. Belma ASLIM'a,

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN'a,

Eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğiyle yanımda olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Müberra KOŞAR ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU'na,

Tezimde kullanılan mantarların temin ve teşhisinde emeğini esirgemeyen hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Hakan ALLI'ya,

Benden manevi desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Arş.Gör.Dr.Gökçe ŞEKER KARATOPRAK, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem YÜCEL ve Arş.Gör.Selen İLGÜN'e

Hiç bitmeyen sevgi ve sabırlarıyla desteklerini hep hisettiğim canım ailem Eşim Mehmet ALTINSOY, Babacığım Bilal DUMLUPINAR, Anneciğim Fatma DUMLUPINAR ve Kardeşim Burak DUMLUPINAR'a

Varlığıyla bana can olan ve bu süreçte en büyük fedakarlığı gösteren en kıymetlim Kızım Aslı ALTINSOY'a sonsuz teşekkürler…

FUNGAL KAYNAKLI HETEROPOLİSAKKARİTLERİN BAZI BIYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİ İLE LPS İNDÜKLÜ BV-2 HÜCRELERİNDE ANTİİNFLAMATUAR POTANSİYELİNİN ÖLÇÜLMESİ

Berrak ALTINSOY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi Haziran 2015

Danışman: Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

KISA ÖZET

Günümüzde doğal ürünlerin araştırılması, biyoaktif yeni kaynakların keşfedilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Türkiye, coğrafik konumundan dolayı oldukça zengin bir mantar florasına sahiptir ve son yıllarda, mantarların fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Tez çalışmamızda, Kastamonu, Kütahya ve Muğla bölgelerinden toplanan dört yabani mantar türünden (*Leucoagaricus leucothites, Roseolus roseolus, Terfezia claveryi, Tricholoma terreum*) izole edilen polisakkaritlerin bazı biyolojik aktiviteleri ve LPS ile indüklenmiş BV-2 (mikroglial hücre hattı) hücrelerinde antiinflamatuar potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Belirlenen türlerin ultrasonik banyoda soğuk su ile polisakkarit özütleri hazırlanmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerinde fungal polisakkaritlerin monosakkarit birimleri belirlenmiştir. HPLC'de yapılan monosakkarit analizleri ile çalışılan dört mantar polisakkaritlerinin başlıca D-glukoz ve fruktoz içerdiği belirlenmiştir.

T.claveryi' nin polisakkarit özütünün fenolik bileşikler bakımından diğer üç türe göre daha zengin olduğu ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit ($ABTS^{\cdot}$) radikal katyon dekolorizasyon metoduna göre dört tür içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat ($DPPH^{\cdot}$) radikal süpürme metoduna göre ise polisakkarit özütlerinin hiçbirinin aktivite göstermediği görülmüştür.

Fungal polisakkaritlerin BV-2 hücrelerindeki sitotoksik etkileri MTT (3- (4,5)–dimethylthiazol-2-yl)–2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi ile antiinflamatuar

aktiviteleri ise LPS ile indüklenen BV-2 hücrelerinde araştırılmıştır. Bulgulara göre çalışılan fungal polisakkaritlerin BV-2 hücre hattında IL-6, TNF-α, COX-2 ve iNOS salınımını ve p38 ve ERK1/2 proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, fungal polisakkaritlerin BV-2 hücrelerinde LPS ile oluşturulan inflamasyonun azaltılmasında etkili olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Fungal polisakkaritler, biyoaktivite, inflamasyon, LPS, BV-2 hücreleri

INVESTIGATION OF SOME BIOACTIVITY PROPERTIES AND ANTIINFLAMMATORY POTENTIAL LPS- INDUCED IN BV-2 CELLS OF FUNGAL HETEROPOLYSACCHARIDES

Berrak ALTINSOY
University of Erciyes, Institute of Health Sciences
Department of Pharmaceutical Biochemistry
PhD Thesis June 2015
Supervisor: Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

ABSTRACT

Today, natural product researches are of great importance for discovering new bioactive sources. Turkey has a rich mushroom flora due to its geographical position and in recent years, phytochemical and biological activity analysis of mushrooms have been increased day by day. In our thesis study, it was aimed to investigate some biological activities and antiinflammatory potential in LPS-induced BV-2 microglial cells in polysaccharides isolated from four wild mushroom species (*L.leucothites, R.roseolus, T.claveryi, T.terreum*) collected from Kastamonu, Kütahya and Muğla regions.

Firstly, the selected species were extracted by ultrasonic bath with cold water. Monosaccharide units of fungal polysaccharides were identified by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The results of monosaccharide analysis in HPLC showed that polysaccharides of studied four mushrooms composed of mainly glucose and fructose.

The polysaccharide extract of *T.claveryi* were found as rich in phenolic compounds when compared the other three species and showed the highest antioxidant activity, according to the 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ($ABTS^{\cdot}$) radical cation decolorisation method. It was seen that according to 2,2-diphenyl- 2-picrylhydrazil hydrate ($DPPH\cdot$) radical scavenging activity method, polysaccharide extracts do not have activity.

Cytotoxic effects of fungal polysachharides were analysed by MTT (3-(4,5)–dimethylthiazol-2-yl) –2,5- diphenyl tetrazolium bromide) in BV-2 (microglial cell line) cells and antiinflammatory activities were determined in LPS-induced BV-2 cells.

According to findings, it has been shown that fungal polysaccharides supress inflammation by reducing emissions of IL-6, TNF-α, COX-2, iNOS and expression of p38 and ERK1/2 in BV-2 cell line.

As a result, fungal polysaccharides were found to be efficient in reducing inflammation induced by LPS in BV-2 cells.

Key Words: Fungal polysaccharides, bioactivity, inflammation, LPS, BV-2 cells

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI iii
ONAY iv
KISA ÖZET vi
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER x
KISALTMALAR xiii
TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İnflamasyon 4
2.1.1. Patojenik İnflamasyon 10
2.1.2. Oksidatif Stres 13
2.1.3. Hücre Ölüm Yolakları 16
2.1.4. Polisakkaritlerin İnflamasyondakki Rolü 20
2.2. Makromantarların Genel Özellikleri 21
2.3. Makromantarların Farmakolojik Potansiyelleri 25
2.3.1. Antibakteriyel ve Antifungal Mantarlar 31
2.3.2. Antiviral Mantarlar 31
2.3.3. Antitümör ve İmmünomodülatör Mantarlar 32
2.3.4. Antiinflamatuar Mantarlar 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM 38

3.1. GEREÇ 38
3.1.1. Araştırmada kullanılan Makrofunguslar ve Temini 38
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Hücreler 38
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Cihazlar 39
3.1.4. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar 40
3.1.5. Araştırmada Kullanılan Çözeltiler 40
3.2. YÖNTEM 47
3.2.1. Polisakkarit Özütleme 47
3.2.2. Özütleme Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu 47
3.2.3.Polisakkarit Özütlerinin Kimyasal Analizleri 47
3.2.3.1 Monosakkarit Bileşimlerinin Tayini 47
3.2.3.2. Toplam Polisakkarit İçeriği 48
3.2.3.3.Toplam Protein Tayini 48
3.2.4. Antioksidan Aktivite 49
3.2.4.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·•) Radikalini Süpürücü Etki Tayini 49
3.2.4.2. ABTS· Katyon Radikal Giderimi 49
3.2.4.3. Toplam Fenol Miktar Tayini 50
3.2.4.4. Toplam Flavonoit Miktar Tayini 50
3.2.6. Antiinflamatuar Aktivitenin *in vitro* Tespiti 50
3.2.6.1.Hücre Hattı ve Kültür Ortamı 50
3.2.6.2.Sitotoksik Etkinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi 51
3.2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 52
3.2.6.3.1.RNA İzolasyonu 53
3.2.6.4.Sitokin İncelemeleri 55
3.2.6.4.1.TNF-α Test Protokolü 55

3.2.6.4.2. IL-6 Test Protokolü.....56
3.2.6.5. Hücrelerden Protein İzolasyonu.....56
3.2.6.6.Western Blot ile Proteinlerin Belirlenmesi.....58
3.6.2.6.1.Poliakrilamid Jelin Dökülmesi.....60
3.2.6.6.2.Örneklerin Jele Yüklenmesi.....61
3.2.6.6.3.Western Transfer.....61
3.2.6.6.4.Western Blotlama.....62
3.2.6.6.5.Karanlık Oda İşlemleri.....62
4. BULGULAR.....63
4.1. Elde Edilen Polisakkarit Özütlerin Verimi.....63
4.2. Elde Edilen Polisakkarit Özütlerin Kimyasal Analiz Sonuçları.....63
4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....67
4.5. Antiinflamatuar Aktivite Sonuçları.....68
4.5.1.Sitotoksik Etkinin MTT Sonuçları.....68
4.5.2.COX-2 Ve Inos Genlerinin Mrna Ifadelenme Düzeyleri.....69
4.5.3.Proinflamatuar Sitokin Miktarları.....71
4.5.4. P38 Ve ERK1/2 Protein Düzeyleri.....73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....76
6.KAYNAKLAR.....88
ÖZ GEÇMİŞ.....115

KISALTMALAR

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AP-1	Aktivatör Protein-1
BCA	Biçinkonik Asit
BHA	Bütillenmiş Hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi toluen
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
COX-2	Siklooksijenaz-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH·	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DSS	Dekstran Sülfat Sodyum
ERK	Hücre Dışı Düzenleyici Kinaz
FBS	Fetal Bovine Serum
GAE	Gallik Asit Ekstresi
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HIF-1α	Hipoksi İndüklenebilir Faktör- 1α
HO•	Hidroksil Radikali
HRP	Horse Radish Peroksidaz

IBD	İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
ICAM	İntraselluler Adezyon Molekülü
IFN-γ	İnterferon Gamma
IκBs	NF-κB İnhibitör Proteinleri
IKK	IκB Kinaz
IL-1β	İnterlökin-1β
IL-6	İnterlökin-6
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JAK	Janus Aktive Edici Kinaz
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
LFA	Lymphocyte Function-Associated Antigen
LPS	Lipopolisakkarit
MAO	Monoamin Oksidaz
MAOA	Monoamin Oksidaz A
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MASP	Mannose Associated Serine Protease
MLN	Mezenterik Lenf Düğümü
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
NOX	NADPH Oksidaz
O2•-	Süperoksit Radikali
P38	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
PARP	Poly ADP Riboz Polimeraz
PBMCs	Periferal Kan Mononükleer Hücreleri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE_2	Prostaglandin E_2

PMN	Polimorfo Nükleer
PRR	Patern Tanıyıcı Reseptörler
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	Poliviniliden Florür
RE	Rutin Ekstresi
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Revolutions Per Minute
SDS-PAGE	Sodyumdodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SHP	Sitoplazmik Tirozin Fosfataz
SOCS	Sitokin Supresörü Sinyal Proteinleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT	Transkripsiyonun Sinyal İleticisi Ve Aktivatörü
TEAC	Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
THP-1	İnsan Monosit Hücreleri
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF-α	Tümör Nekrozu Faktörü Alfa
XO	Ksantin Oksidaz

TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Fungal polisakkaritlerin biyoaktivitesi 29
Tablo 2. 2. Mantarlardan elde edilen en önemli immunomodulatör ilaçlar 35
Tablo 2.3. Mantar ürünlerinin immunomodulatör aktiviteleri.....36
Tablo 3.1. Arazi çalışması yapılan lokaliteler. 38
Tablo 4.1 Fungal polisakkarit özütlerinin verimi 63
Tablo 4.2. Fungal polisakkaritlerin monosakkarit birimleri.....65
Tablo 4.3 Fungal polisakkarit özütlerinin toplam fenol ve flavonoit içerikleri.....68
Tablo 4.4 Mantarlardan izole edilen polisakkaritlerin hücre canlılığı üzerine etkileri 68

Şekil 2.1. Bağışıklık sisteminin ana yapıtaşlarının işlev ve karşılıklı etkileşimleri. 5
Şekil 2.2. Omurgalı immün yanıtın 3 basamağı.....7
Şekil 2.3. Bakteriyel patojenlere karşı doğal ve kazanılmış immün yanıt 12
Şekil 2.4. Glia ve nöronlardaki temel ROS ve antioksidan üreticilerinin diyagramı. 14
Şekil 2.5. MAPK sinyal kaskadı.. 19
Şekil 3.1. Western Blot Jel Elektroforezi.....59
Şekil 3.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi Şematik Gösterimi.....59
Şekil 4.1 Fungal polisakkarit özütlerinin toplam şeker sonuçları 64
Şekil 4.2. Fungal polisakkarit özütlerinin toplam protein sonuçları 64
Şekil 4. 3 Fungal polisakkaritlerin HPLC kromotogramları.....66
Şekil 4.4 $ABTS^{\cdot}$ metoduna göre antioksidan aktivite 67
Şekil 4.5 Polisakkarit örneklerindeki MTT redüksiyonunun kontrol grubuna göre % değişimleri 69
Şekil 4.6 Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki COX-2 ifadelenme düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı.....70
Şekil 4.7 Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki iNOS ifadelenme düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı.....71
Şekil 4.8 Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki TNF-α üretim düzeylerinin dağılımı.....72

Şekil 4.9 Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki IL-6 üretim düzeylerinin dağılımı 73
Şekil 4.10 Fungal polisakkaritlerin LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında p38 proteinlerinin western blot görüntüleri ve protein düzeyleri 74
Şekil 4.11 Fungal polisakkaritlerin LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında ERK1/2 proteinlerinin western blot görüntüleri ve protein düzeyleri 75

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkisel kaynaklı ilaçların tedavi süreçlerine olumlu etkilerinin görülmesi, doğal olarak yetişen bitkilerin önemini her geçen gün arttırmaktadır (1).

Eski çağlardan beri yiyecek olarak tüketilen mantarlar kalori bakımından düşük, aminoasitler, karbonhidratlar, lifler, vitaminler ile mineraller bakımından zengindir (2). Yaklaşık 1,5 milyon kadar mantar türünün olduğu literatürlerde belirtilmektedir. Günümüze kadar toplamda 69.000 mantar türü tanımlanmış olup, bunların 10.000'i makromantar olarak değerlendirilmektedir. Bunlardan 5.020 tanesi yenilebilir, 1.820 tanesi tıbbi, 1.010 tanesi zehirli, 2.150 tanesi ise zehirli olmayıp yenilebilir nitelik taşımamaktadır. Yenilebilir 5.020 tür içerisinde 35 tanesinin ticari anlamda kültürü yapılmaktadır (3).

Ökaryotik hücre yapısına sahip heterotrof canlılar olan makromantarlar hiflerden oluşan ağsı bir yapıya sahiptirler. Makromantarların kuru ağırlıklarının %50-65'i karbohidrat ihtiva eder. Glukoz, mannitol ve α-trehaloz başlıca monosakkarit birimleridir. Mantarlar diğer pekçok sebzeden ve yabani bitkilerin çoğundan daha yüksek oranda proteine sahiptir. Daha önceki çalışmalar, mantarların içeriklerinde bulunan ve hayvansal proteinler olarak nitelendirilen bazı temel aminoasitlerden dolayı vejeteryan beslenmede son derece besleyici gıdalar olduğunu göstermektedir. Birim zamanda birim alana dönüştürülen protein miktarı hayvansal kaynaklarla karşılaştırıldığında daha yüksektir. Mantarlardaki proteinin % 72 ile % 83 arasında değişen oranlarda sindirilebilir olduğu pekçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Karbohidrat ve proteinlerle karşılaştırıldığında mantarlardaki yağ içeriği oldukça düşüktür. Mantarların meyve organlarındaki yağlar doymamış yağ asitlerinden oluşur ve fosfatidilkolin 58

yabani mantar türünden 55'inde bulunan temel fosfolipidtir. Mantarlar en iyi vitamin kaynaklarıdır. Özellikle vitamin B (tiyamin (B1), riboflavin (B2), niyasin (B3), biyotin (B7)) ve vitamin C (askorbik asit) kaynağıdırlar. Bazı çalışmalar A, D ve E vitamini içerdiklerinide göstermektedir. İçeriklerinde ki temel mineraller fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve sodyum iken az miktarda bakır, çinko, demir, molibden ve kadmiyum bulunduran türleride mevcuttur (4-10).

Doğu ülkelerinde mantarların yüzyıllardır ilaç olarak kullanılması, tıbbi mantarların ortaya çıkışını sağlamıştır. Uzakdoğu ülkelerinden Japonya, Çin, Kore ve diğer Asya ülkeleri kurutulmuş mantar materyallerini modern klinik uygulamalarında da halen güvenle kullanmaya devam etmektedir. Makromantarlar bilinen doğal antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser moleküller bakımından zengin bir kaynak olmasının yanı sıra literatürler de belirtilen antiinflamatuar etkinliklerinden dolayı da nöronal hasarlara karşı geliştirilen nörokoruyucu ajanlara alternatif olarak düşünülmektedir (11).

Wang et.al. (12), makrofaj kültürünü *Ganoderma lucidum'* dan izole edilen polisakkarit ile muamele etmiş ve polisakkarit muamele edilmeyen hücrelere göre IL-1β, TNF-α,ve IL-6 seviyelerinde sırasıyla 5.1, 9.8 ve 29 kat artış gösterdiğini ve bunlara ek olarak bu polisakkaritlerin varlığında T lenfositlerden IFN-γ salımının büyük ölçüde arttığını bildirmiştir.

β- glukan yapıda bir antitümor ajan olan grifolan, *Grifola frondosa'*dan izole edilmiş bir polisakkarittir ve IL-1, IL-6 ve TNF-α makrofajlarının salınımını indüklediği gösterilmiştir (13).

Literatürde, *Scleroderma nitidum* mantarının polisakkaritlerinin IL-1ra (inrerlökin 1 reseptör antagonist), IL-10 ve MIP-1β sitokinlerinin salınımlarını arttırdığı, IFN-γ (%75) ve IL-2'yi ise (% 22) azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu polisakkaritlerin nüklear faktör κB (NF-κB) ifadelenmesine de etkisi olduğu görülmüştür. NF-κB ifadelenmeyi %64 azalmıştır. Buna göre bu mantarın NF-κB ifadelenmesini azaltarak antiinflamatuar bir etkisinin olduğu ifade edilmiştir (14).

Başka bir çalışmada *Cordyceps pruinosa'*nın metanol özütünün, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış murin makrofaj hücre hattı RAW 264.7'de, IL-1β, TNF-α, iNOS ve siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin gen ifadelenmesini bastırarak *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda inhibe ettiği rapor edilmiştir (15).

Araştırma konumuzu oluşturan mantar türleri; *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* sınıfına ait beslenme biçimi mikorizal (simbiyotik) tipte olan makroskobik mantarlardır. Makromantarların insan sağlığına yönelik olarak kullanılabilecek önemli bir doğal kaynak olmasından dolayı bu çalışmada *Leucoagaricus leucothites, Tricholoma terreum, Terfezia claveryi* ve *Rhizopogon roseolus* türlerine ait heteropolisakkaritlerin karakterizasyonu ile antioksidan kapasitesi olduğu bilinen bu türlerden elde edilen polisakkarit özütlerin antioksidan etkilerinin olup olmadığı hedeflenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar toksik etkisinin olmaması nedeniyle polisakkaritlerin klinik uygulamalarda kullanılmasının arttığını göstermektedir. Özellikle mantarların hücre duvarından elde edilen β-glukan ve kitin yapısındaki polisakkaritler inflamasyona karşı yeni ilaç keşfi için umut vaat etmektedir. Bu moleküller patojen ilişkili moleküler paternleri tanıyan reseptörler gibi davranarak patojen tanınmasında, inflamatuar ve immün sistem cevabının başlatılmasında bağışık yanıtı modüle ederler (16).

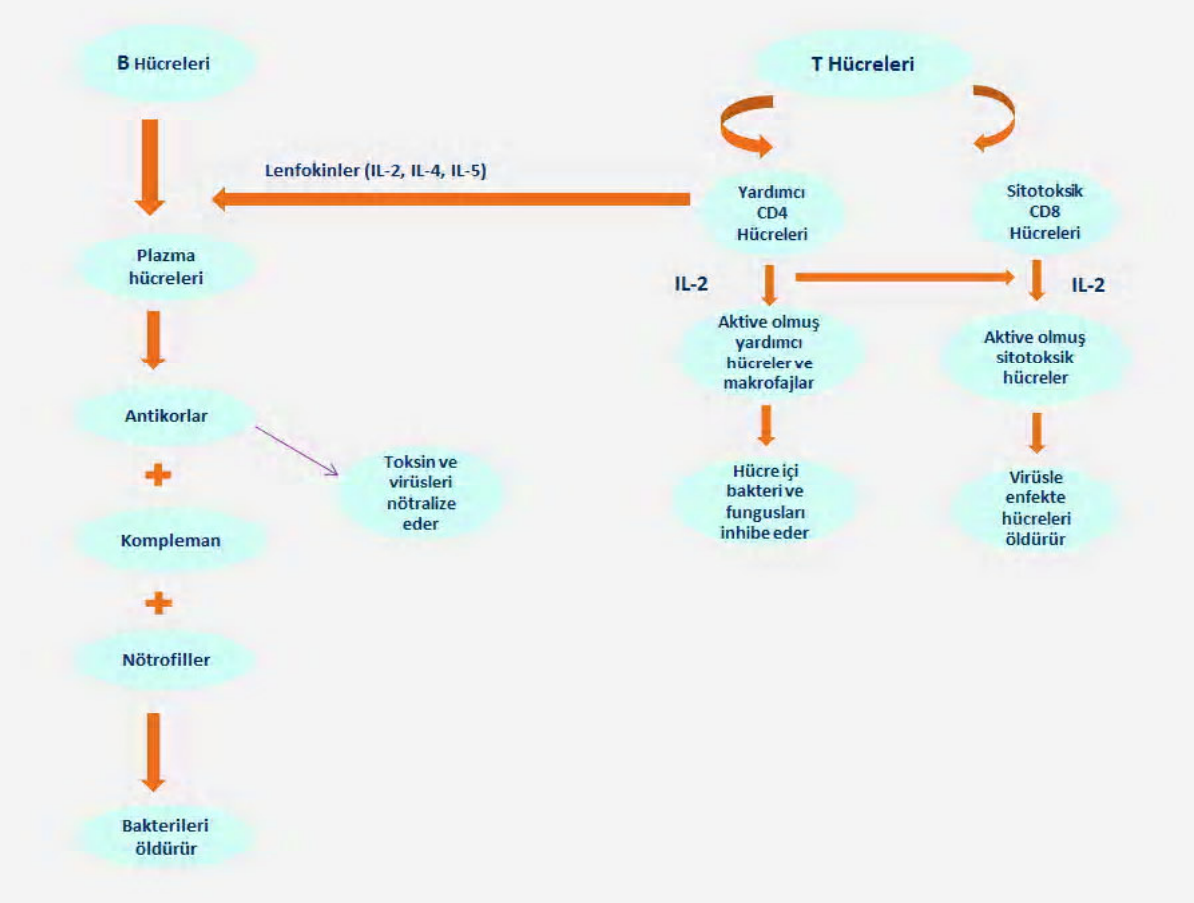
2040 yılına kadar nörodejeneratif hastalıkların sebep olduğu ölümlerin kanserden sonra ikinci sırada yer alacağı literatürde ifade edilmektedir. Bu nedenle etkili olmasının yanısıra güvenli nörokoruyucu ajanların araştırılması bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Etkisi kanıtlanmış sentetik ya da doğal birçok antinöroinflamatuar ajan denenmiş ve bu alandaki çalışmalar halen devam etmektedir. Fakat son yıllarda kullanılan sentetik nörokoruyucu ajanların denge bozukluğu, uyku hali, ağız kuruluğu, anksiyete, yorgunluk gibi bazı yan etkileri olduğu düşünülmektedir. Nerodejeneratif hastalıklarla ilişkili araştırmalarda kısa sürede hızlı üreme yeteneğinden dolayı yaygın olarak kullanılan BV-2 mikroglial hücreleri sinir dokusunda, fagositik ve antijen sunan uzantılara sahip uzun, küçük hücrelerdir (17).

Bu çalışmada fungal polisakkaritlerin BV-2 mikroglial hücrelerinde LPS ile indüklenen nöroinflamasyon sonucu bu hücrelerdeki aktivasyonu ile sitokin salınımı, ve sitokin IL-6 gibi büyüme faktörlerinin aktivitesi ile uyarılan MAP kinaz yolağı ve proinflamatuar protein ifadelenmelerinin ölçülmesi ile moleküler mekanizmalarının incelenmesi bir diğer hedefimiz olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon

Konak savunmaları biribirini tamamlayan ve sıklıkla karşılıklı birbirini etkileyen iki sistemden oluşur. Doğal bağışıklık; mikroorganizmalara karşı genel bir korunma iken belli bir organizmaya karşı korunma kazanılmış bağışıklık olarak isimlendirilir. Doğal bağışıklığa nötrofil, makrofaj ve doğal katil hücreler gibi fagositik hücreler ile komplemanlar, lizozim ve interferon gibi proteinler aracılık ederken kazanılmış bağışıklıkta bu görev T lenfositler, B lenfositler ve antikorlara düşer. Antikorlar toksinler ve virüsleri nötralize eder, bakterileri kolay fagosite olur hale getirirler (18). B lenfositler kazanılmış bağışıklığın antikor aracılı kolunu oluştururken T lenfositler hücre aracılı kolu oluşturur. Antijenler; antikor ve T-B hücrelerinin özgül reseptörlerine bağlanabilen moleküllerdir ve bu moleküller immün yanıtı başlatırlar. B hücrelerindeki reseptörler antijenle doğrudan ilişki kurabilir (Şekil 2.1). Fakat T hücreleri bunu yapamazlar. Bunun yerine T hücrelerindeki reseptörler büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) tarafından kodlanan hücre yüzeyindeki hedef glikoproteinler ile sunulan antijeni tanır. MHC tarafından kodlanan bu glikoproteinler aynı zamanda T hücre gelişiminde de rol alarak organizmaya ait antijenlere karşı yabancı antijenler gibi bir immün yanıt oluşturmasına engel olurlar. Diğer bir deyişle immün sistemin kendisinden olanı ve olmayanı ayırt etmesini sağlarlar (19).

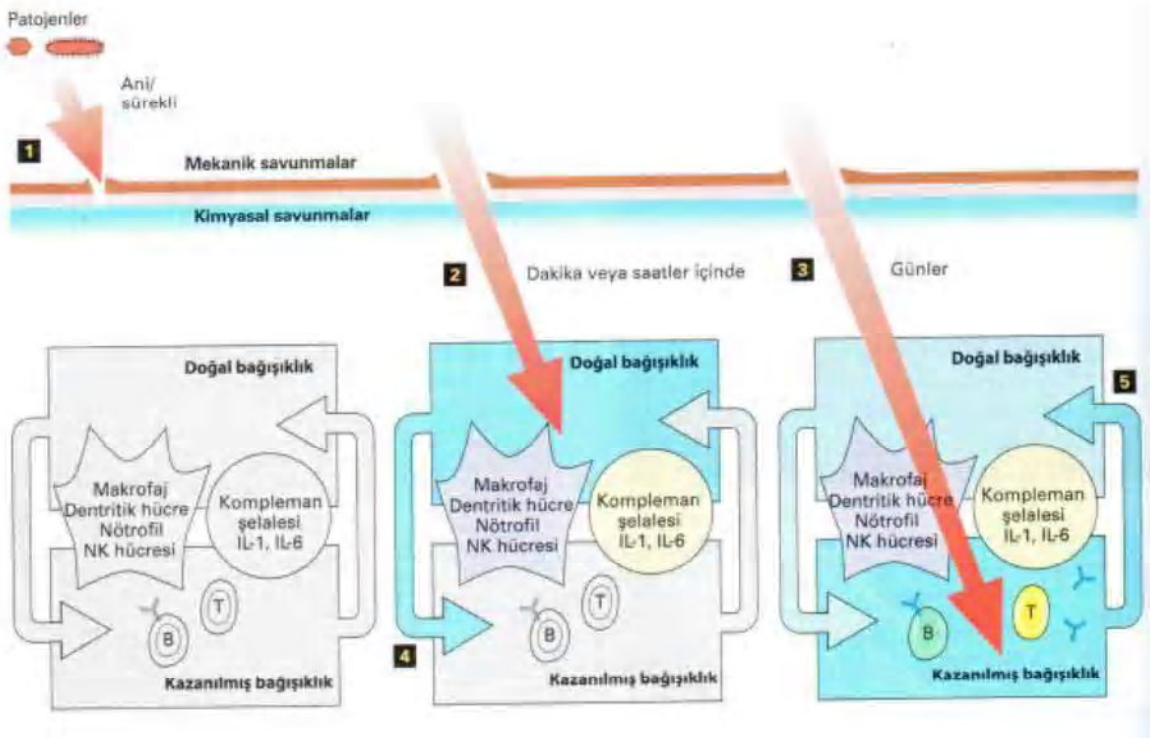


Şekil 2.1. Bağışıklık sisteminin ana yapıtaşlarının işlev ve karşılıklı etkileşimleri (15).

Sol; antikor aracılı bağışıklık. Bu yol stafilokok ve streptokoklar gibi hücre dışı, kapsüllü, piyojenik bakterilere karşı ana savunmayı oluşturur. Antikorlar tetanoz toksini gibi toksinleri ve hepatit B gibi virüsleri nötralize ederler. Sağ; hücre aracılı bağışıklık. Bu yolun iki yapıtaşı bulunur. Yardımcı T hücreleri ve makrofajlar *Mycobacterium tuberculusos* gibi hücre içi bakteriler ile *Histoplasma capsularum* gibi mantarlara karşı ana savunmayı oluşturur. Sitotoksik T hücreleri virüslere karşı önemli bir savunma sağlamakta olup virüsle enfekte hücreleri imha ederek de etki gösterir.

Doğal immün sistemin içerdiği makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler fagositik hücrelerdir ve Toll-benzeri reseptörler ile donatılmıştır. Bu reseptörler, bakteri ve viral kaynaklı saldırganların varlığının belirlenmesi için anahtar sensör görevi görürler. Toll-benzeri reseptörlerin uyarılması antimikrobiyal peptidleri kapsayan bir dizi etkin molekülü harekete geçirir. Dendritik ve makrofajların Toll-benzeri reseptörleri proteinleri belirleyebilir. Dendritik hücreler; antijeni yakalayarak lenf düğümü ve dalağa göç eden hücrelerdir. Özellikle işlenmiş antijenin T hücrelerine sunulmasında aktiftirler. Doğal immün sistemin diğer bir önemli öğesi olan kompleman proteinler inflamasyonu kontrol eden, fagositozu uyaran ve hücre zarında litik etki yapan bir grup serum

proteinidir ve immün sistemdeki antikorlarla etkileşir. Bunlar mikrobiyal ve fungal yüzeylere direkt bağlanabilen proteinlerdir. Bu bağlanma, proteolitik bir şelale yaratarak, patojenin koruyucu zarını geçirgen hale getiren zar saldırı kompleksini içeren por oluşturucu proteinlerin oluşumuyla sonuçlanır (19,20). Kompleman sistemi aktive eden en az 3 farklı yolak vardır. Klasik yolak, kazanılmış immün yanıt sonucu gelişen antikorlara ve bu antikorların mikroorganizma yüzeyine özgül olarak bağlanmasına ihtiyaç duyar. Birçok mikrop yüzeyi alternatif yolak vasıtasıyla komplemanı doğrudan aktive eder. Sonuçta mannozca zengin hücre duvarı içeren patojenler, mannoz bağlayan lektin yolağı vasıtasıyla komplemanı aktive eder. Bağlanan lektin iki adet mannoz bağlayan lektin ile ilişkili proteaz MASP-1 ve MASP-2 'nin aktivasyonunu başlatarak, kompleman zincirindeki diğer bileşenlerin aktivasyonuna neden olur. İnflamasyona yanıtta bir diğer hücre tipi ise her dokuya özgü olan mast hücreleridir. Bu hücreler damar geçirgenliği arttıran ve bundan dolayı saldıran patojene karşı etkili olabilen plazma proteinlerinin (kompleman) bölgeye nüfuz etmesini kolaylaştıran bir aracı olan histamin salgılarlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Omurgalı immün yanıtın 3 basamağı (19).

Solda; mekanik savunma epitel ve deriyi kapsar. Kimyasal savunma mide ortamının düşük pH'sı ve gözyaşındaki antibakteriyel enzimlerdir. Bu bariyerler saldırgan patojenlere karşı sürekli koruma sağlar. Patojenler konağı enfekte etmek için bu savunmaları fiziksel olarak geçmelidir. **1)** Mekanik ve kimyasal savunmayı geçen patojenler **2)** Doğal immün yanıt hücreleri ve moleküllerince ele alınır (mavi), bunun içerisinde fagositer hücreler (nötrofiller, dendritik hücreler, makrofajlar), doğal öldürücü hücreler, kompleman proteinleri ve belirli interlökinler (IL-1, IL-6) doğal savunmada dakikalar ve saatler içerisinde aktive olur. Sağda; doğal immün yanıt tarafından yok edilemeyen patojenlerle kazanılmış immün yanıt ilgilenir **3)** özellikle B ve T hücreler. Kazanılmış immün yanıtın tam aktivasyonu günler gerektirir. Doğal yanıt ürünleri kazanılmış yanıta yardım ederler **4).** Benzer şekilde antikorlar gibi kazanılmış yanıtın ürünleri doğal immün sistemin işlevinde yardımcı olur **5).** Pekçok hücre tipi ve salgı ürünleri, doğal ve kazanılmış immün yanıt arasındaki engeli aşarak iki taraflı konak savunmasının bağ kurmasına hizmet eder.

İnflamasyon, fiziksel hasar veya patojenlerin neden olduğu doku hasarına karşı verilen yanıttır. Enfekte bölgelerde artan kan akımı, damar duvarındaki endotel hücrelerin aralarının açılmasına bağlı damar geçirgenliğinin artması ve venüllerin dışındaki çevre dokuya lökosit göçünün artması ile görülür. İnflamatuar yanıt enfeksiyona karşı savunmada dokulardaki enfekte hücrelerin tanınması ve hasarlanması için gerekli olan lökosit, antikor ve immün sistem moleküllerin enfeksiyon bölgesindeki dokuya girişini sağlar. İnflamasyonlu dokularda lökosit göçü, ven endotelinin yüzeyindeki kemokinler (özel grup sitokinler) ile kontrol edilir. Dolaşan lökositlerin endotele bağlanmasına

neden olan kemokinler aktive olur ve endotelden göçü başlatırlar (20). Her ikisi de fagosit olan nötrofil ve makrofajlar inflamatuar yanıtta önemli hücrelerdir. Nötrofiller akut, makrofajlar kronik inflamasyonda etkindirler. Kronik enfeksiyonlarda makrofajlar fagositik işlevlerinin yanında gamma interferon ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi iki önemli proinflamatuar sitokin üretir. Akut evre yanıtının ana uyarıcısı interlökin-6 (IL-6)'dır. IL-6'nın kaynağı etkinlenmiş yardımcı T hücreleri ise de diğer birçok hücre tipi bunu üretir. Nötrofil ve makrofajlar inflamasyon noktasına kemokinler (kemotaktik sitokinler) adlı küçük polipeptidler tarafından çekilir. Kemokinler enfeksiyon alanındaki doku hücreleri, yerel endotel hücreleri ve buraya yerleşik nötrofil ve makrofajlar tarafından üretilir (18).

İnflamasyonda pekçok dokuda kan damarlarına yakın bölgeye yerleşmiş olan ve inflamatuar mediyatörü granüllerle dolu olan mast hücreleri ve lökositler hasarlı bölgeye alınırlar. Bu hücreler araşidonik asit, sitokinler ve kemokinler gibi çözülür reaktif molekülleri üretir. Bu anahtar mediyatörler sinyal iletim dizilerini aktive etmelerinin yanında nüklear faktör κB (NFκB), sinyal ileticisi ve aktivatörü 3 (STAT 3), hipoksi indüklenebilir faktör- 1α (HIF-1α), aktivatör protein 1 (AP-1), T hücreleri gibi transkripsiyon faktörlerindeki değişikliklerin uyarılmasınıda sağlarlar. Siklooksijenaz 2 (COX 2) ve indüklenebilir nitrik oksit sentezinin (İNOS) başlaması, inflamatuar sitokinlerin (tümör nekroz faktörü, interlökin 1,6 ve kemokinler (IL-8, kemokin reseptör 4)) anormal ifadelenmeyi ve spesifik microRNAs ifadelenmede ki değişikliklerin oksidatif stres ve inflamasyonun uyarılmasında önemli rol oynadıkları rapor edilmiştir (21). Bu inflamatuar- oksidatif stres sürekliliği sağlıklı epitel ve stromal hücrelerin zarar gördüğü ve uzun süren bir karsinogeneze yol açar (22).

Son yıllarda birçok nörolojik hastalığın patogenezinde inflamasyonun önemli rol aldığı düşünülmektedir. Santral sinir sistemi hasarlarının mekanizmasında rol oynayan önemli faktörlerden biri olan nöroinflamasyon beynin enfeksiyonlara, hastalıklara ve yaralanmalara karşı vermiş olduğu yanıtları içeren bir süreçtir. Nöroinflamasyon, homeopatik sistem hücreleri olan lenfositler, monositler ve makrofajlar ile santral sinir sistemi hücreleri olan mikrogliallerden oluşan iki tip immün sistem hücresini kapsar (23). Bu hücreler beyinde yalnızca destek ve besleyici rol değil aynı zamanda her hangi bir stres ya da hasar durumunda inflamasyon sürecini arttıran bir yanıta da neden olabilirler. Bu yanıt genelde diğer endojen antiinflamatuar ve nöroprotektif yanıt ile

birlikte beyin homeostazını dengeler. Bu homeostazis travma, iskemi veya sepsis gibi çeşitli hastalık durumlarında bozulduğunda, kontrol edilemeyen glial aktivite ile birlikte; sitokin, kemokin ve diğer nörotoksik ajanların salınımına neden olur. Salınan bu ajanlar difüzyon yoluyla beynin daha derin dokularına geçerek, hücre işlev bozukluğuna ve nöronal hücre kaybına neden olabilir. Bunun sonucunda işlev bozuklukları, davranış değişiklikleri, hatta nörodejenerasyon ile kalıcı kayıplar görülebilir (24).

Akut nöroinflamasyon inme, travma ve infeksiyon gibi beyin hasarlarında görülen kısa süreli inflamasyonlardır (24). İnflamasyon süresinin uzadığı ve çeşitli hastalıklara zemin hazırlayan kronik nöroinflamasyon ise Parkinson, Huntington, Alzheimer ve Multipl sklerozis (MS) gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (25-27). Kan beyin bariyeri, beyni hem kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden korurken hemde normal beyin fonksiyonlarını muhafaza ederek beyin homeostazisini sağlar (28). Kan beyin bariyerinin bozulması ve santral sinir sistemindeki proinflamatuar faktörlerin uzun süreli aktivasyonu nörodejeneratif durumların ortaya çıkmasına neden olur.

Nöroinflamasyon hiper-reaktif mikrogliaların varlığı ile karakterize edilir (29, 30). Mikroglial hücreler beyinde ve omurilikte yerleşmiş hücre dışı uyarılara yanıt veren ve nöroinflamasyonun ilerlemesinde önemli rol oynayan immün sistemin mononüklear fagositleridir ve diğer dokulardaki makrofajlara benzer biçimde aktive oldukların da fagositoz, antijen sunumu ve çeşitli inflamatuar ve nörotoksik faktörlerin salınımı gibi özellikler göstermektedir (31). Normal şartlar altında, dinlenme halindeki mikroglial hücreler dallanmış yapısı sayesinde ortamdaki herhangi bir değişikliği tespit ederek santral sinir sisteminin ilk immün savunma hareketini başlatır (32).

Santral sinir sistemini etkileyen nörodejeneratif şartlar, infeksiyonlar, travmatik beyin hasarları ve inme gibi herhangi bir hastalık varlığında tehlike sinyalleri mikroglial hücreler ile birlikte proinflamatuar moleküllerin aktivasyonunu uzatır. Dokularda makrofajlara benzer şekilde aktive olan mikroglial hücreler TNF-α, süperoksidaz, nitrik oksit gibi sitotoksik faktörlerin ve IL-1β, IL-6 ve IL-2 gibi proinflamatuar sitokinlerin salınımını ve uyarılması sağlar (33). Ayrıca nöron ölümüne neden olan inflamasyonu tetikleyen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin ortaya çıkmasında önemli bir faktördür (27). Proinflamatuar tepki ölü nöronları ve hücre kalıntılarını uzaklaştırmaya yardımcı olsa da aktif mikroglial hücreler sağlıklı nöronlara zarar vererek patojenik sürece

katkıda bulunur ve Alzheimer, Parkinson, MS gibi nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynar. Her bir hastalığın etiyolojisi farklı olsa da, inflamasyon çoğu nörodejeneratif hastalıklarda mevcuttur (34-36).

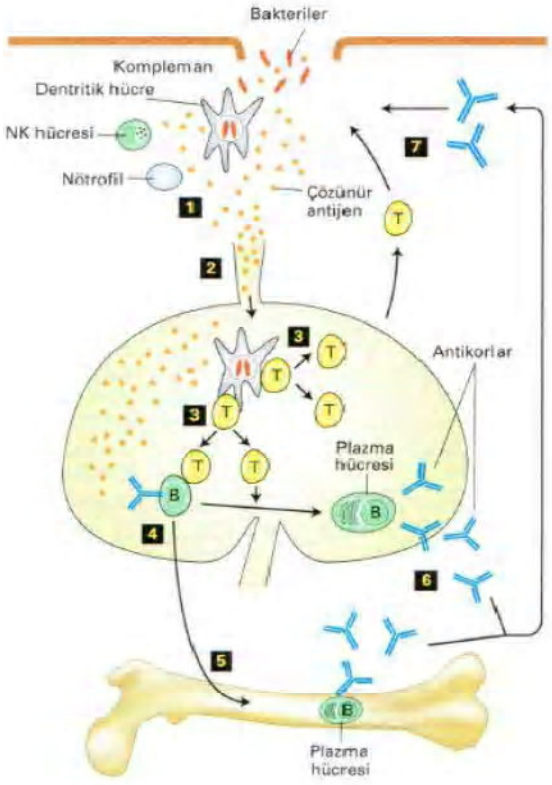
Çok sayıda hayvan gerektiren nörodejenerasyon, toksikoloji ve immünite araştırmalarında mikroglial hücrelerin rolü önemlidir. Santral sinir siteminde yer alan ve makrofaj benzeri olan mikroglialler immünite ve neropatolojik inflamasyonda önemli roller üstlenir. Primer kültür ve hayvan modelli yüzlerce çalışmada kullanılmıştır. Fakat çoğalma kapasitelerinin sınırlı olması, her deney öncesi taze olarak izole edilmesi gerektiğinden ve biyokimyasal araştırmalarda oldukça fazla sayıda hücreye ihtiyaç duyulmasından ötürü çok sayıda hayvan tüketildiğinden dolayı zaman, sarf ve malzeme ihtiyacını azaltacak alternatif hücre modeline ihtiyaç duyulmuştur. Mikroglial hücreler, mikrobiyal saldırıları ve beyin hasarını tespit emek için toll-benzeri reseptör ailesinin (TLR family) patern tanıyıcı reseptörleri (PRR) ile donatılmıştır (37,38). Çoğu mikroglial aktivasyon ve sinyalizasyon çalışması in vitro olarak BV-2 hücre hattında gerçekleştirilmiştir (39). Araştırmalarda mikroglial hücre hatlarının kullanımı kısa sürede hızlı üreme yeteneğinden, sürekli hücre preperatlarının ve hayvan deneylerine gerekliliği azalttığından dolayı yaygın olarak tercih edilir. Fare mikroglial hücre hattı olan BV-2, neonatal ya da yetişkin fare beyin kültüründen izole edilen mikroglial hücrelerden türetilen primer mikroglial hücrelerdir. Bu hücrelerin farmakolojik ve fagositoz çalışmalar ile önemli pekçok immünolojik keşiflerin yapıldığı araştırmalarda kullanıldığına dair en az 200 makale yayınlanmıştır (40-42). BV-2 hücrelerinin primer mikroglial hücrelere benzerliği nöronal hasara neden olan ve mikroglialler ile tetiklenen NADPH-oksidaz enziminin fonksiyonel ekspresyonu için önemlidir (43,44). İnflamasyonun yol açtığı nörpdejeneratif hastalıklara ilişkin araştımalarda BV-2 hücre hattının model hücre olarak kullanılmasından dolayı çalışmamızın inflamasyon kısımları bu hücre hattı üzerinden gerçekleştirilmiştir.

2.1.1. Patojenik İnflamasyon

Bakterilere karşı piyojenik yanıt ve granülomatöz yanıt olmak üzere iki tip konak savunması mevcuttur. *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi hücreleri işgal etmeyen hücre dışı patojenlerden antikor, komplemen ve nötrofillerden oluşan piyojenik yanıtla korunulur. *Mycobacterium tuberculosis* ve *Listeria monocytogenes* gibi hücreleri işgal edip bunların içinde yaşayan hücre içi patojenlerden granülomatöz

yanıtla korunulmakta olup bu savunma makrofajlar ve CD-4 pozitif T hücrelerinden oluşur. Patojenik inflamasyona yanıtta bu bakteriler polimorfonükleer nötrofiller (PMN) ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Fagositoz olayı, göç, yutma ve öldürme olarak 3 basamağa ayrılabilir. PMN'lerin organizmaların bulunduğu yere göçü IL-8 gibi kemokinlere ve damar geçirgenliğine katkıda bulunan kompleman bileşenlere (C3a ve C5a) bağlıdır. PMN'lerin enfeksiyon yerinde endotele yapışması önce endotel üzerindeki selektin proteini ile etkileşime geçmesi ve sonra PMN yüzeyinde bulunan LFA proteinleri denen integrin proteinlerinin endotel hücre yüzeyindeki ICAM proteinleri ile etkileşimine aracılık eder. Endotel üzerindeki ICAM proteinlerinin düzeyi makrofajlar tarafından üretilen IL-1 ve TNF gibi sitokinler tarafından artırılır. Bu artış damar endotelinin yapışma özelliğini artırır ve inflamasyonlu dokuya daha fazla makrofaj geçişini sağlar. IL-1, IL-6 ve TNF aynı zamanda akut faz yanıtını başlatır. Bu yanıtta, kompleman bileşenlerin yanında doku harabiyetiyle ortama salınan maddelerin temizlenmesi ile ilişkili proteinlerin üretimi de artar. Fagositer hücrelerin öldürme yolakları oksijene bağımlı ve oksijene bağımsız olmak üzere iki yöntemde incelenebilir. Kısaca oksijen bağımlı yolakta, yutma eylemi sırasında solunum patlaması denen yeni bir metabolik yol tetiklenir (18).

Bu olay süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi iki mikrobisidal ajanın oluşması ile sonlanır. Moleküler oksijenden bir elektron süperoksit radikalini yapmak üzere indirgenir. Süperoksit dismütaz enzimi iki süperoksit radikalinden hidrojen peroksit oluşmasını katalizler. Böylece süperoksit molekül, patojenleri öldürebilen serbest radikaller ve diğer toksik türevler oluşturmak üzere diğer moleküllerle etkileşir. İkinci oksijene bağımlı yolakta ise solunum patlaması mikrobisidal ajan olan nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) radikal üretimi ile sonlanır. $NO^{\cdot}$, nötrofil ve bakteriyofajlar tarafından yutulan mikropların oksidatif öldürülmesine katılan bir serbest radikaldir. Fagositozun yutma basamağını takiben hücrelerde nitrik oksit sentaz uyarılır. Bu enzim aşırı miktarda $NO^{\cdot}$ üretir. Oksijen indirgeme yolağı ürünlerinin $NO^{\cdot}$'le etkileşimi sonucu ortaya çıkan peroksinitrit gibi çok daha toksik maddelerin ortaya çıkmasına yol açar (18,20). Şekil 2.3. hastalık yapıcı bakterilere karşı inflamasyon yanıtta rol alan anahtar oyuncuları ve ardından başlayan kazanılmış immün yanıtı göstermektedir.



Şekil 2.3. Bakteriyel patojenlere karşı doğal ve kazanılmış immün yanıtın beraber hareketi (19).

1) Bakteri konağın mekanik ve kimyasal bariyerini geçtikten sonra kompleman proteinleri ve hemen koruma sağlayan nötrofillerle karşılaşır. **2)** Doku hasarı sonucu uyarılan çeşitli inflamasyon ara ürünleri bölgesel bir yanıt oluşturur. Bakterilerin bölgesel yıkımı bakteriyel antijenlerin salınmasına neden olur, bunlar lenfatik kanalla vasıtasıyla lenf düğümlerine taşınır. **3)** Enfeksiyon bölgesinde antijenle karşılaşan dendritik hücreler mikrobial ürüne cevap olarak göç eder ve T hücrelerine aktive edebilecekleri lenf düğümlerine giderler. **4)** Lenf düğümünde antijenle uyarılmış T hücreleri çoğalır ve B hücrelerine yardım ederler. **5)** B hücrelerinin bir kısmı kemik iliğine giderek plazma hücrelerine farklılaşır. **6)** İmmün yanıtın sonraki basamaklarında aktif T hücreleri, antijenle karşılaşmış B hücrelerine antijene özgül antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşmalrı için yardım eder. **7)** Bakteri ile kaşılaşınca üretilen antikorlar enfeksiyon kaynağını yok etmek için kompleman proteinleri ile sinerji içerisinde işlev görürler.

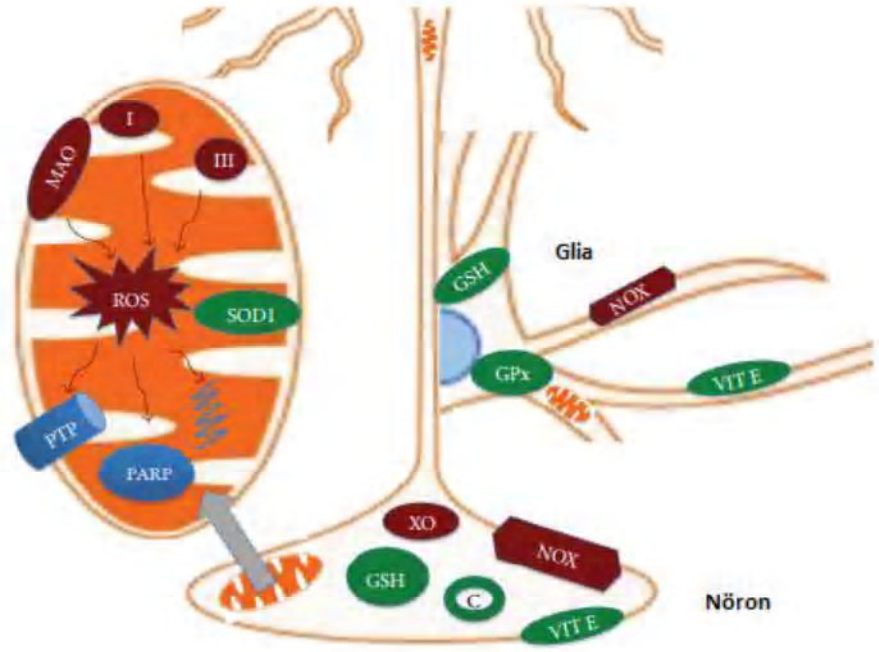
Akut bakteriyel menenjit tüm dünyada morbidite ve mortaliteye neden olan ciddi bir infeksiyondur. *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* dünyada ve ülkemizde bakteriyel menenjit etkenleri arasında en sık görülenlerdir. *Listera monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*, B grubu streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*) ve stafilokoklar (*S.aureus ve S.epidermidis*) daha seyrek izole edilen bakterilerdir (45-47).

Kan beyin bariyerinin permeabilitesi bozulduğu anda bakterilerin beyin omurilik sıvısı (BOS)'na geçişi gerçekleşir ve nötrofillerin BOS'daki fagositik aktiviteleri de bakteri çoğalması ve infeksiyonun şiddetlenmesini engelleyemez. Bakterilerin çoğalması için uygun bir zemin olan BOS'da, bir taraftan bakteri sayısındaki hızlı artış, diğer taraftan da nötrofiller tarafından gerçekleşen fagositoz, ortamda hücre duvar parçaları ve liposakkaritler gibi bakteriyel ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu ürünler IL-1, IL-5, IL-8, IL-6 ve TNF-α, kemokinler gibi sitokinlerin artışına ve inflamasyona yol açar. Menenjitte, beyni damar içi kompartmanlardan ayıran ve santral sinir sisteminin hemostazını sağlayan kan beyin bariyerinin geçirgenliği artmıştır. İnflamasyon esnasında kan beyin bariyerinin bozulması antibiyotiklerin pek çoğunun BOS'na geçişini yaklaşık beş kat artırmaktadır (47).

2.1.2. Oksidatif Stres

Aerobik organizmalar tarafından metabolize edilen oksijenin yaklaşık % 1-2'si suya dönüştürülmek yerine kısmen süperoksit anyon radikaline ($^{\cdot}O_2^-$) indirgenir. Süper oksit, sulu biyolojik sıvılarda kararlı olmayıp özellikle toksik olan hidrojen peroksite (H_2O_2) ve daha sonra hidroksil radikallerine yıkılır (19). Oksidatif stres, serbest radikaller ile reaktif oksijen türleri (ROS) arasındaki dengenin bozulması ve antioksidan olarak bilinen koruyucu mekanizmanın giderilmesi olarak tanımlanır. Tüm organizma üzerindeki bu dengesizlik önemli biyomoleküllerin ve hücrelerin zarar görmesine yol açar (48). ROS proteinleri DNA'yı ve zar lipidlerindeki doymamış yağ açil gruplarını kimyasal olarak modifiye ederler ve dolayısıyla normal fonksiyonlarına müdahele edebilirler. ROS normal hücresel metabolizmanın bir ürünüdür ve bitki ve hayvan hücrelerinde sinyal yolakların uyarılmasında önemli rol oynamaktadır (49). Pekçok ROS hücrelerde mitokondriyal solunum zinciri tarafından üretilir (50). Endojen metabolik reaksiyonlar esnasında aerobik hücreler süperoksit anyon ($^{\cdot}O_2^-$), singlet oksijen ($^1O_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve organik peroksidaz gibi reaktif oksijen türlerini üretir (51). Temel antioksidan enzimler olan süperoksit dismutazlar (SODs) $O_2^{\bullet -}$ indirgenmesinde kritik rol oynarlar. Süperoksit dismütaz ailesi iyonize radyasyon ve elektron taşıma zinciri boyunca mitokondriyal matriksin içinde oksijen metabolizmasının yan ürünü olarak üretilen oksijen hareketlerini içeren hücre dışı uyarıcılardan türevlenen süperoksit anyon radikallerinin ortadan kaldırılmasını sağlar (52). Moleküler oksijene elektron transferi mitokondri membranında bulunan

elektron taşıma zinciri aracılığıyla solunum zinciri düzeyinde gerçekleşir (53,54). Glutatyon peroksidaz (GPx), H_2O_2 indirgenmesini veya bir elektron vericisi olarak kullanılan glutatyonu (GSH) katalize eden çoklu izozim ailesinin genel adıdır. Santral sinir sisteminin temel antioksidanı olan GSH beyinde en bol bulunan küçük moleküllerdir. İndirgenmiş GSH, non-enzimatik olarak doğrudan serbest radikaller, özellikle süperoksit radikalleri, hidroksi radikalleri, nitrik oksit ve karbon radikallerinin ortadan kaldırılmasına etki edebilir. GPx ve GSH reduktaz H_2O_2'nun yok edilmesinde enzimatik olarak iş görürler (55). Şekil 2.4.'de Glia ve nöronlardaki temel ROS ve antioksidan üreticilerinin diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.4. Glia ve nöronlardaki temel ROS ve antioksidan üreticilerinin diyagramı (56).

Ana ROS üreticileri kırmızı ile gösterilmiştir: monoamine oksidas (MAO), mitokondri içinde bulunan kompleks I ve III. Mitokondride ROS oluşturan geçirgen geçiş poru (permeability transition pore (PTP)), PARP ve mitokondriyal DNA. Sitozolde ise; temel ROS üreticileri olan NADPH oksidaz (NOX) ve ksantin oksidaz (XO). Ana antioksidan sistem yeşil renk ile gösterilmiştir: mitokondride bulunan süperoksit dismütaz (SOD), Glutatyon (GSH), Katalaz (C), Glutatyon peroksidaz (GPx).

NADPH oksidaz fagositlerde ilk tanımlanan çoklu enzim kompleksidir. NADPH oksidaz, NOX gen ailesinin bir üyesidir. Proteinlerin NOX ailesinin genetik ifadelenmeleri çeşitli hücrelerde düzenlenir. NADPH oksidaz mikroglia, nöronlar ve

astrosit hücrelerinde bulunur (57-59). NOX enziminin beyin hücrelerindeki fiziksel rolü tam olarak aydınlatılmamakla birlikte çoğunlukla NADPH oksidaz tarafından üretilen süperoksit bir etki gösterdiği düşünülmektedir (60). Ksantin oksidaz çeşitli substratların oksidasyonunu katalizler ve ürik asit, hidrojen peroksit ve süperoksit üretmek için moleküler oksijene elektron geçişini sağlar. Monoamin oksidaz A (MAOA), oksidatif katabolizmada serotonin, dopamin ve epinefrin gibi amin nörotransmitterler için önemli bir role sahiptir (61). Manoamin oksidaz hidrojen peroksiti oluşturan FAD-$FADH_2$ döngüsünde kullanılan monoaminleri yıkar ve sonuçta aldehit üretimi gerçekleşir. Antioksidan terapilerinde yaygın olarak beyindeki lipid peroksidasyonu temel giderici olan vitamin E, hücre içi molekül indirgeyici vitamin C ve solunum zincirinde elektronları kompleks I ve II 'den III'e transfer eden koenzime Q10 kullanılır (56).

Vücudun savunma hücreleri de patojenleri öldürmek amacıyla ROS üretirler. İnsanlarda aşırı veya orantısız ROS üretimi kalp yetmezliği, nörodejeneratif hastalıklar, alkolün indüklediği karaciğer hastalıkları, diabet ve yaşlanma dahil birçok farklı hastalıkta gösterilmiştir (19). Hipoksik şartlar altında, mitokondriyal solunum zinciri reaktif nitrojen türleri (RNS) tarafından oluşturulan nitrik oksit (NO) üretir (50). Bu RNS reaktif aldehit-malondialdehit ve aşırı lipit peroksidasyonuna neden olan 4-hidroksinonenal gibi başka reaktif türleri oluşturur. Proteinler ve lipitler oksidatif saldırılar için önemli hedeflerdir ve bu moleküllerdeki modifikasyonlar mutajenez riskini arttırır (62).

Oksidatif stres birçok nörodejeneratif hastalıklarda yaygın görülen bir faktördür (33). Mikroglial hücrelerde, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi oksijeni süperoksite dönüştüren nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)-oksidaz enzim kompleksi tarafından katalizlenir. Hücre zarı ve organellerin membranlarında dağıtılmış olan ROS, patojenlere karşı hücre savunmasına katılır (63). Bu nedenle proinflamatuar sitokinler gibi ROS 'ların yararlı ve zararlı etkileri bir denge halindedir.

İnsanlarda normal yaşlanma döneminde, yaşa bağlı olarak ROS seviyelerindeki artışa genellikle bilişsel ve motor fonksiyonlarında bir azalma eşlik eder (64). Yaşlanmada santral sinir sisteminde NADPH oksidaz, ROS seviyelerindeki artış ile ilişkilendirilmiştir. Nöral hasarın, mikroglial aktivasyon yoluyla NADPH oksidaz tarafından aracı olan ROS 'un hücre dışı salgısı tarafından indüklendiği rapor edilmiştir (65).

Alzheimer ve Parkinson hastalarının santral sinir sistemlerinde NADPH-oksidaz'ın düzenleyici olduğu literatürde belirtilmiştir. Amyloid-beta (βA) sıçan mikroglial hücrelerinde ve insan fagositlerinde NADPH oksidaz aktivasyonunu doğrudan indükler (66). NADPH oksidazın aktivasyonu oksidatif stresin oluşumu ile sonuçlanır. Bu oksidatif stres sinyalleri komşu hücrelere iletilir (56).

Sistemde bulunan antioksidan konstrasyonlarında azalmaya ek olarak Alzheimer ve Parkinson'dan müzdarip hastaların çoğunda ROS üretiminde artış gözlenmiştir. Santral sinir sisteminde, ROS miktarında ki aşırı artış mitokondriyal apoptozu, sitoplazmaya sitokrom C salınımını ve mitokondriyal işlev bozukluğunu tetikleyebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle kronik nöroinflamasyon sürecinde ROS üretimi artar. Aşırı ROS üretimi nöronal ölümle sona eren apoptoza neden olur (67).

ROS üretiminin protein kinaz C ve NADPH oksidaz ile aktive olan mikroglial fagositler için ortak bir sinyal mekanizması olarak hareket ettiği rapor edilmiştir. Mikrogliaların çoğalmaları ve morfolojilerindeki değişimler NADPH-oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksitler ile düzenlenir. Bu nedenle aktif mikrogliadaki NADPH-oksidazın katalitik olayları oksidatif strese ve nöroinflamasyona önemli katkıda bulunur (68).

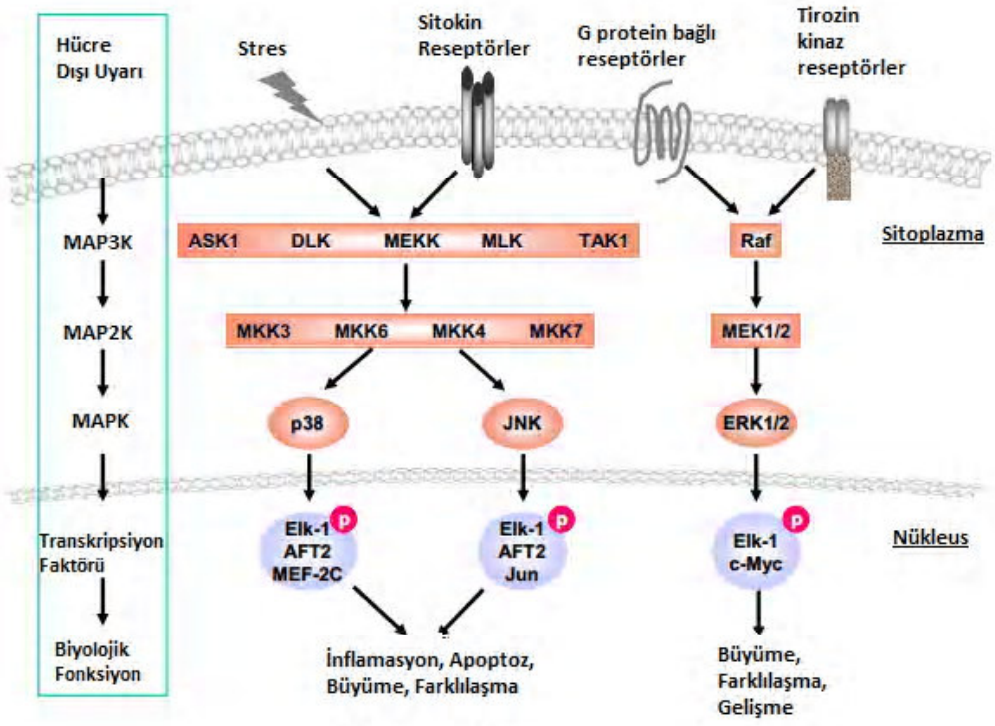
2.1.3. Hücre Ölüm Yolakları

Nüklear transkripsiyon faktörü kappa-B (NFκB janus kinazlar (JAK-STATs) ve mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPKs) gibi hücre içi sinyal yolakları LPS ile uyarılmış makrofajları aktive edebilir ve inflamatuar eylemler ile immün yanıtı düzenleyebilir. Özellikle NFκB doğal ve kazanılmış bağışıklığın kontrolünde ve inflamatuar yanıt sırasında çeşitli genlerin ifadelenmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (69). STAT yolağına benzer şekilde NFκB yolağının aktivasyonu tartışmasız bir şekilde kanseri uyarmaz ve STAT yolağı gibi hematopoetik hücrelerde diğer hücre tipleri ile kıyaslandığında farklı fonksiyonlara sahiptir. NFκB yolağının primer fonksiyonu, lenfoid hücrelerin, inflamasyonun ve apopitozun regülasyonudur. Bununla birlikte bazı hücre tiplerinde, spesifik olarak sitokinlere yanıtta hücre proliferasyonunun regülasyonuna dahil olur. LPS ile uyarılmamış hücrelerde NFκB inhibitör proteinlerine (IκBs) bağlanarak latent formda tutulur. LPS ile uyarıldığında IκBs, IκB kinaz (IKK) tarafından fosforile edilir ve böylece NFκB dimerlerinden NFκB -IκB kompleksi salınır. Aktif NFκB, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 gibi hedef genlerin düzenleyici bölgelerinde transkripsiyonu yönetir (70-72).

Transkripsiyon faktörlerini aktive ederek uzun dönemli genetik etkilere yol açan JAK/STAT yolağındaki sitokinler, özellikle kan ve bağışıklık sistemindeki hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında pek çok önemli rol oynamaktadır. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT (Signal transducer and activator of transcription) proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde 7 STAT proteini tanımlanmıştır. Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır (73). STAT sinyal yolu sitokin IL-6 gibi büyüme faktörlerinin aktivitesi ile uyarılan çeşitli yolaklardan biri olarak aktive edilir (72). Hematopoietik hücre proliferasyonu ve farklılaşması, IFN'lar, interlökinler ve koloni uyarıcı faktörler olarak bilinen bir grup polipeptid yapılı sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Bu sitokinler reseptörlerine bağlanır ve downstream kaskadları aktive ederler. Bu reseptörlerin en büyük özelliği, kendilerine ait "reseptör tirozin kinaz" aktivitelerinin bulunmaması ve diğer tirozin kinazları kullanmalarıdır. Ligandın reseptörüne bağlanmasından sonra, dimerizasyon gerçekleşir. Bunu takiben hücre içinde JAK grubu tirozin kinaz aktivasyonu gerçekleşir. STAT'lar hücre membranında fosforile edilip nukleusa geçtikten sonra ligandına bağlanınca birçok IL-6 reseptör proteini tirozinden fosforile edilen janus kinazları (JAK1 veya JAK2) güçlendirmeye başlar. Bu fosfotirozinler çeşitli STAT proteinlerinin (predominant olarak STAT1, STAT3 veya STAT5) SH2 domainleri için bağlanma bölgesi olarak hizmet ederler. Reseptör/JAK kompleksine bağlandığında STAT faktörleri de fosforilasyon ile aktive olurlar. Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır; Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. Daha sonra ya αα ya da αβ oligomerizasyonu gerçekleşir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder. Aktive JAK proteinleri, reseptörü de fosforile ederler. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar. STAT proteinleri daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar. STAT proteinleri güçlü transkripsiyonal aktivatörler değillerdir ve genellikle etkili bir transkripsiyonal aktivasyon için komşu dizilere bağlanan diğer faktörlerle birleşirler. STAT hedef genleri arasında JAK inhibitörü olarak görev yapan ve STAT sinyallerinin sonlandırılmasına katılan SOCS faktörlerini kodlayan gen vardır. Bu terminasyon SHP protein fosfatazlar yoluyla defosforilasyon ile desteklenir. JAK-STAT kaskadı

inflamatuar yanıtta zorunlu sinyal yolağıdır. Reseptöre bağlı LPS, STAT fosforilasyonuna neden olan JAK ile ilişkili reseptörün fosforilasyonunu indükler. Fosforile STAT reseptör kompleksinden uzaklaşır ve sonra hedef genleri kodlayan proinflamatuar sitokinler, kemokinler, iNOS ve COX-2 gibi enzimlerin transkripsiyonunu düzenlemek için çekirdekte translokasyona uğrar (72-78).

Epitelyal hücrelerde sitokin aktivitesi, STAT faktörlerine ilave olarak NFκB faktörlerini ve MAPK yolağı ile etkileşimi içerir. MAP kinazlar, hücre içi serin/treonin protein kinazlar ve hücre dışı sinyal düzenleyicileri olan kinaz 1/2 (ERK 1/2), p38 MAPK ve c-Jun NH_2-terminal kinaz (JNK) olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bu sinyal yolağı hücre büyümesi, hücre çoğalması, farklılaşma, hücre ölümü ve immün yanıtın dahil olduğu çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol oynar. Ökaryotik hücrelerin tümünde bulunan MAP kinaz yolu hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu proteinler reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi sinyalin amplifikasyonu ile sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiğinin düzenlenmesi açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu ile başlar ve MAP3K'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAP2K (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive ederek hücrenin biyolojik cevabı oluşur (79).



Şekil 2.5. MAPK sinyal kaskadı (80).

MAPK sinyalizasyonu MAP3K>MAP2K>MAPK kaskadı tarafından kontrol edilir. Stres, Sitokinler, G-proteinler ve tirozin kinaz reseptörlerin tümü aktivite gösterir. MAP3K, MAPK p38, JNK ve ERK proteinlerinin aktifleşmesini sağlar .

LPS ile aktive edilen MAPK, inflamatuar hastalıklarda iNOS ve COX-2 genlerinin transkripsiyonunun aktivasyonuna yol açar (Şekil 2.5) (81,82). Birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteini olarak tanımlanan Toll-like reseptörler (TLR), patern tanıyıcı reseptörlerdir (PRR) ve patojen tanınmasında, inflamatuar ve immün sistem cevabının başlatılmasında önemli bir role sahiptir. TLR, karakteristik olarak ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL)-1 reseptör (TIR) domainden oluşur. LPS, patern tanıyıcı reseptör (PRR) olarak bilinir (83). TLR, patojen ilişkili moleküler patern (PAMP) ile bağlandığında intrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuar sitokinler sentezlenir (84,85). İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR olan TLR-4 lipopolisakkaridler (LPS)'in tanınmasında görev almaktadır. Kovalent bağlarla bağlı hidrofilik bir heteropolisakkarit olan LPS, gram negatif bakteri hücre duvarının temel bileşenidir ve endotoksin olarak tanımlanır (86). TLR-4 bir LPS

reseptörüdür ve fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD-2 ve LPS-bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturarak LPS cevabını sağladığı tespit edilmiştir (87,88). TLR-4'ün yanısıra TLR-2'nin aracılığı ile LPS'nin bazı varyantları tanınabilmektedir. TLR-2 peptidoglikan, lipoteikoik asit, gram-pozitif LPS ve bir grup gram-pozitif makromolekül ile bağlanıp cevap verebilmektedir (89). Mantarlardan ve bitkilerden izole edilen polisakkaritlerin TLR 4 sinyal yolağında mutasyonlara yol açarak immün düzenlemede rolü olduğu rapor edilmiştir (90-92).

LPS, güçlü immün yanıt oluşturan büyük bir moleküldür. Özellikle COX-2 ürünü prostaglandin E_2 (PGE_2) ve iNOS ürünü nitrik oksit (NO) gibi inflamatuar mediyatörleri üreten mononüklear fagositleri uyarıcı etki gösterir. Bunların yanında TNF-α, IL-1β, IL-6 gibi pekçok proinflamatuar sitokin miktarı LPS muamelesinden sonra artar (93-95). Birçok çalışmada inflamasyon ile ilişkili aterosiklorozis, ramotoit artrit, akciğer fibroz, gibi hastalıkların bu proinflamatuar sitokinlerin ve mediyatörlerin fazla ifadelenmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu nedenle, aktif makrofajlardan salınan inflamatuar sitokinlerin ve mediyatörlerin düzenlenmesi çeşitli inflamatuar hastalıkların tedavisi için önemlidir (96-98).

2.1.4. Polisakkaritlerin İnflamasyondaki Rolü

β yada α glukoz bağlar ile bağlı glukoz polimerleri olan glukanlar çok çeşitli ve biribirinden farklı polisakkarit üyeye sahiptir. Bu farklılık glukanların dallanma noktaları ve bağlanma pozisyonları ile moleküler ağırlıkları ve 3 boyutlu yapılarından kaynaklanmaktadır. Genellikle fungal hücre duvarının temel bileşeni olan glukanlar β 1-3 ve β 1-6 glukanlardan oluşur (16). Beta-glukan (β glukan), komplement reseptör 3, TRL 4 ve 7 gibi bağışık sistem reseptörlerine bağlanma kabiliyetine sahiptir. Bu özelliği ile β glukan, fonksiyonel fagositik hücreler olan granülosit, monosit, makrofaj ve dendritik hücrelerin fagositoz yeteneğini artırdığıdan dolayı güçlü bir immünostimülatör olarak tanımlanır (16,99,100). β glukan, enfeksiyonlara karşı konağın immün sistemini stimüle ederek, hümoral ve hücresel immüniteyi değiştirir. β glukan aracılığıyla NK, makrofaj, monosit ve nötrofillerin aktive olduğu, total lökosit sayısının arttığı, IL-1, TNF-α ve prostaglandin E2 üretiminin de uyarıldığı gösterilmiştiR. Bazı araştırıcılar, β glukanın proinflamatuar sitokin üretimini stimüle etmediğini, ancak nötrofil ve makrofajların mikrobisidal etkilerini artırdığını bildirmişlerdir. Beta-1-3 ve beta-1-6 glukanın koruyucu etkisini *T.gondii*'nin farklı suşlarıyla araştırıldığı bir çalışmada; RH

suşu ile enfekte edilen ve 1 mg/kg intramusküler (IM) veya intravenöz (IV) beta-1-3 glukan uygulanan farelerde sağkalımın (%100) kontrol grubuna göre (%33) yüksek düzeyde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca *T.gondii* prugniaud suşu kistleriyle enfekte edilen farelerde, 1 mg/kg (IM) beta-1-3 glukan ile tedavi sonrası beyin kistlerinin sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (99-102).

2.2. Makromantarların Genel Özellikleri

Mantarlar klorofil taşımayan, iletim dokusu bulunmadığından parazit veya saprofit beslenen, fruktifikasyon organları ve esas bünyeleri hiflerden ibaret, sporla üreyen, tek çekirdekli veya çok çekirdekli, haploid, dikaryotik veya diploid olabilen, tallus yapısı homokaryotik veya heterokaryotik özelliklere sahip ökaryotik canlı organizmalardır (103). Üremeleri eşeysiz (mitotik çekirdek bölünmesi) veya eşeyli (çekirdek birleşmesi ve mayoz) ya da paraseksüel (eşey organları ve mayoz olmaksızın genetik materyal aktarımı) olarak gerçekleşmektedir. Sporokarpları mikroskobik veya makroskobik olarak karakteristik özellikler göstermektedir (104).

Şapka, mantarların meyvesi veya fruktifikasyon organı olarak bilinir. Askomycetes sınıfında askokarp, Basidiyomycetes sınıfında basidiyokarp olarak isimlendirilir. Makromantarlar bulundukları ortama miselleriyle tutunur ve ortamdan su ve besin maddelerinin emilimini sağlayarak sap ve şapka gibi diğer vücut kısımlarına iletirler. Mantarlar Chytridiomycota, Oomycota, Zygomycota, Ascomycetes ve Basidiomycetes olmak üzere 5 bölümde incelenmektedir. Ascomycetes ve Basidiomycetes bölümleri makromantarları içerir. Mantar türlerinin yaklaşık % 2'sini bilinen yenen türler, % 4'ünü zehirli türler ve diğer %19'unu normal yenilebilir türler oluşturmaktadır. Mantar türlerinin kalan %75'ini oluşturan türler yenilmeye elverişli olmayan özelliklerinden dolayı yenilemeyen mantar olarak kabul edilmektedir (104).

Mantarlar geniş aralıktaki habitatlarda yetişebilmektedirler. Genellikle yağmurlu sezon boyunca toprakta, ölü odun parçaları üzerinde, gömülü veya açıktaki ağaç kökleri üzerinde görülmektedir (104). Türkiye, sahip olduğu flora ve iklim şartları sebebi ile doğal mantarlar yönünden oldukça zengindir. Ekolojik şartların uygun olması her mevsim görülen türlerin haricinde genellikle ilkbahar ve sonbahar aylarında ortaya çıkan bu mantarların zenginliğini arttırmaktadır (105).

Yapısının %90'nını suyun oluşturduğu mantarların kuru ağırlığının ise %10–40'nı protein, %2-8 yağ, %3-28 karbonhidratlar, %3-32 lif ve %8-10'nu ise tuzlar ve metaller

oluşturmaktadır (106,107). Mantarların tipik karbohidrat bileşenleri Kitin, Glikojen, Mannitol ve Trehalose moleküllerinden oluşmaktadır (5,107). Tıbbi mantarlar, yenebilir mantarlarla kıyaslandığında, karakteristik olarak daha fazla fungal hücre duvarı materyali ve ikincil metabolitler ihtiva ettikleri tespit edilmiştir. Fungal hücre duvarı başlıca β-glukan-kitin kompleksleri ve mannoproteinler içermektedirler (108). Mantarlarda bulunan ikincil metabolitler ise; fenolik bileşikler, steroller ve triterpenlerdir. Pek çok literatürde mantarlardaki antiinflamatuar ve immünomodulatör potansiyelin hücre duvarı bileşeni olan polisakkaritlerden ileri geldiği bildirilmiştir (109). Fungal polisakkaritler çoğunlukla; glukanlar, mannanlar ve galaktanlardır. Moleküler ağırlıkları ise 100000-1000000Da kadardır (110). Mantarların biyoaktive özellikleri içeriğindeki polisakkarit molekülünün suda çözülebilirliğine, molekülün büyüklüğüne, dallanma oranı ve dallanma formuna bağlıdır (107,109). Fungal polisakkaritler, β-glukan gruplarına bağlı olarak farklı kimyasal konformasyonlar sergilemektedirler. Örneğin, yapısal özellik olarak, glukanın temel yapısındaki β-(1,3) bağına ek olarak β-(1,6) dallanma noktasına da sahip olması daha iyi biyolojik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (107).

Çalışmamızı oluşturan mantar türlerinden olan *Tricholoma terreum* (Schaeff.) P. Kummer; *T. terreum,* Basidiomycetes sınıfının *Agaricales* ordosundan *Tricholomataceae* familyasına ait ektomikorizal bir mantar türüdür (111). Şapka; 4-7 cm genişliğinde ince gri pullarla kaplı, konveks, parlak koyu gri renkte, keçemsi tüylüdür. Sap 3-8 cm uzunluğunda 1,5 cm genişliğinde, beyaz, pürüzsüz, ipek görünümlüdür. Eti gri beyazımsı, ince ve kırılgandır. Lameller aralıklı, sarımsı-gri, çentiklidir. Spor izi beyaz, sporlar eliptik, ortalama 8-9/4-5 mikrondur. Hoş kokusu ve tadı ile iyi bir yemeklik mantar olarak kabul edilir (112). Kalkerli topraklarda kümeler halinde, eylül-ekim ve mayıs aylarında ortaya çıkan Kummer mantarı karaçam ile mikorizal bir ilişki yaşamamasına rağmen sık sık karaçam altında yetişir. Ülkemizde geniş bir makro floraya sahip olan mantar; Aydın, Balıkesir, Burdur, Çorum, Denizli, Gümüşhane, Hatay, Isparta, Karaman, Kilis, Konya, Mersin, Muğla, Nevşehir, Osmaniye, Trabzon, Tokat, Yalova, Bolu, Giresun, Sinop, İstanbul, Manisa, Eskişehir ve Bursa illeri civarında yetişmektedir (113). *T. terreum* her 100 g kuru ağırlıkta % 12,1 kül, % 20,1 ham protein, % 6,6 lipid, % 19,8 selüloz, % 31,1 karbohidrat ve % 30,1 lif ihtiva eder. Diterpenoidler, triterpenoidler, steroidler, fenolik monoterpenoidler ve meroterpenoidler, bazı indol türevleri Tricholoma türlerinden izole edilen maddelerdir

(114,115). *T. terreum* (Schaeff. Fr.) Kummer mantarı renksiz lamellerinden dolayı gri şövalye ya da kirli Tricholoma olarak bilinen yenilebilir bir mantar türüdür. Türkiye de halk arasında 'Karaoğlan', 'Karakiz', 'Karaca', 'Cincile' ve 'Mıhbaşı' olarak adlandırılmakta ve pazarlarda satılmaktadır. Mantar sadece iyi bir besin kaynağı değil aynı zamanda iyi bir enzim kaynağı olmasından dolayı önemli ekonomik potansiyele sahiptir (116). Ertunga ve ark.(116), *T. terreum*'un esteraz/lipaz aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Moleküllerin biyosentezi için enzim kullanımı hergeçen gün önemi artan bir konu haline gelmiştir. Lipaz ve esterazlar esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. "White matsutake"veya "Giant"olarak bilinen *Tricholama giganteum* doğada nadir bulunan yenilebilir mantar türüdür. Mau ve ark (117), bu türden antitümör aktivite gösteren polisakkarit türevi izole etmişlerdir. Benzer bir çalışmayı yapan Hatakeyama ve ark. (118), *T. matsutake* türünden antitümör ajanlar elde etmişlerdir. Yamaç ve Bilgili (119), *T.fracticum* ile yaptıkları çalışmada içeriğindeki ağır metallerin antimikrobiyal aktivitesini tespit etmişlerdir. Tricholoma türlerinin in vitro ortamda antikolinesteraz aktiviteleri Alzheimer hastalığının patojenezinde yer alan anahtar enzimler olan asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraza karşı test edilmiştir. *T. imbricatum* mantarının hekzan özütü asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerine karşı en iyi inhibisyon aktivitesi göstermiştir (0,2 mg/mL konsantrasyonda, sırasıyla %71,8±0,3 ve % 52,6±1,0) (114).

Terfezia claveryi Chatin; *T. claveryi,* Ascomycetes sınıfının *Pezizales* ordosundan *Pezizaceae* familyasına ait ektomikorizal bir mantar türüdür (120). Askokarplar 10 cm genişliğinde, küresel, basık veya armut şeklinde, loplu, kısa, zayıf bir sapa sahip, yüzeyi dışbükey, sarımsı-kırmızımsı kahverenginde, olgunlaştıkça siyahımsı kahverengini almaktadır. Peridyum oldukça kalın 0,8-1,2 mm, beyazımsı, kesildiğinde kahverengileşen, 8-12 µm uzunluğunda, yüzeye paralel filamentöz hiflerden meydana gelmektedir. Askosporlar, küresel şekilde, beyazımsısarımsıdan sarı renge kadar değişen renklerde, yaklaşık 2 µm yüksekliğinde, düzensiz, 16-23 µm genişliğindedir. Kokusu biberi anımsatmaktadır (103,120). Mikorizal bir türdür. Çoğunlukla güney Akdeniz vadilerinin Orta Doğunun çöl alanlarında, özellikle *Cistus* ve *Helianthemum aegyptiacum* olmak üzere *Helianthemum* türleriyle kaplı kumlu topraklarda bulunmaktadır. Ülkemizde Denizli, Elazığ, Urfa, Kastamonu, Konya, Aksaray, Diyarbakır, Karaman, Yozgat'ta yayılış gösterir (103,121). *T. claveryi* askorpları %

kuru ağırlıkta % l6 toplam protein, % 28 toplam karbohidrat, % 4 toplam ham lif ve % 2 toplam ham yağ içerir. *T. claveryi* mineral ve karbohidrat içeriği bakımından zengindir. İçeriğinde 9 suda çözünen ve 4 suda çözünmeyen yağ asiti ve 29 amino asit tespit edilmiştir. (122). Trüfler, yaygın olarak gıda maddesi olarak kullanılmalarının yanı sıra, halk arasında enfeksiyonlara karşı antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. Bazı Asya ülkelerinde göz enfeksiyonlarında tedavi edici ajan olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. İçeriklerindeki yüksek miktardaki vitamin A, C, ß-karoten gibi antioksidan madde ve fenolik bileşikler sayesinde yüzyıllardır iyileştirici preparat olarak kullanılmaktadır (123,124). *T. claveryi* mantarının oksidatif stresten kaynaklanan karaciğer hasarını önlemek için kullanılabilir olduğu Janakat ve ark (123) tarafından rapor edilmiştir. Bu mantarın su, metanol ve petrol eteri özütlerinin karaciğer koruyucu aktivitesinin referans bitki olan *Nigella sativa* çekirdeklerinin etkisi kadar güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise *T. claveryi'nin* sulu özütünün *S. aureus* ve *P. aeruginosa* patojenlerine karşı yüksek antibakteriyel aktivitesi bulunmuştur. *S. aureus'u* %66,4, *P. aeruginosa'yı* %40,9 inhibe ettiği Janakat et al. (125,126) tarafından rapor edilmiştir. Aldebasi et al. (127), korneal ülserli tavşanlarda *T. claveryi'nin* ham özütünün tedavi edici rolünü sentetik antimikrobiyal ajan olan Vigamox ile karşılaştırarak incelemişlerdir. 9 gün için *T. claveryi* uygulanan test grubunda korneal ülserde azalma tespit etmişlerdir. % 1,5' luk *T. claveryi* korneal ülseri önemli derecede azaltırken %3'lük *T. claveryi* iyileşme süresini uzatmıştır. %5'lik *T. claveryi* ise toksik etki göstermiştir.

R. roseolus, Basidiomycetes sınıfının *Boletales* ordosundan *Rhizopogonaceae* familyasına ait ektomikorizal bir mantar türüdür (128). Kireçli ve kumlu topraklarda yayılış gösteren *Rhizopogon roseolus* ülkemizde geniş bir floraya sahiptir. Afyon, Aydın, Bolu, Denizli, Erzurum, Hatay, Isparta, Karaman, Kilis, Konya, Mersin, Osmaniye, Sivas, Uşak, Yozgat illerinde yetişmektedir (128). Yenilebilir mikorizal bir mantar türü olan *R. roseolus* Japonya'da Shoro olarak bilinir. Japon yerel marketlerinde satılan değerli bir mantar türüdür (129). *R.roseolus* mantarının metanol özütünün *E. coli*, *Bacillus subtilis* ve *Enterobacter aerogenes* bakterilerine karşı etanol özütünün ise *Saccharomyces cerevisiae* mayasına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (128). Başka bir çalışmada ise bu mantarın sitokin aktivitesi gösteren N- [9-(B-D-ribofuranosyl-9H) purin-6-ylcarbamoyl]threonine (Ado-CO-thr) salgıladığı tespit edilmiştir (130).

L. leucothites, Basidiomycetes sınıfının *Agaricales* ordosundan *Agaricaceae* familyasına ait bir mantar türüdür (131). Şapka 5-8 cm genişliğinde, yüzeyi pürüzsüz ve ipeksi dışbükey, beyazımsı, ten rengi veya olgunlaştıkça soluk ten rengi ve soluk hardal rengini almaktadır. 60–80 x 8–20 mm uzunluğunda ve dar saplara sahip, kalın ve beyaz etli bir mantar türüdür. Ayırt edici bir tat ve kokuya sahip değildir. Bahçe ve yol kenarlarında sonbahar mevsiminde yayılış gösterir. Nadir bulunan yenilebilir bir mantardır (131). Ülkemizde Adıyaman, Afyon, Ankara, Artvin, Aydın, Erzincan, Gaziantep, Giresun, Hatay, Kahramanmaraş, Karaman, Mersin, Muş, Siirt, Şırnak, Urfa, Uşak illerinde yetişmektedir. *L. leucothites* 100 g kuru ağırlıkta % 26,46 kül, % 20,51 protein, % 1,1 yağ, % 16,54 toplam şeker, % 51,93 karbohidrat, % 13,33 mannitol, % 3,21 trehaloz her 100 g kuru ağırlıkta 8,87 mg askorbik asit ve 0,4 mg β-karoten ihtiva eder (132). *L. leucothites* etanol özütünün gıda bozulmalarına sebep olan bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesinin de gösterildiği bu çalışmada 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radikal süpürücü etkisi 10 mg/mL konsantrasyondaki örnekte %71, metal şelatlama etkisi ise 15 mg/mL konsantrasyonda %82 olarak bulunmuştur (133).

2.3. Makromantarların Farmakolojik Potansiyelleri

Mantarların ilaç olarak kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Doğu Asya ülkelerinde yenilebilir mantarlar, besin olarak kullanımlarının yanı sıra toksik etkisi olmayan tıbbi özelliklerinden dolayı da Asyalıların araştırma konusu olmuştur. Uzak doğu ülkelerinde yapılan bu araştırmalar pek çok mantar türünün antiinflamatuar, bağışıklık sistemi baskılayıcı ajanlar, antikarsinojenik ve antimikrobiyal gibi çeşitli iyileştirici aktiviteleri olduğunu göstermektedir. Mantarların tıbbi kullanımı Asya ülkelerinde eski bir gelenek olmasına rağmen Batı ülkelerinde son yıllarda önem kazanmıştır. *Ganoderma lucidum* dünyanın en ünlü tıbbi mantarıdır. Çin'de 2000 yıl önce keşfedilmiş ve 1973'den beri kültüre alınarak klinik uygulamalarda şurup, iğne ve tablet olarak ve zehirli mantarlara karşı panzehir olarak kullanılmaktadır (134). Anti-kolesterolemik etkisi bilinen bu mantarın antitümör, antiinflamatuar, antiplatelet agregasyon (trombosit kümelenmesini engelleyici) gibi pek çok faydalı özelliği de bildirilmiştir. Tüm Dünyada sağlık sıvısı olarak bilinen *G. lucidum*, günlük diyetlere eklenerek kullanılmaktadır. Milyonlarca insan her gün enerjilerini artırmak, hazımlarını kolaylaştırmak ve rahat bir uyku için bu mantarı kullanmaktadırlar. Kardiyovasküler sistem hastalıklarında ve immün sistemin

dengelenmesi ve güçlendirilmesi ile bu hastalıklardan korunmada *G. lucidum* kullanılır (114).

Mantarlardan izole edilen lektin, polisakkaritler, polisakkarit-peptitler, polisakkarit-protein komplekslerinin, lanosten triterpenoidlerinin, fenolik ve flavonoit yapıların immunomodulatör, antiinflamatuar, antikanser, antitümör, antioksidan, antiviral, antifungal ve antimikrobiyal etkileri tespit edilmiştir (135).

Mantarların temel bileşenlerinden birisi polisakkaritlerdir. Şeker polimerleri olan polisakkaritler glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanmışlardır. Bazen birçok karbon atomu arasında kovalent bağlar oluştuğundan çok kompleks moleküllerdir. Sonuç olarak bir şeker birimi ikiden fazla şekerle birleştiğinden çok dallı büyük makromoleküller oluşur. Polisakkaritler yapısal çeşitlilik gösteren ve biyolojik bilgi taşımak için yüksek kapasiteye sahip makromoleküllerdir. Polisakkaritlerin bu yapısal çeşitliliği yüksek organizmalarda çeşitli hücre-hücre etkileşimlerinin düzenleyici mekanizmasının esnekliğini sağlar. Fungal polisakkaritler daha çok beta glukanları içeren hetero-β-glukanlar, heteroglukanlar, α-manno-β-glukanlı farklı kimyasal bileşenleri içerirler. Bunların bazıları β (1-3), (1-6) ve α-(1-3) glikozidik bağlarla bağlanmış polimerlerdir. Daha çok ana zincir, β (1-3), β (1-4) yan zincirlerinden ya da β (1-3), β (1-4)'e β (1-6) yan zinciri ile bağlanan karışık polimerlerden oluşur (136). Glukanların tamamı özellikle β- glukanlar antitümör, antikanser ve immunomodulatör aktivite gösteren en önemli polisakkaritlerdir. α-(1→3)-glukan *Armillariella tabescens* mantarından, Lineer α-(1→3)-glukan *Amanita muscaria* ve *Agrocybe aegerita* mantarlarından, α-(1→4)-; β-(1→6)-glukan, β-(1→6)-; α-(1→ 3)-glukan ve α-(1→6)-; α-(1→4)- glukan *Agaricus blazei* mantarından, β-(1→6)-glukan *Lyophyllum decastes* ve *Armillariella tabescens* mantarlarından, β-(1→6)-; β-(1→3)-glukan *Agaricus blazei* ve *G. frondosa* mantarlarından, β-(1→3)-glukuronoglukan *G. lucidum* mantarından, mannoksiloglukan *G. frondosa* mantarından, galaktooksiloglukan *Hericium erinaceus* mantarından, ksiloglukan *G. frondosa, Polyporus confluens* ve *Pleurotus pulmonarius* mantarlarından, ksilogalaktoglukan *Inonotus obliquus* mantarından, mannogalaktoglukan *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus cornucopiae, Agaricus blazei* ve *G. lucidum* mantarlarından, galaktomannoglukan *Flammulina velutipes*, *Hohenbuehelia serotina*, *Leucopaxillus giganteus* mantarlarından, arabinoglukan *G. tsugae*, Riboglukan *A. blazei*, glikan ve arabinogalaktan *P. citrinopileatus,* glukogalaktan *G. tsugae,*

fukogalaktan *Sarcodon aspratus,* α-(1→6)-mannofucogalaktan *Fomitella fraxinea*, fukomannogalaktan *Dictyophora indusiata*, mannogalaktan *Pleurotus pulmonarius*, mannogalaktofukan *G. frondosa*, ksilan *Hericium erinaceus*, glukoksilan *Hericium erinaceus* ve *Pleurotus pulmonarius*, mannoglukoksilan *H. erinaceus*, α-(1→3)-mannan *Dictyophora indusiata,* glukomannan ve β-(1→2)-; β-(1→3)-glukomannan *Agaricus blazei*, galaktoglukomannan *Lentinus edodes* ve α-D-glukan *Cordyceps sinensis* mantarlarından izole edilen antitümör ve immunostimülatör aktivite gösteren glukanlardır (137,138).

Mantarlardaki biyoaktiviteden sorumlu diğer bileşik sınıfı triterpenoitlerdir. Triterpenoitlerin immun düzenleyici ve antitümör etkileri biyokimyasal ve medikal alanlarda her geçen gün daha çok ilgi görmektedir (139). Mantar metabolitleri arasında yaygın olarak bulunan triterpenoitler farklı karbon yapısına sahip sekiz sınıfla gruplandırılır. Bunlar; skualen, lanostan, ergostan triterponoitleri (antsinler, metil antsinatlar, kamforatinler), fernan, friedelan, lupin, malabarikan, kukurbitan terpenoitleri ile ganoderik asitler, ganoderenik asitler, ganodermik asitler, applanoksidik asitler, ganoderoller, ganoderaller, lusidon, ganondiol terpenoidleridir. Bu bileşikler antioksidan, antitümör, antikanser, sitotoksik, antiinfektif, antikolinerjik, antiserotenerjik ve immunomodülate edici gibi birçok tıbbi aktiviteye sahiptir (140, 141). Tablo 2.1 'de bazı makrofungal polisakkaritlerin biyoaktiviteleri özetlenmiştir (142).

P. linteus'a ait bazı ikincil metabolitler; lektinler, triterpenler meshimakobnol A ve B, hispidin, davallialakton, metildavallialactone, hipholomin B, interfungins A, radikal süpürücü aktivitesi olan iNOScavin A, protokatekhuik asit, protokatekhualdihit, fenolik bileşik olan kafeik asit, antikanser aktivitesi olan ellagik asit ve phellifuropyranone A, phelligridin G ve phelligridimer A önceki çalışmalarda bildirilmiştir (139).

Ergostan, tetrasiklik triterpenoitlerinin bir sınıfıdır ve yaygın olarak mantarlarda ikincil metabolit olarak bulunur. Mantarlardan elde edilen bu triterpenoit türevinin yaygın terapotik kullanımı mevcuttur. Ergotamine damar büzücü etkisinden dolayı doğum sonrası kanamaları kontrol için ve auralı ve aurasız migren tedavisinde kullanılır. Ergokornin döllenmiş yumurtanın uterus duvarına yapışmasını önlediğinden bir doğum kontrol etkenidir. Ergonovinin düz kasları uyarıcı, ergotoksinin kan damarlarını

genişletici etkisi vardır (84). *Antrodia camphorata* tıbbi mantarının temel bileşeni olan ergostan, Tayvan'da kanser tedavilerinde ve karaciğeri korumada kullanılır (143).

Brezilya yağmur ormanlarında, yenilebilir Basidiomycetes mantarlarından olan *Agaricus blazei* Murill (AbM), a.k.a. *Agaricus subrufescens* Peck ve *Agaricus brasiliensis* Wasser antikanser ve çeşitli hastalıklara karşı geleneksel tıp tedavilerinde kullanılır. *Agaricus bisporus* mantarının bağışıklık düzenleyici maddeler olan yüksek oranda dallanmış β- 1,3-/1,6 glukanları ve proteoglikanları ihtiva ettiği rapor edilmiştir. *A. bisporus'un* lösemi hücrelerinde apoptozu uyaran ve tümör indüklü anjiyogenezi baskılayan agaritin ve ergosterol (provitamin D2) içerdiği bildirilmiştir (144).

Tablo 2.1. Fungal polisakkaritlerin biyoaktivitesi (142)

Mantar türleri	Polisakkarit ürünü	Biyoaktif etki
Pleurotus tuber-regium	β-D-glukan	Hepatoprotektif, anti-meme kanseri
Ganoderma lucidum	Heteroglikan, mannoglukan, glikopeptit	Hiperglisemi, immün düzenleyici antitumor, antioksidan
Auricularia auricula	Glukan	Hiperglisemi, immün düzenleyici, antitumor, antiinflamatuar
Schizophyllum commune	Glukan, schizophyllan	Antitumor
Hericum erinaceus	Heteroglikan, Heteroglikanpeptit	Hiperglisemi, immün düzenleyici, antitumor
Sclerotinia sclerotiorum	Glukan, skleroglukan (SSG)	Antitumor
Lentinus edodes	Mannoglukan, poliskkarit-protein kompleksi, glukan, lentinan	İmmün düzenleyici, antitumor, antiviral
Polystictus versicolar	Heteroglikan, glikopeptit, krestin	İmmün düzenleyici, antitumor, hiperglisemi, antiinflamatuar
Grifola frondosa	Proteoglikan, glukan, galaktomannan, Heteroglikan, grifolan	İmmün düzenleyici, antitumor, antiviral, hepatoprotektif
Inonotus obliquus	Glukan	Antitumor, immün düzenleyici
Agaricus blazei	Glukan,Heteroglikan, glukanprotein,Glukomannan-protein kompleks	Antitumor
Flammulina velutipes	Glukan-protein komplex, glikoprotein	Antitumor, antinflamatuar, antiviral, immün düzenleyici
Ganoderma applanatum	Glukan	Antitumor
	Glukan	Antitumor, immün düzenleyici

Tablo 2.1. Fungal polisakkaritlerin biyoaktivitesi (Devamı)

Polypours umbellatus		
Clitopilus caespitosus	Glukan	Antitumor
Pleurotus citrinopileatus	Galaktomannan	Antitumor
Trametes robiniophila	Proteoglikan	İmmün düzenleyici, hepatoprotektif, antikanser
Tremella fuciformis	Heteroglikan	Hiperlipidemi, hiperglisemi, immün düzenleyici, antitumor
Tremella aurantialba	Heteroglikan	Hiperglisemi, immün düzenleyici
Pleurotus ostreatus	Glikoprotein	Antitumor, hiperglisemi, antioksidan
Morchella esculenta	Heteroglikan	Hiperglisemi, antitumor
Omphalia lapidescens	Glukan	Antiinflamatuar, immün düzenleyici
Phellinus linteus	Glukan	Antitumor
Armillariella tabescens	Heteroglikan	Antitumor
Dictyophora indusiata	Heteroglikan, mannan, glukan	Antitumor, hiperlipidemi
Peziza vericulosa	Proteoglikan, glukan	İmmün düzenleyici antitumor
Tricholoma mongolium	Glukan	Antitumor
Cordyceps sp	Glukan, Heteroglikan	Antitumor, hiperglisemi, immün düzenleyici

2.3.1. Antibakteriyel ve Antifungal Mantarlar

Mantarlar doğal ortamda yaşayabilmek için antibakteriyel ve antifungal bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden birçok mantar türünün az veya çok antimikrobiyal aktiviteye sahip olması şaşırtıcı değildir. Avrupa Ganoderma türlerinden olan *G. pfeifferi* Bres. ve bu türden izole edilen ganomisinlerin *S. aureus* gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (145).

Alves et.al. (146), *P. linteus* mantarının *B. cereus* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesini bildirmişlerdir.

G. annulare (Fr.) Gilbn. izole edilen Applanoksidik asit A, *Trichophyton mentagrophytes*'a karşı zayıf antifungal aktivite göstermiştir (147). *G. applanatum* (Pers.) Pat. türünden izole edilen steroidlerden 5α-ergosta-7,22-dien-3β-ol ve 5,8-epidioxy-5α,8α-ergosta-6,22-dien-3β-ol, gram pozitif ve gram negatif mikrooganizmlara karşı antimikrobiyal aktive gösterdiği tespit edilmiştir (148).

Lentinula edodes (Berk.) Pegler mantarından elde edilen ve antimikrobiyal ajan olan oksalik asitin *S. aureus* gelişimini inhibe ettiği ve *L. edodes* mantarının etanolik özütünün *Paramecium caudatum*'a karşı antiprotozoal aktivitesi ortaya konmuştur (149).

Clitocybe sinopica mantarından izole edilen proteinin *Agrobacterium rhizogenes, A. tumefaciens, A. vitis, Xanthomonas oryzae* ve *X. malvacearum* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir (150).

Yapılan bir diğer çalışmada disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre *Melanoleuca exscissa* mantarı, *E. coli* bakterisine karşı 22 mm inhibisyon zonu oluşturarak, referans antibiyotik olan meropenem (23 mm) ile neredeyse aynı etkiyi göstermiştir (151).

2.3.2. Antiviral Mantarlar

Bakteriyel bulaşıcı hastalıkların aksine viral hastalıklar ortak antibiyotikler ile tedavi edilemez. Virüse özgü özel ilaçlara ihtiyaç vardır. Mantarların, viral enzimleri, viral nükleik asit sentezini ve virüslerin memeli hücre içine alınımını veya adsorpsiyonunu doğrudan inhibe edebilme kabiliyetleri vardır. Bu doğrudan antiviral etki küçük moleküller tarafından sağlanır. Dolaylı antiviral etkileri ise bağışıklığı uyarıcı aktiviteye sahip polisakkaritler veya diğer kompleks moleküller ile gerçekleşir.

G. lucidum (M. A. Curtis: Fr.) P. Karst. mantarından elde edilen bazı triterpenler (ganoderiol F, ganodermanontriol, ganoderik asit B) insan bağışıklık yetersizliği virüsü tip 1 (HIV-1)'e karşı antiviral ajan olarak aktivite gösterir. Ganoderiol F ve ganodermanontriol'un minimum konsantrasyonu MT-4 hücrelerinde HIV-1 kaynaklı sitopatik etkiyi inhibe etmiştir (152).

2.3.3. Antitümör ve İmmünomodülatör Mantarlar

Asya ve Doğu Avrupa ülkelerinde kanserin önlenmesi ve tedavisinde mantarlar önemli rol oynarlar. 'iceman' olarak bilinen *Piptoporus betulinus,* rektal kanser ve mide hastalıklarında kullanılan bir mantardır (33).

I. obliquus mantarının çeşitli özütlerinden antitümör, antihiperglisemik ve antilipidperoksidatif etkisi olduğu bilinen maddeler izole edilmiş ve tümör hücrelerinde ve hayvan çalışmalarında bu etkisi ispatlanmıştır (153,154).

Yenilebilir ve tıbbi mantarlar doğal antioksidanların geliştirilmesinde önemli bir kaynaktır. Geleneksel Çin tıbbında iyi bilinen ve değerli olan *Cordyceps*, canlılık ve uzun ömür için tonik olarak ve çeşitli hastalıklara direnç kazanmada bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Özellikle 'CaoMuWang' olarak bilinen *C. jiangxiensis* mantarının farmakolojik aktiviteleri dikkat çekicidir. Bu mantarın kloroform özütü mitoz yoluyla tümör hücrelerinin çoğalmasını ve kaspazlara bağlı apoptotik yolağı önemli ölçüde inhibe edici özellik göstermiştir (155). Son çalışmalarda, *C. jiangxiensis* kültüründen antitümör sitotoksik bileşikler ve diğer aktif metabolitler izole edilmiştir (156).

Lentinula edodes; Japonya'da Shiitake, Çin'de Xiangu ve Fransa'da da Lentin adları ile bilinmektedir. *L. edodes'* in misellerinden ve şapkasından elde edilebilen ve çeşitli ektraksiyon işlemleri ile saflaştırılabilen lentinan, lenthionine ve eritadenine gibi kompleks organik bileşikler serbest radikalleri uzaklaştırmadaki antioksidan özeliğinden dolayı, insan beslenmesinde ilave gıda olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (157).

Bir makromantar türü olan *Trametes versicolor'ın* sahip olduğu ligninolitik enzimler çevre biyoteknolojisi başta olmak üzere biyoteknolojide çok geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu mantarın çok değerli tıbbi bileşikleri vardır. Taşıdığı en önemli bileşik Kristin (crystin (PSC)) adıyla bilinmektedir. PSC proteinlere bağlı polisakkarit demektir. Bu bileşik AIDS dahil bir çok virüsün gelişimini baskılar.

Kanserlerin çoğunda olumlu etki yaptığı da bilinmektedir. Özellikle gastrointestinal kanserlerde Japonya'da ilaç olarak kullanılmaktadır (158).

Japonya ve Çin'de adjuvan tümör tedavisinde (immunotereapi), ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi gibi büyük kanser tedavilerinin yanında *L. edodes*'ten elde edilen Lentinan, *S. commune*'den elde edilen şizofilan (schizophyllan), *T. versicolor*'dan elde edilen krestinin klinik uygulamalarda kullanıldığı rapor edilmiştir (137).

P. ostreatus mantarının hücre içi ve hücre dışı polisakkaritlerinin etkileri insan karsinom hücreleri üzerine inhibe edici özelliği araştırıldığında hücre içi polisakkaritlerin %10-35; hücre dışı polisakkaritlerin ise %15-60 oranında aktivite gösterdiği bulunmuştur. Dört farklı hücre hattından en çok etkilenen insan karsinom hücre hatları sırasıyla RL95 (% 60) > SW480 (%35) > HCT15 (%15) > HCT116 (%10) olmuştur (159). Bir başka çalışmada ise *P. ostreatus* sulu özütünün HT-29 kolon kanser hücrelerinin çoğalmasınuı engelleyici ve proapoptotik etkisi tespit edilmiştir (160).

P. abalonus mantarının MCF-7 ve $HepG_2$ hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi ve HIV-1 revers transkriptaz enzimini inhibe edici özelliği incelenmiş ve sonuç olarak 5 μM konsantrasyonda MCF-7 ve $HepG_2$ hücrelerinin çoğalmalarını % 65,2 ve % 34,7 oranında engellemiştir. HIV-1 revers transkriptaz enzimini 2 μM konsantrasyonda % 60,5 oranında inhibe etmiştir (161).

Kemoterapi tedavisinin yanında lentinanın parenteral uygulamaları mide kanseri, kolon kanseri ve diğer karsinomalı hastalarda sadece kemoterapi alan hastalara kıyasla yaşam süresinin uzamasına ve kalitesinin artmasına neden olmuştur (162).

Hypsizigus marmoreus mantarından elde edilen ham polisakkaritin *in vitro* şartlarda insan gastrik kanser hücre hattı SGC-7901'e karşı güçlü bir inhibitör aktivite gösterdiği literatürde bildirilmiştir (163).

Sclerotium glucanicum veya *S. rolfsii* misellerinden salgılanan diğer bir hücre dışı glukan olan skleroglukan, viskozite arttırıcı olarak kullanılır. Ayrıca antitumör ve antiviral aktiviteyede sahiptir (164).

Onkogenezi önleyen fungal polisakkaritler çeşitli sinerjetik tümörlere karşı antitumör aktivite gösterir ve tümör metastazını önler. Kemoterapi tedavisi ile birlikte kullanıldığında yararlı etkinlikleri artar. Polisakaritlerin antitümör etkisi sağlam bir T hücresi bileşeni gerektirir. Bunların aktivitesi bir timus bağımlı bağışıklık mekanizması

yoluyla gerçekleşir. Polisakkaritler sitotoksik makrofajları, monositleri, nötrofilleri, doğal katil hücreleri, dendritik hücreleri ve sitokinler, gibi kimyasal habercileri aktive ederler. Aynı zamanda fungal polisakkaritler çeşitli immunomodulatör sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin gen ifadelenmesini uyarıcı multisitokin indükleyicileri olarak kabul edilirler (165).

Yenilebilir bir mantar olan *P. ostreatus*'un sulu ve metanolik özütlerinden izole edilen glukanlar prostat kanserinde apoptozu indükler, meme ve kolon kanserinde çoğalmayı baskılar (166). Ayrıca *P. tuber-regium* türü ile yapılan bir çalışmada bu mantarın meyvelerinden izole edilen β-glukanlar çeşitli kanser hücrelerinde antiproliferatif etki göstermiştir (167).

Bir mantar metaboliti olan D- fraksiyon, önemli immunomodulatör olarak görev yapar. Maitake (*G. frondosa*) mantarından elde edilen D-fraksiyon, TNF-α sentezinin uyarılmasıyla NK (doğal öldürücü hücreler) inhibe ederek kanser hastalarında tümör büyümesini baskılar (150). Tablo 2.2'de mantarlardan elde edilen en önemli immunomodulatörler özetlenmiştir (11).

Güneydoğu Asya ve Çin'de göğüs kanseri tedavisinde kullanılan *Lignosus rhinocerus* mantarının soğuk su özütünün çeşitli kanser hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak bu özütün insan meme karsinom (MCF-7) ve insan akciğer karsinom (A549) hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (150).

M. esculenta (L) Pers**.** mantarının akut ve kronik inflamasyonu azalttığı literatürde rapor edilmiştir. İnhibisyon aktivitesi standart referans ilaç olan Diclofenac ile karşılaştırılmıştır. Antitümör aktivitesi farelerde oluşturulan katı tümör indüklü DLA hücre hattı ve ascites tümör indüklü EAC hücre hattında tespit edilmiştir. Özüt hem ascites hemde katı tümör hücrelerine karşı önemli bir antitümör aktivite göstermiştir. (168).

Amanita virosa mantarından yüksek derecede toksik proteinler olan hemolitik lektin ve toksovirin elde edilmiş ve bunların memeli lösemi hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. *A. virosa* lektini, kırmızı kan hücrelerine karşı yüksek hemolitik aktivite göstermesinden dolayı memeli lösemi hücrelerine ve insan T hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip yeni bir lektin keşfedilmiştir (169).

Tablo 2. 2. Mantarlardan elde edilen en önemli immunomodulatör ilaçlar (11)

Mantar Türleri	İmmünomodulatör	İmmünomodulatör yapısı
A. brasiliensis	Flo-a-β	(1→6)-β-D-glukan, heteropolisakkaritler, polisakkarit-protein kompleksi
C. volvatus	FA-2-b-Md	RNA-protein kompleksi
	H-3-B	(1→3)-β-D-glukanlar
F. velutipes	Flammulin	Protein
G. lucidum	GLP(AI), Ganopoli,	β-D-glukanlar, heteropolisakkaritler
	Ganoderan	Glikoproteinler
G. frondosa	MD- fraksiyon	(1→6)-β-D-glukanlar + (1→3)-β-D-yan zincirleri
	Grifolan	(1→3)-β-D-glukanlar + (1→6)-β-D-yan zincirleri
L. edodes	Lentinan, KS-2	(1→3)-β-D-glukanlar + (1→6)-β-D-glukosil
	LEM	Lignin-polisakkarit kompleksi
S. commune	Şizofillan Sonifilan, SPG	(1→3)-β-D-glukanlar + (1→6)-β-D-glukosil
T. versicolar	Krestin (PSK), PSP	Heteroglukan
T. fuciformis	Tremellastin	Glukuronoksilomannan

Değerli bir makromantar türü olan *A. auricula*, Çin'de besin ve ilaç olarak kullanılır. Antitümör, antiinflamatuar, antikoagülan, hipokolesterolemik, hipoglisemik ve iyileştirme gibi immunomodulasyon aktivitesi son yıllardaki çalışmalarda rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak, bu mantarın etanolik özütünün antioksidan ve nitrik oksit sintaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. *A. auricula* mantarına ait polisakkaritin (AAP-I) yüksek yağlı diyet ile uyarılan hiperlipidemili farelerde önemli derecede toplam kolesterol, trigliserit ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir (170-172).

2.3.4. Antiinflamatuar Mantarlar

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, inflamasyonun çeşitli insan hastalıklarının (inflamatuar bağırsak hastalığı (IBD), kronik astım, romatoid artrit, multipl skleroz,

sedef hastalığı gibi) gelişimine yol açan önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. İnflamasyonun baskılanması bu hastalıkların kontrolünde ve önlenmesinde önemli bir etkendir. Kronik inflamasyon ise ateroskleroz, obezite, metabolik sendrom, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser tiplerinin patojenezinde rol oynar (173). Mantarlardan elde edilen bazı polisakkaritler veya polisakkarit-protein kompleksleri spesifik olmayan bağışıklık sistemini uyarıcı ve konağın savunma sisteminin uyarılması ile tümör inhibe edici etki gösterir. İlaçlar makrofajları, T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreleri TNF-α, IFN-γ, IL-1β gibi sitokinleri salgılamaları için aktive eder. Bu sitokinler antiproliferatifi ve tümör hücrelerinde apoptozu ve farklılaşmayı uyarır. Tablo 2.3'de mantarlardan elde edilen immunomodulatörlerin sitokinler üzerindeki etkisi özetlenmiştir (174).

Tablo 2.3. Mantar ürünlerinin immunomodulatör aktiviteleri (174).

Mantar Türleri	**Ürün**	**İmmun Etki**
G. frondosa	D-fraksiyon	
L. lepideus	PG101	↑ TNF-α , IL-1β, IL-10, IL-12, GM-CSF, IL-18
	Sulu misel özütü ve meyvesi	↑ TNF-α
A. blazei	Fraksiyonlar B-4 ve B-5	↑ TNF-α , IL-8, NO
G lucidum	Polisakkarit	↑ IL-1β , TNF-α, IL-6
G frondosa	GRN	↑ IL-1, IL-6, TNF-α
	MD-fraksiyon	↑ iNOS
M. esculenta	Galaktomannan	↑ makrofaj aktivitesi ↑ NO
P. linteus	PL	↓ IL-2, IFN-γ ve TNF-α'nın splenositlerde üretimi ↓ LPS ile muamele edilen farelerde aktif makrofaj ve lenfositlerin apoptozu
C. pruiNOSa	Metanol özütü	IL-1β, TNF-α , NO, PGE_2 baskılanması
S. aspratus	Fukogalactan	↑ TNF-α, NO
A. cylindracea	Ubikuitin	↑ NO
T. mongolicum	Lektinler (TML-1,TML-2)	↑ TNF-α, Nitrit iyonları

L. edodes' in suyla özüt edilebilen bazı bileşenlerinin antimutajenik etkiye sahip olmasından dolayı, fareler üzerinde yapılan deneyler ile DNA'da hasara neden olan mutajenik etkiye karşı koruyucu özelik sağladığı ortaya konulmuştur (175).

Antrodia camphorata (A. camphorata) mantarının fermente kültürünün oksidatif enzimler olan siklooksijenaz 2 (COX-2) ve İNOS üzerinde inhibe edici özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada bu proteinlerin ifadelenmesini bloke ettiği tespit edilmiştir. (176).

Çalışmalar *G. lucidum* özütlerinin serebral iskemi sonrası nöronal kaybı önlediğini göstermektedir. Ancak bu özütlerin dopaminerjik nöron tahribatına karşı koruyucu ve endojen veya ekzojen uyarılara karşı mikrogilial hücrelerin inflamatuar cevabını hafifletici bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. *G. lucidum* özütlerinin LPS ile inflamasyon oluşturulan mikroglia hücrelerinde önemli derecede proinflamatuar sitotoksik faktörleri (nitrik oksit, tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin 1β (IL-1β)) azalttığı bildirilmiştir. (177).

IBD, dünya çapında insanları etkileyen temel sağlık problemlerinden biridir. IBD, birçok Batı ülkesinde her bin kişiden birini etkiler. Bazı doğal ürünler IBD 'nin proinflamasyonunu baskılayarak kontrol altına alınmasını sağlar. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda doğal ürünlerin anti-IBD etkisi proinflamatuar sitokinlerin, hücre içi adhezyon moleküllerinin, proinflamatuar sinyalcilerin (NO, iNOS, siklooksijenaz 2 (COX-2) ve NF-κB gibi), reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve antioksidan aktivitesinin inhibisyonu ile sağlanır. *Coriolus versicolor*'ın ethanol özütü anti-IBD etki gösterir. Erkek BALb/c farelerinin içme suyuna dekstran sülfat sodyum (DSS) katılarak kolit indüklenmiştir. *Coriolus versicolor* özütü ile tedavi proinflamatuar sitokinlerden TNF-α, IL-1β ve IL-6 üretimini ve transkripsiyon aktivatörlerinden STAT-1 ve STAT-6 moleküllerinin ifadelenmesini önemli miktarlarda azaltmıştır. DSS + *C. versicolor* serumunda sadece DSS uygulanan farelere kıyasla yüksek miktarda immunoglobulin IgA ve düşük miktarda IgE saptanmıştır (178).

C. sinensis türünün sulu özütü mezenterik lenf düğümü (MLN) lenfositlerinin bağışıklık fonksiyonunu değerlendirmek için C57Bl/6N farelerine uygulanmıştır. Sonuçlar, *C. sinensis* uygulanan farelerde kontrol grubuna kıyasla MLN lenfositlerinde ve IgE konsantrasyonlarında önemli düşüş olduğunu göstermiştir. Bu özütler MLN lenfositlerinde CD4(+) ve CD8(+) T hücrelerinin oranlarını artırmıştır. *C. militaris* ile yapılan farklı araştırmalar BALB/c farelerinde DSS indüklü akut koliti ve kilo kaybı, ishal ve brüt kanama gibi hastalık semptomlarını önlemiştir. Özütler kolon kısalmasını ve epitel hücrelerin zarar görmesini engellemiştir (179, 180).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Araştırmada kullanılan Makrofunguslar ve Temini

Bu araştırmada kullanılacak makrofungus örnekleri Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hakan Allı tarafından temin edilmiştir. Yrd. Doç. Dr. Hakan ALLI'nın yürütücüsü olduğu 110R019 No'lu TUBİTAK projesinde toplanmış ve ön teşhisi yapılmış olan *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus* ve *L. leucothites* makromantar örnekleri kullanılmıştır. Arazi çalışması yapılan yerler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Arazi çalışması yapılan lokaliteler.

Makrofungus örnekleri	**Arazi çalışması yapılan lokaliteler**
Tricholoma terreum	Muğla-Merkez-Kötekli Köyü
Terfezia claveryi	Kastamonu-Tosya-Akseki Köyü
Rhizopogon roseolus	Kütahya-Simav-Aksaz Köyü
Leucoagaricus leucothites	Muğla-Merkez-Kötekli Köyü

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Hücreler

Bu çalışmada kullanılan fare mikroglial hücresi BV-2 hücre hattı Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. BV-2 hücreleri için %10'luk Dulbecco's Modified Eagle Solusyonu (DMEM), inaktif fetal bovin serum ve

antibiyotik karışımı içeren besiyeri yanında L-glutamin kullanılmıştır. Çalışmada hazır olarak inaktive serumlar uygulanmıştır. Ayrıca, mL'sinde 10.000 unite penisilin, 10.000 µg streptomisin içeren antibiyotik 100X karışımı steril su ile seyreltilerek (1X) kullanılmıştır. Uygulamalardan önce besiyeri 0,22 µm çapında steril filtreden geçirilmiştir.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Cell counter	Innovatis Cedex XS
CO_2 inkübatör	Sanyo ve New Brunswick Galaxy 170R
Çalkalamalı inkübatör	Innova 42
Çalkalayıcı	IKA KS 130 Basic
Dansitometre	Biosan Den 1
Elisa	Biotek Synergy HT
HPLC	Agilent Technologies 1100
Isıtıcı	Bioer
Mikroskop	Nikon Eclipse TS 100
Nanodrop	Denovix
Pastör fırını	Ecocell
pH metre	WTW 720
Real-Time PCR	Roche
Santrifüj	Nüve ve Mikro 200R
Spin	Multispin MSC 6000
Steril kabin	Safe Fast Classic
Thermocycler	Bio-rad T100
Ultrasonik Banyo	Elmasonic X-TRA
Ultrasonikatör	Bandelin Sonoplus
UV spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Western Blot sistemi	Bio-rad

3.1.4. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·), 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, Akrilamid, Alüminyum klorid hekzahidrat ($AlCl_3.6H_2O$), Amonyum persülfat, Amonyum tiyosiyanat (NH_4SCN), Goat Anti rabbit IgG, Apigenin, Bisakrilamid, Bovine Serum Albumin, Bakır Sülfat ($CuSO_4.5H_2O$), D-(-)-fruktoz, D-(+)-glukoz, D-(+)-sukroz, Demir 2 klorür ($FeCl_2$), Fenol (C_6H_6O), Gallik asit, Glukuronik asit, İzopropanol, Kateşin, Maltoz-1-hidrat, $Na_2C_4H_4O_6.2H_2O$, $Na_2CO_3.H_2O$, Potasyum fosfat (K_3PO_4), Potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$), RNAzol, Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$), Sodyum nitrit ($NaNO_2$), Sodyum potasyum Tartarat, Sülfürik asit (H_2SO_4), TEMED, Trikloroasetik asit (TCA), Tris, Troloks ($C_{14}H_{18}O_4$),Tween 20 Sigma, Aseton (C_3H_6O), Asetonitril (C_2H_3N), Dietil eter, Etanol, Folin-Ciocalteu reaktifi, Kloroform, n-Butanol, Nutrient Broth/Agar, Sodyum Hidroksit (NaOH) Merck, ERK½, p38, p-ERK½, p-p38 Cell Signaling, Cox-2, İnos, LightCycler® 1536 DNA Probes Master, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, β-aktin Roche, IL-6 ve TNF-α Ebioscience.

3.1.5. Araştırmada Kullanılan Çözeltiler

Protein İzolasyon Çözeltileri

- ✓ **Hücre lizis çözeltisi (10 mL)**

5 mL 1 M Tris HCl

0,88 mg NaCl

1 mL Triton X-100

1 mL 100 mM EDTA (Buz soğukluğunda pH:8,0)

1 M Tris Çözeltisi (50 mL) pH:8,0

6,057 g Tris 50 mL ultra saf H_2O ile çözülmüş ve pH:8,0'e HCl ile ayarlanmıştır.

100 mM EDTA (100 mL)

3,72 g EDTA 100 mL ultra saf H_2O ile çözülmüştür.

Protein Ölçüm Çözeltileri

- ✓ **Lowry stok çözeltisi**

Lowry reaktifi A (100 ml)

2 g Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) ve 0,4 g Sodyum Hidroksit (NaOH) 100 mL ultra saf H_2O ile çözülmüştür.

Lowry reaktifi B (100 mL)

0,5 g Bakır Sülfat ($CuSO_4.5H_2O$) ve 1 g Sodyum potasyum tartarat (NaK)

Standart çalışma çözeltisi

50 hacim Lowry reaktifi A

1 hacim Lowry reaktifi B

- ✓ **Biçinkonik asit (BCA) çözeltisi**

1. Çözelti A

Hazır halde alınan BCA çözeltisi kullanılmıştır. BCA Protein Assay Reagent A, Thermo scientific Kat. No. 23227.

2. Çözelti B

2 g $CuSO_4.5H_2O$ (%4)

50 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Standart çalışma çözeltisi

50 hacim çözelti A

1 hacim çözelti B

Antioksidan Aktivite Ölçüm Çözeltileri

- ✓ **DPPH· Çözeltisi**

Tris-HCI tamponu (50 nM, pH 7,4)

1,5138 g Tris (Trizma Base MW: 121,1 g) 200 mL deiyonize H_2O ile tamamlanmıştır. HCl ile pH 7,4'e ayarlanır. Daha sonra bunun üzeri 250 mL'ye distile H_2O ile tamamlanmıştır.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH·)

9,86 mg DPPH· 250 mL metanolde çözülmüş ve koyu renkli şişede muhafaza edilmiştir.

- ✓ **ABTS· Çözeltisi**

ABTS·(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radikali

18 mg ABTS· ile 3,3 mg Potasyum Persülfat ($K_2S_2O_8$) 5 mL distile H_2O ile çözüldükten sonra karanlıkta 12-16 saat 4 ºC'de bekletilmiştir. Absorbansı etanol ile seyreltilerek 734 nm'ye ayarlanmıştır.

Antiinflamatuar Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- ✓ **Hücre Besiyerleri (50 ml, %10)**

DMEM	44 mL
FBS	5 mL
L-Glutamin	500 µL
Penisilin-Streptomisin	500 µL

Elektroforez Yürütme Ve Transfer Çözeltileri

- ✓ **10X PBS**

14,4 g Na_2HPO_4

2,4 g KH_2PO_4

2 g KCl

80 g NaCl

700 mL distile suya ilave edilip çözüldükten sonra 1 litreye tamamlanmıştır.

- ✓ **1X PBS**

100 mL 10X PBS distile suyla toplam hacim 1 litre olacak şekilde tamamlanarak iyice karıştırılmıştır.

- ✓ **Yıkama Tamponu**

100 mL 1X PBS içine 50 µL Tween-20 ilave edilmiştir.

- ✓ **4X Ayırma jeli çözeltisi (50 ml, 1,5 M Tris, %0,4 SDS, pH:8,8)**

9,09 g Tris baz, 0,2 g SDS saf H_2O ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. pH, HCl ile 8,8'e ayarlanır.

- ✓ **Ayırma (Separating) jeli %12 (5 ml, %30 Akrilamid-bis kullanıldığında)**

3,4 mL dd H_2O

2,5 mL 4X ayırma jel çözeltisi

4 mL akrilamid-bis (%30)

100 µL APS (%10)

10 µL TEMED

- ✓ **Ayırma (Separating) jeli %10 (5 mL, %30 Akrilamid-bis kullanıldığında)**

4,1 mL dd H_2O

2,5 mL 4X ayırma jel çözeltisi

3,3 mL akrilamid-bis (%30)

100 µL APS (%10)

10 µL TEMED

- ✓ **4X Yığınlama jeli çözeltisi (50 ml, 0,5 M Tris, %0,4 SDS, pH:6,8)**

3,0275 g Tris baz, 0,2 g SDS saf H_2O ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. pH, HCl ile 6,8'e ayarlanır.

- ✓ **Yığınlama (stacking) jeli %5 (2,5 mL, %30 Akrilamid-bis kullanıldığında)**

5,7 mL dd H_2O

2,5 mL 4X yığınlama jel çözeltisi

1,7 mL akrilamid-bis (%30)

50 µL APS (%10)

5 µL TEMED

- ✓ **10X Elektroforez yürütme çözeltisi (Running Tampon, 50 mM Tris, 384 mM Glisin)**

6,055 g Tris baz, 28,82 g Glisin saf H_2O ile 200 mL'ye tamamlanmıştır.

- ✓ **1X Elektroforez yürütme çözeltisi**

100 mL 10X elektroforez yürütme çözeltisine 10 ml %10'luk SDS eklenip saf H_2O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- ✓ **6X Yükleme tamponu (Örnek Tampon, 10 ml)**

7 mL 4X yığınlama jeli çözeltisi, 3,6 mL gliserol, 1 g SDS, 1,2 mg bromfenol mavisi saf H_2O ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 5-10 dakika kaynatılmıştır.

- ✓ **6X Protein yükleme tamponu**

100 µL tampon içine 4 µL β-merkapto etanol eklenmiştir.

- ✓ **SDS (%10) (100 mL) (Sodyum Dodesil Sülfat)**

10 g SDS 100 mL ılık disitile su içinde çözdürülmüştür.

- ✓ **%30 Bisakrilamid Çözeltisi (100 mL)**

29 g akrilamid ve 1 g Bis saf distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

- ✓ **%10 Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi**

Amonyum persülfat 1:1 oranında saf disitile su içinde çözdürülmüştür.

- ✓ **Transfer Çözeltisi (1litre)**

100 mL 10X elektroforez yürütme çözeltisine 150 ml metanol eklendikten sonra bu karışım saf distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

- ✓ **Blotlama Çözeltisi (TBST (%0,1 Tween 20) (1 litre)**

1 litre TBS içine 100 µL Tween 20 eklenmiştir. 10 dakika karıştırıcıda karıştırılmıştır.

- ✓ **Blokloma çözeltisi (%3 süt tozu içeren TBST) (10 mL)**

0,3 g süt tozu 10 mL %0,1'lik TBST içinde çözülmüştür.

- ✓ **Primer antikorlar**

p38 ve p-p38 antikorları için 1:1000 olacak şekilde 10 µL primer antikor 10 mL TBST içinde hazırlanmıştır.

ERK1/2 antikoru için 1:500 olacak şekilde 20 µL primer antikor 10 mL TBST içinde hazırlanmıştır.

p-ERK1/2 antikoru için 1:2000 olacak şekilde 5 µL primer antikor 10 mL TBST içinde hazırlanmıştır.

- ✓ **Sekonder antikor**

1:2000 olacak şekilde 5 µL anti-rabbit (Anti IgG-HRP) 10 mL TBST içinde hazırlanmıştır.

- ✓ **Film Banyosu İçin Kullanılan Çözeltiler**

Developer çözeltisi (1 litre)

1,5 g metol, 25 g sodyum sülfit, 0,25 g sodyum karbonat, 3 g hidrokinon 1 litre distile su içinde çözdürülmüştür.

Fikser çözeltisi (1 litre)

62,5 g sodyum tiyosülfat, 5 g potasyum metabisülfat 1 litre distile su içinde çözdürülmüştür.

PCR

- ✓ **cDNA mix hazırlanışı;**

Tampon	4 µL x örnek sayısının bir fazlası
RNaz inhibitörü	0,5 µL x örnek sayısının bir fazlası
DTT	1µL x örnek sayısının bir fazlası
Revers transkriptaz	1,1 µL x örnek sayısının bir fazlası

Sitokinlerin Ölçülmesi

- ✓ **Mouse IL-6** (Ebioscience Kat. No. 88-7064)

Yıkama Tamponu (1X)

25 mL Konsantre Yıkama Tampon (20X), 475 ml distile su ile dilüe edilmiştir.

Assay Tamponu (1X)

2,5 mL Konsantre Assay Tampon (20X), 47,5 ml distile su ile dilüe edilmiştir.

Biotin-konjugat

0,03 ml Biotin konjugat üzerine 2,97 ml Assay Tampon (1X) ilave edilmiştir. 30 µL yeşil boya eklenmiştir.

Streptavidin-HRP

0,06 ml Streptavidin-HRP üzerine 5,94 ml Assay Tampon (1X) ilave edilmiştir. 24 µL kırmızı boya eklenmiştir.

Mouse IL-6 standartı

Mouse IL-6 standartı 600 µL distile su ilavesi ile konsantrasyonu 4 ng/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok standart çözeltisi 1:1 oranında örnek seyreltici ile seyreltilmiştir.

- ✓ **Mouse TNF-α** (Ebioscience Kat. No. 88-7324)

Yıkama Tamponu (1X)

25 mL Konsantre Yıkama Tampon (20X), 475 mL distile su ile dilüe edilmiştir.

Assay Tamponu (1X)

2,5 mL Konsantre Assay Tampon (20X), 47,5 mL distile su ile dilüe edilmiştir.

Biotin-konjugat

0,03 ml Biotin Konjugat üzerine 2,97 mL Assay Tampon (1X) ilave edilmiştir. 30 µL yeşil boya eklenmiştir.

Streptavidin-HRP

0,06 ml Streptavidin-HRP üzerine 5,94 mL Assay Tampon (1X) ilave edilmiştir. 24 µL kırmızı boya eklenmiştir.

Mouse TNF-α standartı

Mouse TNF-α standartı 250 µL örnek seyreltici ilavesi ile konsnatrasyonu 2 ng/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok standart çözeltisi 1:1 oranında kalibratör seyreltici ile seyreltilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Polisakkarit Özütleme

Toz halindeki makrofungus örnekleri lipofilik moleküllerden uzaklaştımak için %95'lik etanol ile 24 saat özüt edilmiştir. Yağlarından arındırılmış makrofungus örnekleri kurutulduktan sonra distile su ile yıkanarak (1:28 h/h) ultrasonik dalga ile 17 dk özüt edilmiştir. Sulu özüt 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlendikten sonra pellet kısmı uzaklaştırılmıştır. Süpernatant polisakkkaritleri çöktürmek amacıyla 4 katı hacimde %95'lik etanol ile çöktürüldükten sonra 4ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. 4500 rpm'de 20 dk tekrar santrifüjlenerek çöken kısım etanol, aseton ve eter ile yıkandıktan sonra kurutulmuş ve ham polisakkarit elde edilmiştir (133, 181).

3.2.2. Özütleme Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu

Özütleme sonrasında elde edilen ham polisakkarit 50 mL distile su ile seyreltildikten sonra, polisakkaritler dışındaki suda çözünen yapıları uzaklaştırmak için yaklaşık 4 g trikloroasetik asit ve sonrasında proteinleri uzaklaştırmak için Sevag reagent ((n-butanol:kloroform)=1:4 oranında) 10 mL olacak şekilde muamele edilerek deproteinize edilmiştir. 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlenen örnekler üzerine sıvı özüt hacminin 4 katı kadar %95'lik etanol ilave edilip ve bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Etanol ile muamele sonrasında oluşan çökelti kısımları 15 dk (5000 rpm ve +4°C) santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında çöken kısımlar (polisakkarit içerikli katı) alınarak saf suda çözünmesi sağlanmışır. Suda çözünen kısımlar dondurulup liyofilizatörde -48 °C'de vakum altında kurutulmuştur (182).

3.2.3.Polisakkarit Özütlerinin Kimyasal Analizleri

3.2.3.1 Monosakkarit Bileşimlerinin Tayini

HPLC analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yaptırılmıştır**.** Makrofungusların monosakkarit bileşimlerini belirlemek için Agilent 1200 seri HPLC sistemi kullanılmıştır. Bu sistem Degasser, pompa, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve florimetrik dedektör oluşmaktadır. Analizler EC Nucleosil (150 mm x 4.6 mm, 5 µm, NH_2) (Macherey Nagel) kolonla yapılmıştır (Mobil faz: Su: Asetonitril (25:75), Akış hızı 1 mL/dk., Kolon ısısı 30ºC, Dedektör : Refraktif indeks (RI), Enjeksiyon miktarı: 20 µL, Analiz süresi 15 dk). Fruktoz, glukoz, maltoz ve sukroz'un her birinden 0,1 g tartılarak 10 mL ultra saf su içerisinde çözdürülmüş (son

kansantrasyon 10 mg/mL) su ile dilüsyonlar yapılarak standart eğri oluşturulmuştur. Mantar örneklerinin polisakkarit özütleri (20 mg/mL) %4'lük H_2SO_4 çözeltisi (örnek başına 5 ml) ile 6 saat boyunca 100 ºC'de ağzı kapaklı tüplerde hidroliz edilmişlerdir. Hidrolizden sonra, çözeltilere baryum karbonat ($BaCO_3$) eklenerek nötral pH'ya ayarlanmıştır. Sıvı kısım bir gece beklemeye bırakılmış ve ertesi gün 20 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen çözelti 0.45 µm'lik filtreden süzüldükten sonra 20 µL'si HPLC'ye uygulanmış ve şeker düzeyleri belirlenmiştir (182,183).

3.2.3.2. Toplam Polisakkarit İçeriği

Toplam polisakkarit içeriği fenol-sülfürik asit metoduna göre referans olarak α-D-glukoz kullanılarak yapılmıştır (184). Yöntem karbohidratların sülfürik asit ile reaksiyona girerek dehidrate olduğunda furfural türevlerini üretmesi esasına dayanır. Reaksiyon furfural türevleri ve fenoller arasında algılanabilir bir renk oluşturur (185).

Metoda göre; izole edilen polisakkarit örneğinin (10 mg/mL) ve α-D-glukoz ile hazırlanan stok çözeltilerden saf su ile seyreltilerek 0-1000 µg/mL'lik çeşitli derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin üzerine sırasıyla 1 mL fenol (%5) ve 5 mL sülfürik asit (%95,5) ilave edilmiştir. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra vortekslenmiştir. 25-30°C 'de 10-20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 490 nm'de UV spektrofotometre ile okumalar yapılmıştır. Standart grafikten glukoz derişimi belirlenmiştir.

3.2.3.3.Toplam Protein Tayini

Protein konsantrasyonun tespitinde Lowry Metodu kullanılmıştır. Yöntem, bazik koşullar altında Biüret reaksiyonu ve aromatik amino asitlerin (Tirozin,Triptofan) Cu^{2+} katalizli oksidasyonundan sonra, ayıraçta bulunan Fosfomolibdik, Fosfotungstik asit ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. 0,5– 1,5 mg /mL duyarlılığa sahiptir. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir (186,187).

Öncelikle spektrofotometrik yöntemler için standart proteinler kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. En yaygın kullanılan protein standardı sığır serum albuminidir (Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma)). Bütün deneylerde Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılmıştır.

BSA stok çözeltileri (2 mg/mL) pH'sı 7,2 olan 0,2 M fosfat tamponu içinde hazırlandıktan sonra örnekler %1'lik (w/v) konsantrasyonda yine fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Standartlar ve örnekler bir gece hidrate edilmiştir. Protein standartları stok çözeltilerden fosfat tamponu ile seyreltilerek 0, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL'lik derişimlerde hazırlanmıştır. Lowry stok çözeltisinin 3 mL'si ile 300 µL örnek bir tüp içinde karıştırılıp ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir çözeltiye 1:1 oranında seyreltilmiş 300 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek 30 dakikalık inkübasyondan sonra spektrofotometrede (Jenyway UV) 720 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden polisakkaritlerin içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.4. Antioksidan Aktivite

3.2.4.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH·) Radikalini Süpürücü Etki Tayini

Özütlerin DPPH· radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve ark.'nın (1999) metoduna göre yapılmıştır (188). 450 µL Tris-HCI tamponu (50 nM, pH 7.4) ve 1mL 0.1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH·) ve 50 µL polisakkarit örnekleri karıştırılmıştır. Kontrol olarak polisakkarit içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol (kateşin) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm'de okunmuştur. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri nonlineer regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplanmıştır. Analizler 3 paralel olarak hesaplanmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

% inhibisyon= $[(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$

3.2.4.2. ABTS· Katyon Radikal Giderimi

ABTS· (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radikali (7 mM) ABTS·'in sulu çözeltisi ile $K_2S_2O_8$ (2.45 mM, son konsantrasyon)'un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirilmiştir ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm'de 0,700 (±0.030) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile polisakkarit çözeltileri (10 µL) karıştırılmış ve 734 nm'de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks'a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplanmıştır (189).

3.2.4.3. Toplam Fenol Miktar Tayini

Fungal polisakkaritlerin toplam fenolik içeriği Singleton (1999) prosedürü temel alınıp gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (190). 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. 1 dakika sonra 1,5 mL %20'lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Kontrol olarak polisakkarit içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. 25 ºC'de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçülmüş ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmıştır. Gallik asit çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak, her numunenin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asite eşdeğer olacak biçimde belirlenmiştir. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

3.2.4.4. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Polisakkaritlerin toplam flavonoit analizi Zhishen ve ark. (1999)'nın çalışmalarında kullandıkları metot temel alınarak yapılmıştır (191). Buna göre 1 mL polisakkarit t=0. dakikada 0,3 mL % 5'lik $NaNO_2$ çözeltisi ile karıştırılmış, t=5. dakika' da 0,3 mL % 10'luk $AlCl_3.6H_2O$ çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika'da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklenmiş ve 2,4 mL su ilave edilerek karıştırılmıştır. 510 nm'de köre karşı absorbans ölçülmüştür. Özütlerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları kateşine eşdeğer olarak mg $_{CE}/g_{ekstre}$ olarak hesaplanmıştır. Kateşinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlanmıştır. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapılmış ve ortalama değerler alınmıştır.

3.2.6. Antiinflamatuar Aktivitenin *in vitro* Tespiti

3.2.6.1.Hücre Hattı ve Kültür Ortamı

Hücre kültürleri biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda, tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılan hücrelerin, dokudan mekanik yollarla alınarak proteolitik enzimlerle muamele edilip küçük kümeler halinde ayrıştırılması ve in vitro olarak çoğaltılması esasına dayanan bir tekniktir. Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalara için çoğaltmak ve gerektiğinde tekrar kullanmak için dondurarak saklamaktır.

Donmuş halde alınan Bv-2 fare mikroglia hücreleri oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve DMSO uzaklaştılmıştır. Hücrelerin üzerine 3 mL ısıl işlemle inaktive edilmiş % 15 fetal sığır serum, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri ilave edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Solusyonu (DMEM); Hücrelerin beslenebilmeleri için ihtiyaç duydukları glukozu, canlılıklarını devam ettirebilmeleri için uygun ozmolarite ortamını ve pH'a işlevlerini yapabilmeleri için de aminoasitleri ve vitaminleri ihtiyaçları ihtiva eder. Fetal Bovine Serumu (FBS); Hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan zengin bir protein çözeltisidir. Bu protein karışımında hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan proteinler bulunur. Penisilin-Streptomisin solüsyonu kontaminasyonları önlemek için ortama eklenir. Tekrar santrijüjlendikten sonra pellet kısmı 1 mL besiyerinde homojenize edilir. 25 cm^2 kültür flasklarında 37 ºC sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edilmiştir. Inkübasyon sonrası tabana yapışan hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mL % 0,25'lik Tripsin/EDTA yardımıyla 5 dakida 37 ºC sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde bekletilmiş ve kültür kabı tabanından koparılıp bir başka kültür kabına pasajlanmıştır. Tripsin, hücre pasajlamalarında kullanılan serin proteaz tipi bir enzimdir. Lizin ve arjinin aminoasitlerinin yaptığı bağları yıkar. Sıcaklık arttıkça etkisi de artmaktadır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konulduklarında yüzeyden daha hızlı ayrışırlar. Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi de önemlidir. Tripsin, hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar (192-195). Bu yüzden tripsini hücrelerden uzaklaştırmak için 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet kısmına 1 mL besiyeri konarak hücreler homojenizasyonu sağlanmıştır. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayımı ve hücre canlılığı kontrol edilir. Bu amaçla hücreler tripan mavisi ile muamele edilerek sayımı yapılmıştır. Sayım için 90 µL tripan mavisi ile 10 µL homojenize hücrelerden 100 µL'lik bir karışım elde edilmiş ve bu karışımdan 10 µL alınarak sayım yapılmıştır.

3.2.6.2.Sitotoksik Etkinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Semi-kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3- (4,5) – dimethylthiazol-2-yl) – 2,5- diphenyl tetrazolium bromide) sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan in vitro

koşullarda kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlayan bir yöntemdir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. MTT, mitokondrilerin matriksinde (mitokondriyal iç membranın içe bakan yüzeyinde) bulunan süksinat dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve tetrazolium halkası dehidrogenaz enzimlerince parçalanır ve sonuçta MTT mor renkli suda çözünmeyen formazana kristallerine dönüşür. Formazan kristalleri, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünür hale gelir ve konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (196-198).

Kültüre edilen $1x10^5$ hücre/mL yoğunluğundaki BV-2 hücreleri 96 kuyucuklu mikroplaklara her kuyucuğa 15.000 hücre düşecek oranda hesaplanarak ekilmiş ve geliştirilmiştir. Gelişen hücrelerin üzerindeki sıvı kısım enjektör ile atıldıktan sonra plate tabanına yapışan hücrelerin üzerine 50 µL Fenol kırmızısı içermeyen RPMI ve çeşitli konsantrasyonlardaki (0-200 µg/mL) fungal polisakkaritler muamele edilmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler üzerindeki sıvı atılmış ve her kuyucuğa 100 µL MTT (5 mg/mL) çözeltisi eklenmiştir. 37ºC'de 2 saatlik inkübasyon sonrası MTT çözeltisi içeren medium ortamdan uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa mor renkteki MTT formazanlarının çözülmesini sağlamak amacı ile 100 µL DMSO eklenmiştir. Son olarak ELİSA (Epoch Microplate Spectrophotometer) da 570 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur (199,200). Hücrelerde letal doz olmayan en yüksek seviye belirlenmiş, çalışmanın bundan sonraki aşamalarına bu dozla devam edilmiştir.

3.2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) belirli bir DNA bölgesinin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasında kullanılan bir tekniktir. PCR'ın temeli hedef genetik materyalin çoğaltılması, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP), oligonükleotid primerler, tampon sistemi ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi varlığında farklı ısı değişimleri yardımıyla çoğaltılmasına bağlıdır. Denatürasyon, tutunma ve primerlerin uzaması aşamalarından oluşur. DNA moleküllerini birarada tutan hidrojen bağları kırıldığı denatürasyon aşamasında; hedef çift iplik DNA yapısı 94 ºC'de sıcaklıkta tek

ipliklere ayrılarak polimeraz zincir reaksiyonun birinci basamağını oluşturur. Bu aşama 30-60 sn arasında değişir. Tutunma aşamasında; sıcaklık düşürülerek çoğaltılması amaçlanan DNA bölgesinin sınır uçlarına komplementer olan tek zincirli primer çiftleri hedef DNA'ya tutunması reaksiyonun ikinci basamağını oluşturur. En yaygın kullanılan tutunma sıcaklığı 55-60 ºC aralığında seçilir. Primerlerin uzaması aşamasında; Sıcaklık *Taq* DNA polimeraz için optimum sıcaklık olan 72 ºC'ye çıkarılır. Ortamda bulunan dNTP'lerin hedef DNA'ya tutunan primerlere polimeraz enzimi yardımıyla ardarda eklenmesi üçüncü basamağı oluşturur. *Taq* DNA polimeraz kalıp DNA'ya komplementer yeni DNA ipliklerini sentezler (201,202).

Bu üç aşama Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsünü oluşturur. Döngü sonunda oluşan yeni DNA yapıları bir sonraki döngü için kalıp görevi görür. Bu şekilde her döngü sonunda DNA iki katına çıkar. Genel olarak PCR işlemi 30 döngüde gerçekleştirilir. 30 döngü sonunda son yapılan DNA kalıplarının tamamlanması için 72ºC'de baz uzunluğuna bağlı olarak 5 dk arasında bekletilir. 30 döngü sonunda kalıp DNA parçası 2^{30} çoğaltılmış olur.

Hücrelerin inflamasyona karşı yanıtı hücrelerde üretilen COX-2 ve iNOS proteinlerin mRNA düzeyleri nicel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile nicel değerlendirilmiştir. Sitokin genlerinin (iNOS, Cox-2) hücre içi mRNA ifadelenmelerini ölçmek için, toplam RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.6.3.1.RNA İzolasyonu

PCR teknolojisinin RNA çalışmalarına uygulanabilmesi için öncelikle RNA'nın DNA polimeraz enzimi tarafından kalıp olarak kullanılabilmesi için cDNA (Complementer DNA)'ya çevrilmesi gerekir. Bu işlem ters transkripsiyon (revers transcription) olarak ifade edilir. Revers transkriptaz mRNA'yı cDNA sentezi için bir kalıp olarak kullanır. mRNA/cDNA çift iplikli bir dubleks oluşur. RNA'dan DNA'ya bir transkripsiyon olduğu için revers transkripsiyon olarak adlandırılır (203). DNA RNA'dan daha stabil olduğundan mRNA'nın analizi için cDNA sentezlenir. Daha sonra bu cDNA, PCR'da kalıp olarak kullanılıp çoğaltılarak analiz edilmek istenen mRNA kopya sayısı artmış olur.

Hücreler protein izolasyonunda anlatıldığı gibi geliştirildikten sonra LPS ile indüklenen BV-2 hücreleri üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 1000 µL RNAzol eklenmiş ve kuyucuklar RNAzol (Sigma R4533) ile iyice yıkanarak yapışan

hücreler kaldırılmıştır. Eppendorflara aktarılan hücreler üzerine 400 µL distile su eklenmiş ve 15-20 saniye ters-düz edilmiştir. 10-15 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları 1000'er µL alınarak ayrı eppendorflara aktarılmıştır. Süpernatantların üzerine 400 µL etanol (%75) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra 10.000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar çekilip atılmıştır. Pelletlerin 500 µL etanol (%75) ile yıkanmıştır. 3 dk 8450 rpm'de santrifüjlendikten sonra pellet 400 µL etanol (%75) ile tekrar yıkanmıştır. 3 dk 8450 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. Eppendorflar ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. 400 µL izopropanol (%70) (Ridel-De Haen 24137) eklenmiş ve 8450 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırldıktan sonra yaklaşık 10 dk kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra eppendorflara 60 µL RNaz free water eklenmiş ve nanodropta RNA (ng/µL) miktarları ölçülmüştür.

cDNA sentezi için 2 aşamadan oluşan cDNA sentez protokolü uygulanmış ve cDNA sentez kiti (Roche) kullanılmıştır. Buna göre cDNA 1 protokolü; nanodropta ölçülen RNA miktarları her örnek için normalizasyonu sağlamak amacıyla 1000 ng/µL olacak şekilde hesaplanmıştır. Eppendorflara sırasıyla random hexamer primer 1 µL, oligo(dt_{18}) 1µL (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit), uygun miktarda izole edilen RNA örneğimizden ilave edilmiş ve son olarak H_2O ile toplam hacim 11,4 µL'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın üzerine cDNA 2 protokolü uygulanmıştır. Toplam hacim 20 µL'dir. Ilk önce cDNA mix hazırlanmıştır. Her tüpte toplam hacim 20 µL olması için 8,6 µL cDNA mix konmuştur. Thermo cycler cihazında 95 °C'de 10 dakikalık bir ön inkübasyona tabii tutularak RNA'lar cDNA'ya dönüştürülmüştür. Sonrasında Real Time PCR aşamasında oluşan cDNA'lar 80 µL master su (RNaz free water) ile seyreltilmiştir ve bu seyreltiden 5 µl cDNA, 1 µl ileri ve geri primerler, 7 µl master mix, 7 µl saf su (LightCycler® 1536 DNA Probes Master) karıştırılarak Real-time PCR reaktanları hazırlanmıştır. Realtime PCR cihazında denatürasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada, hedef çift iplik DNA yapısının yüksek sıcaklıkla tek ipliklere ayrılması sağlanmıştır.

PCR ürünlerinin toplam sinyalinin background sinyalini geçtiği an CT (treshold cycle) değeridir. Real-time PCR yaparken her zaman bir referans gen (housekeeping gen) kullanılır. Normalizasyon geni olarak β-aktin kullanılmıştır. Hedef genin CT değeri

referans genin CT değerine normalize edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.6.4.Sitokin İncelemeleri

Çalışmanın bu bölümünde, Bv-2 hücrelerinde sitokin düzeyleri belirlenmiştir. Bv-2 hücreleri 25 cm^2'lik hücre kültür flaskına ekilerek, %5 CO_2 37°C' de inkübe edilmiştir. Bu amaçla Bv-2 hücre süpernatanlarında ELISA yöntemi ile IL-6 ve TNF-α düzeyleri ölçülmüştür. İlk olarak Bv-2 hücrelerine fungal polisakkaritler 24 saat muamele edilmiş daha sonra LPS ile Bv-2 hücrelerinde inflamasyon oluşturulmuştur. Bv-2 hücreleri üzerinde 1 µg/mL LPS konsantrasyonda 6 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Hasar sonrası IL-6 ve TNF-α seviyelerinde artma olup olmadığı tespit edilmiştir. Kültür süpernatantlarında sitokin düzeylerinin belirlenmesi için monoklonal antikor tabanlı ticari ELISA kitleri kullanılmıştır. Ölçümler üretici firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. ELISA yönteminde kısaca, hücre kültür süpernatanındaki sitokin düzeyleri monoklonal antikorlar yardımıyla tespit edilmiş, ardından miktarlar spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. ELISA plaklarına oluşan renk değişikliği, standart eğrilerle regresyon korelasyon analizine tabi tutularak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.6.4.1.TNF-α Test Protokolü

ELİSA plağındaki kuyucuklar 200 µL Yıkama Tampon ile 2 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 50'şer µL örnek seyreltici ilave edilmiştir. Kör için ayrılan kuyucuklara 100 µL örnek seyreltici eklenmiştir. 250 µL örnek seyreltici ile hazırlanan TNF-α standardı yine örnek seyreltici ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Her seyreltik çözeltiden ELİSA plağındaki kuyucuklara 50'şer µL konmuştur. Polisakkarit örnekleride kuyucuklara 50'şer µL konmuştur. Her bir kuyucuk üzerine 50 µL Biotin-konjugat ilavesinden sonra plak bantla kapatılmış ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat 400 rpm'de karıştırılmıştır. Süre sonunda plak 6 kez yıkama tampon (200 µL) ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL Streptavidin- HRP eklenmiş ve yine oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat 400 rpm'de karıştırılmıştır. Süre sonunda tekrar plak 6 kez yıkama tampon (200 µL) ile tekrar yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL TMB Substrat solüsyonundan eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika bekledikten sonra kuyucuklara 100'er µL durdurucu solüsyon eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda okumalar yapılmıştır. Örnekler 4 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.6.4.2. IL-6 Test Protokolü

ELİSA plağındaki kuyucuklar 200 µL Yıkama Tampon ile 2 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 50'şer µL örnek seyreltici ilave edilmiştir. Kör için ayrılan kuyucuklara 100 µL örnek seyreltici eklenmiştir. 600 µL örnek seyreltici ile hazırlanan IL-6 standardı yine örnek seyreltici ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Her seyreltik çözeltiden ELİSA plağındaki kuyucuklara 50'şer µL konmuştur. Polisakkarit örnekleride kuyucuklara 50'şer µL konmuştur. Her bir kuyucuk üzerine 50 µL Biotin-konjugat ilavesinden sonra plak bantla kapatılmış ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat 400 rpm'de karıştırılmıştır. Süre sonunda plak 5 kez yıkama tampon (200 µL) ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL Streptavidin- HRP eklenmiş ve yine oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat 400 rpm'de karıştırılmıştır. Süre sonunda tekrar plak 5 kez yıkama tampon (200 µL) ile tekrar yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL TMB Substrat solüsyonundan eklenmiştir.karanlıkta ve oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika bekledikten sonra kuyucuklara 100'er µL durdurucu solüsyon eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda okumalar yapılmıştır. Örnekler 4 paralel olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.6.5. Hücrelerden Protein İzolasyonu

1.000.000 BV-2 hücresi 25 cm^2 hücre kültür kabında DMEM besiyeri içinde 24 saat 37ºC sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edilmiş ve kültür kabına yapışan mikroglia hücrelerini kaldırmak için kültür kabındaki besiyeri dökülmüştür. Daha önce anlatıldığı gibi Tripsin/EDTA yardımıyla yapışan hücreler kaldırılmıştır. Hücreler kalktığında Tripsin/EDTA ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür kabına 5 mL DMEM ilave edilerek kalkan hücreler toplanmıştır. 10000 rpm'de 4 ºC sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmına 2 mL DMEM ilave edilmiştir. 6'lı hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 100 µL hücre 900 µL DMEM olarak dağıtılmıştır. 37 ºC sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren etüvde hücreler tabana yapışana kadar inkübe edilmiştir. Tabana yapışan hücrelerden besiyeri uzaklaştırldıktan sonra 2 kuyucuğa 1000 µL Fenol kırmızısı içermeyen RPMI, ilave edilmiş ve diğer diğer kuyucuklara MTT ile konsantrasyonu belirlenen polisakkarit örneğinden 40 µL (5 mg/mL stok polisakkarit çözeltisinden 200 µg/mL konsantrasyon için), 990 µL Fenol kırmızısı içermeyen RPMI ve 10 µL (200 µg/mL Stok polisakkarit çözeltisinden 50 µg/mL konsantrasyon için) polisakkarit örneği konmuştur. 24 saat 37 ºC sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edilmiştir. Çalışmalar 2 paralel

gerçekleştirilmiştir. Gelişen hücreler üzerindeki sıvı besiyeri ortamdan uzaklaştırldıktan sonra bir kuyucuğa kontrol grubu için 1000 µL RPMI, LPS ile muamele edilecek hücreler için diğer kuyucuklara 990 µL RPMI ve 10µL LPS stoğu hazırlanmış ve bu stoktan kuyucuklara 100'er µL besiyerinden 900 µL konmuştur. 6 saat 37ºC sıcaklıkta, %5 karbondioksit içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

LPS muamelesinden sonra hücrelerin üzerindeki sıvı kısım alınarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve pellet kısmından uzaklaştırlmıştır. Elde edilen süpernatantlar sitokinlerin tayininde kullanılmak üzere ayrı eppendorflarda saklanmıştır.

Üzerindeki sıvıdan arındırılan kuyucuklar 1 mL PBS ile yıkanmıştır. PBS; Kültür ortamındaki hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla kullanılan divalent katyonları (Ca^{++}, Mg^{++}) içermeyen fosfat tampon solüsyonudur. Hücre kazıyıcı yardımı ile kültür kabının tabanından hücreler kaldırılmış ve bu PBS'li karışım eppendorflara aktarılmıştır. Daha önce elde edilen pellet kısımlarıda bu karışıma ilave edilmiştir. Tekrar kuyucuklara 500 µL PBS konarak hücre tabanı tamamen yıkanmıştır. Tüm hücreler eppendorflarda toplandıktan sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülmüştür. Tekrar 500 µL PBS ilavesinden sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve hücre PBS'den arındırılmıştır. Pellet üzerine 100 µL protein izolasyon çözeltisi Ripa konmuştur. Ripa çözeltisi 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 Mm NaCl; 10 Mm monosodyum fosfat (NaH_2PO_4); 5 Mm EDTA; 30 µM Sodyum ortovanadat (Na_3VO_4); %10 gliserol; %1 (v/v) Nonidet P-40; 1% (w/v) sodium desoxycholate; % 0,1 sodyum dodesil sülfat; 1 mM fenil metil sulfonil florür (PMSF); 0,055 TIU/mL aprotinin (204) içerir. Ripa çözeltisi eklendikten sonra hücreler 20-25 sn ultrasonike edilerek patlatılmıştır. Bu hücre lizatı 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra protein içeren süpernatant alınarak eppendorf tüplere paylaştırılmıştır. Protein miktar tayini BCA metoduna göre yapılmıştır.

BCA (Bcinchonic Acid) protein tayin yönteminde Bakır Sülfat, BCA çözeltisine eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk verir. Bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde proteinin peptit bağları ile etkileşerek Cu^{++} iyonları Cu^{+} iyonlarına dönüşürek karışımın rengini mora çevirir. Hızlı, hassas ve kesin bir yöntemdir (205).

Çözelti A ve B hazırlandıktan sonra ilk olarak uygun konsantrasyona sahip BSA standartları hazırlanmış ve standart absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği çizilerek bir eğri denklemi elde edilmiştir. Çizilen standart eğrisi herbir proteinin

konsantrasyonunu belirlemede kullanılmıştır.

1. Ölçüm için 96 kuyucuklu mikroplate kullanılmıştır.

2. Her bir kuyucuğa 5 µL örnek pipetlenmiştir.

3. Her bir kuyucuğa 5 µL PBS pipetlenmiştir.

4. Her kuyucuğun üzerine standart çalışma çözeltisinden 200 µL pipetlendi ve plate 30 sn karıştırıcıda tutulmuştur.

5. Plate 37ºC'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

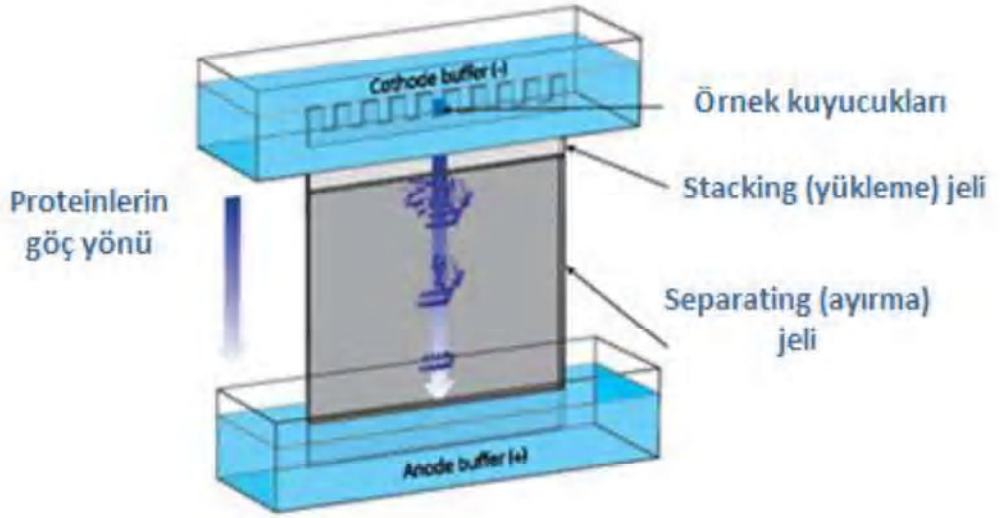
6. Oda sıcaklığına gelince A_{562} nm'de okunmuştur.

3.2.6.6.Western Blot ile Proteinlerin Belirlenmesi

Elektrotransfer (Elektroblotlama) elektroforetik olarak ayrılmış kompleks örneklerin, elektrik alan altında mekanik olarak stabil bir membrana aktarılmasını sağlayan bir yöntemdir. Western Blotlama, proteinlerin istenilen amaca ve yönteme uygun şekilde jelde elektroforez edildikten sonra boyanması ve membrana aktarılmasıdır. Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile elektroblotlamanın birlikte çalışılması, proteinlerin mikrogram seviyelerinde analizlerini yapabilmeyi sağlamıştır. SDS, ısı ile birlikte denatüran olarak kullanılan bir indirgeyici ajandır. Proteinlerin elektroforez öncesi denatürasyonu molekül büyüklüklerine göre ayrılmalarını sağlar (206,207). Şekil 3.1'de western blot jel elektroforezi, Şekil 3.2'de SDS-PAGE jel elektroforezi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Western Blot Jel Elektroforezi



Şekil 3.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi Şematik Gösterimi (208).

Jele dik bir elektrik akımı uygulanınca negatif yüklü proteinler jelden çıkıp hemen üstte bulunan membrana absorbe olurlar. Negatif yüklü moleküller üst tampon haznesine bağlı negatif katoddan alt tampon haznesine bağlı pozitif anoda doğru hareket eder.

Yığınlama (stacking) ve ayırma (separating) jellerinin yanyana konulması ile oluşturulan kesintili sistemin kullanılması seyrek örneklerin konsantrasyonu ve yüksek bant keskinliğine yol açar. Poliakrilamid jel elektroforezinde bir elektrik alanına maruz

kalan proteinler, jel matriksinin içindeki gözeneklerin içinden geçerek hareket ederler. Akrilamid konsantrasyonu arttıkça jel gözenek büyüklüğü azalır. Jel gözenek büyüklüğüne ilave olarak proteinin yükü ve büyüklüğüde hareket hızını belirler. PAGE ile ayrıştırılan proteinler PVDF mebrana aktarıldıklarında membran üzerinde protein içermeyen bölgeler oluşur. Bu bölgeler süt tozu veya BSA gibi spesifik olmayan proteinle kaplanır. Antikorlar, membranda bulunan özel proteini belirlemede kullanılır. Membranda bulunan antijen, membran ile antikorun inkübasyonu ile belirlenir. Birincil antikor kendine özgü antijene bağlanır. Bağlanmayan diğer antikorlar yıkama ile mebrandan uzaklaştırılır. Bağlanmış antikorlar ise membran sekonder antikor ya da konjugat olarak adlandırılan bir enzim grubu içeren anti-immünoglobülinlerle inkübe edilir. Bağlanmayan antikorlar yıkamalarla uzaklaştırılır ve uygun substrat ilavesi ile enzimin reaksiyona girmesi sağlanır. Bu şekilde istenilen proteinin yeri tespit edilir.

Molekül ağırlıklarına göre SDS-PAGE'de yürütülen proteinler elektrik akımı ile protein tutucu membranlar olan nitroselüloz veya poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarılır. Bu aşamadan sonra immünblotlama gerçekleşir. Immün blotlamada elektroforez yöntemi ile ayrılan proteinler elektroforetik olarak bir membrana transfer edilir. Poliakrilamid jelin kopyası olan membran özgül proteinlere karşı antikorlar ile incelenir. Primer antikorlar işaretli sekonder antikorlar ile açığa çıkarılır (206).

3.6.2.6.1.Poliakrilamid Jelin Dökülmesi

Çalışmalar jel çözeltisinin, 8x10 cm ve 10x7 cm camların arasında polimerize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Camlar, taraklar ve spacerlar etanol ile iyice temizlenmiştir. Proteinlerin ağırlığına göre % kaçlık jelde çalışılacağı seçilmiştir. Protein ağırlığı büyüdükçe çalışılacak jelin yüzde oranı düşer. Gözenek büyüklüğü kullanılan akrilamid miktarı ile ters orantılıdır. Çalışmada %10 ve12'lik jeller hazırlanmıştır. Protokole göre ayırma jelleri hazırlandıktan sonra üzerlerine donması için 100 µL %10'luk APS ve 10 µL TEMED eklenerek henüz sıvı haldeki jel çözeltisi, hava kabarcıklarının çözeltiye girmemesine dikkat ederek castin stand'a yerleştirilen spacer'lar arasındaki iki cam arasından dökülmüştür. Jelin üst sınırının düzgün olması ve varsa hava kabarcıklarından arındırmak için hava ile temas eden yüzeyine 300 µL % 0,1'lik SDS veya bütanol bir kenardan başlayıp yavaşça ilerleyerek dökülmüştür. Polimerize olan jel musluk suyunda yıkanmıştır. Jelin içindeki fazla su kurutma kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yığınlama jeli çözeltisi protokole uygun hazırlanmıştır.

Yığınlama jeli çözeltisine donması için 50 µL %10'luk APS ve 5 µL TEMED eklenmiştir. Tarak iki camın arasına yerleştirilip jel donmaya bırakılmıştır. Donunca musluk suyunda yıkanmıştır.

3.2.6.6.2.Örneklerin Jele Yüklenmesi

Örnekler her kuyucuğa 30 µg protein yüklenecek şekilde hesaplandıktan sonra daha önceden eppendorflara alınan proteinlerden uygun miktarda alınıp yeni eppendorflara konmuştur. Ayrı bir yerde hazırlanan 6X yükleme (örnek tamponu) çözeltisinden 96 µL alınıp üzerine 4 µL 2 merkaptoetanol ilave edilmiştir. Küçük molekül ağırlıklı bir tiol olan merkaptoetanol disülfür bağlarının oluşumunu engelleyerek ısı ile proteinlerin primer yapıya dönüşümünü sağlar. 100 µL hazırlanan bu boya protein bulunan her eppendorfa 4 µL eklenmiş, 95 ºC'de 5 dakika ısı ile denatüre edilerek proteinlerin primer yapıya dönüşümü sağlanmıştır. Jelin olduğu plaklar tanka yerleştirilmiştir. 10X elektroforez yürütme çözeltisinden (Running Tampon) 1X yürütme çözeltisi hazırlanmış ve anot-katot boşluklarına konmuştur. Yığınlama jeline oturmuş olan tarak dikkatlice çıkarılıp kuyular 1X yürütme çözeltisi ile iyice yıkanmıştır. Yükleme tamponu eklenmiş ve 95ºC'de 5 dakika ısıtılan örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Tank 4 ºC'de 150 V 'da bromfenol mavisi jelin en alt sınırına gelene kadar elektroforez edilmiştir.

3.2.6.6.3.Western Transfer

Proteinlerin elektroforezi tamamlandıktan sonra transfer solüsyonu hazırlanmıştır ve geniş bir kaba alınmıştır. Jelin protein içermeyen yığınlama kısmı kesilip atılmıştır ve transfer solüsyonda bekletilmiştir. PVDF membran uygun boyutta kesildikten sonra transfer solüsyon içerisinde yaklaşık 15 dakika hidrate edilmiştir. Western sandviçi hazırlanmıştır. Kasetler içi transfer solüsyonu ile dolu kaba konularak siyah yüze (-taraf) sünger, 2 adet whatman kağıdı ve jel konulmuştur. Jelin üzerine membran yerleştirilmiştir. Hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat ederek membranın üzerine sırasıyla 2 adet whatman kağıdı ve sünger konmuştur. plastik clamp ile kasetler kapanmıştır. Kaset kapatıldığında alt tarafta siyah üst tarafta kırmızı yüz olmalıdır. Kaset dikey olarak, renksiz yüzü elektrod modülünün kırmızı kısmına, siyah kısmı elektrod modülünün siyah kısmına bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Elektrod modülü ve kaset sistemi tank içine yerleştirilmiştir. Jeldeki protein 200-250 mAmp akımda 1,5 saat +4 C'de PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer sonunda jel kaseti dikkatlice

açılmıştır. Süngerler ve whatman kağıtları ayrılıp jel ve membran dikkatlice birbirinden ayrılmıştır.

3.2.6.6.4.Western Blotlama

Membranda oluşan spesifik olmayan protein bölgelerini uzaklaştırmak için petrilere membran ve TBST içinde süt tozu konarak 1 saat bloklama yapılmıştır. 1 saat sonunda petrilerdeki süt tozu dökülerek 2 kez TBST ile 10 dakikalık yıkamalar yapılmıştır. Membran uygun dilüsyondaki primer antikorla (Anti-ERK1/2, Anti-pERK1/2, Anti-p38, Anti-p-p38) gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 3X10 dakikalık TBST ile yıkamalar yapılmıştır. Sekonder antikor (anti IgG HRP) prosedüre uygun şekilde TBST ile dilüe edilmiş ve membran 2 saat boyunca sekonder antikorla ışık ile temas etmeden inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 2X10 dakikalık TBST ile yıkamalar yapılmıştır. Karanlık oda işlemlerine geçilmiştir.

3.2.6.6.5.Karanlık Oda İşlemleri

Membran gergin ve düz film veya asetat üzerine konmuştur. ECL solüsyonu 1 ve 2 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra membranın tüm alanını kaplayacak şekilde üzerine dökülmüştür. Sekonder antikorla işaretlenen uygun bantlar ECL reaksiyonu ile görünür hale getirilmiş ve X-ray filme basılmıştır. X-ray film sırasıyla developer-su-fixer-su'ya batırılmış ve kuruduktan sonra bantlar gözlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SigmaPlot 13 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede unpaired Student's t testi kullanılmıştır. İstatistiksel farkın belirlenme aralığı olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir. Real-time PCR sonuçları Rest 2009 programı kullanılarak ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Elde edilen polisakkarit özütlerin verimi

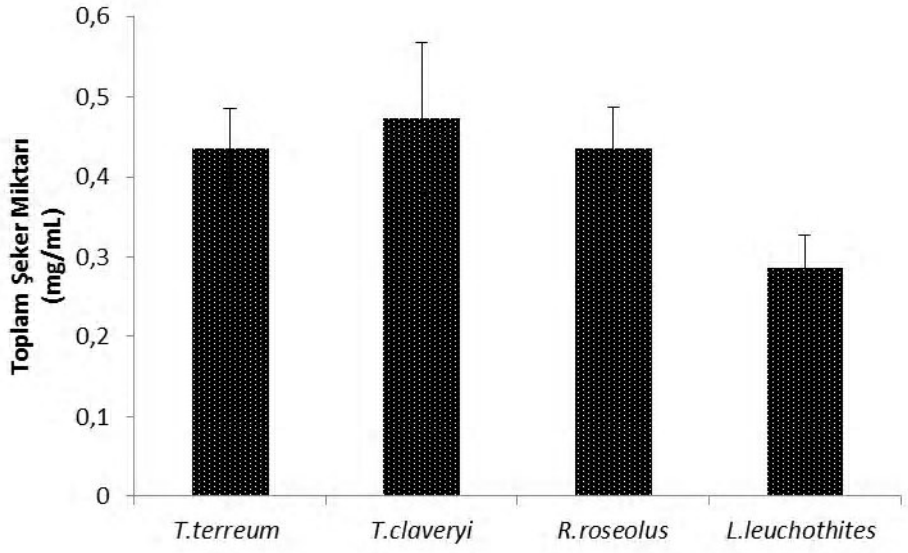
Soğuk su ile özüt edilen kaba polisakkarit miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir. Özütleme işlemlerinde her mantar türünden aynı miktarlarda kullanılmış olmasına rağmen farklı miktarlarda polisakkarit özütleri elde edilmiştir. Polisakkarit özütlerin verimi, belli miktarda tartılmış kuru materyalden elde edilen özüt miktarı tartıldıktan sonra g/100g olacak şekilde hesaplanarak ifade edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Fungal polisakkarit özütlerinin verimi

Çalışılan Mantar Örnekleri (30g)	**Polisakkarit içerikli katı örnek miktarı (g)**	**%Verim**
T.terreum	0,35	1,17
T.claveryi	1,25	4,15
R.roseolus	0,32	1,08
L.leuchothites	0,19	0,63

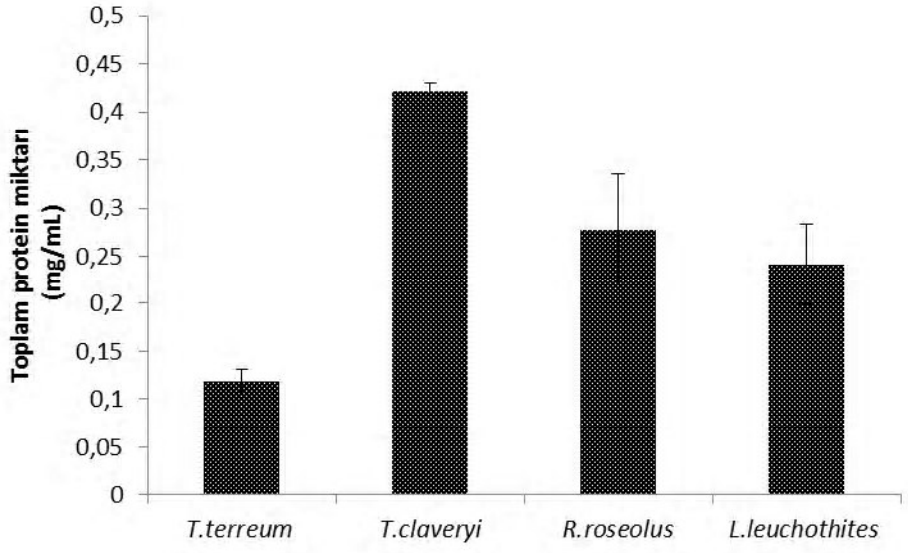
4.2. Elde edilen polisakkarit özütlerin kimyasal analiz sonuçları

T. terreum, T. claveryi, R. roseolus ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin toplam şeker içerikleri sırasıyla 0,44±0,05, 0,47± 0,09, 0,43±0,05 ve 0,29±0,04 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.1) (n=3).



Şekil 4.1. Fungal polisakkarit özütlerinin toplam şeker sonuçları (mg/mL)

T. terreum, T. claveryi, R. roseolus ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin toplam protein içerikleri sırasıyla 0,12±0,01, 0,42±0,01, 0,28±0,05 ve 0,24±0,04 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.2) (n=3).



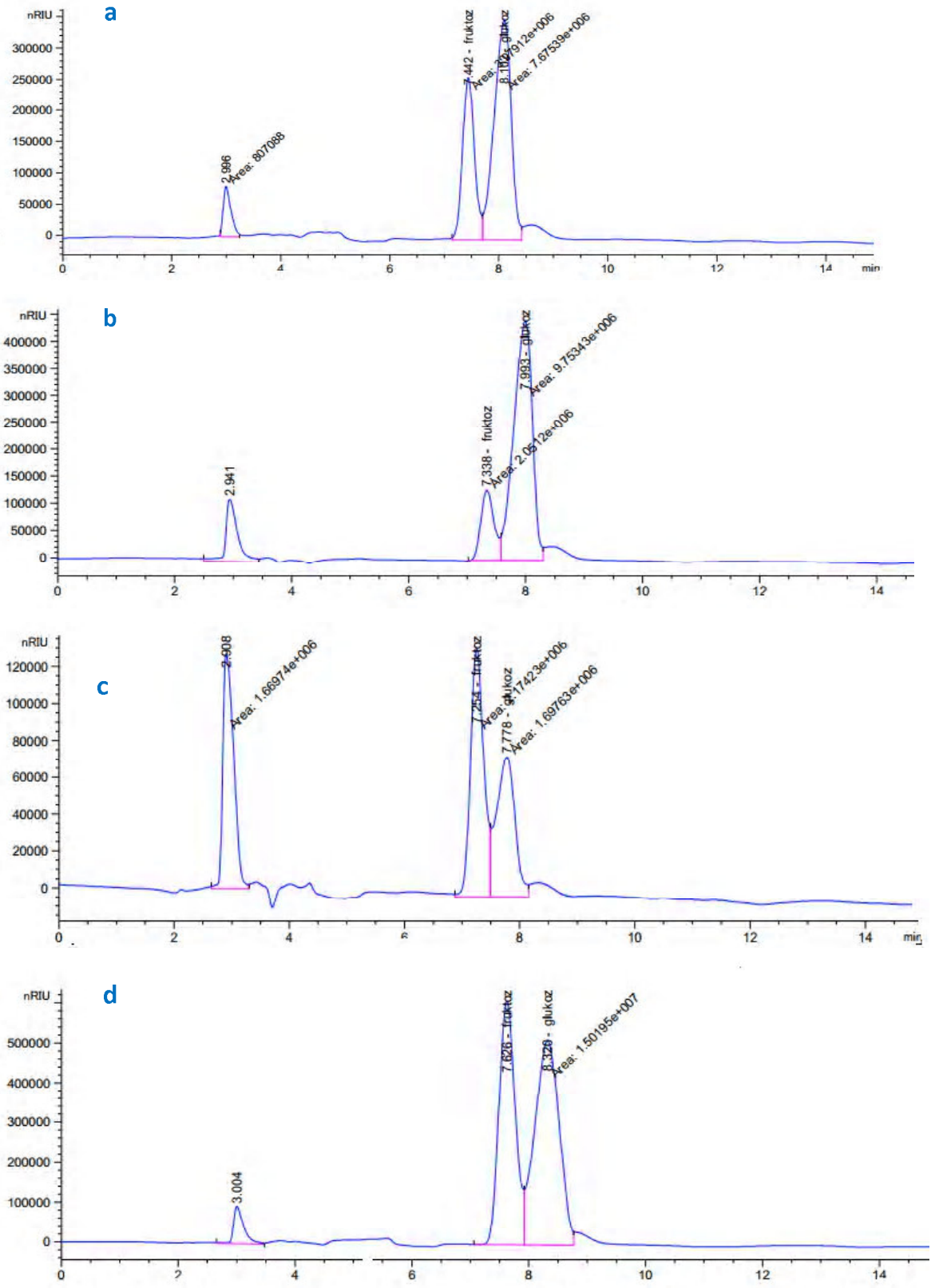
Şekil 4.2. Fungal polisakkarit özütlerinin toplam protein sonuçları (mg/mL)

Çalışılan mantarların soğuk su ile özüt edilen polisakkaritlerindeki şeker içeriğini tespit edebilmek için farklı derişimlerde glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz standartları kullanılmıştır. Bu standartlar ve örnekler HPLC sisteminde analiz edilerek hem polisakkaritin yapısında bulunan basit şekerler (monosakkaritler) hem de bu şekerlerin

miktarları belirlenmiştir. Polisakkarit özütlerinin nötral şeker bileşimi, temel olarak D-glukoz ve fruktozdan oluşmaktadır (Tablo 4.2). Şeker analizlerinde maltoz ve sukroz birimlerine rastlanmamıştır. HPLC kromogramları Şekil 4.3 'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Fungal polisakkaritlerin monosakkarit birimleri

	Fruktoz (mg/g)	**Glukoz (mg/g)**
T.terreum	89,0	128,50
T.claveryi	73,51	147,0
R.roseolus	74,50	74,0
L.leucothites	66,52	72,50



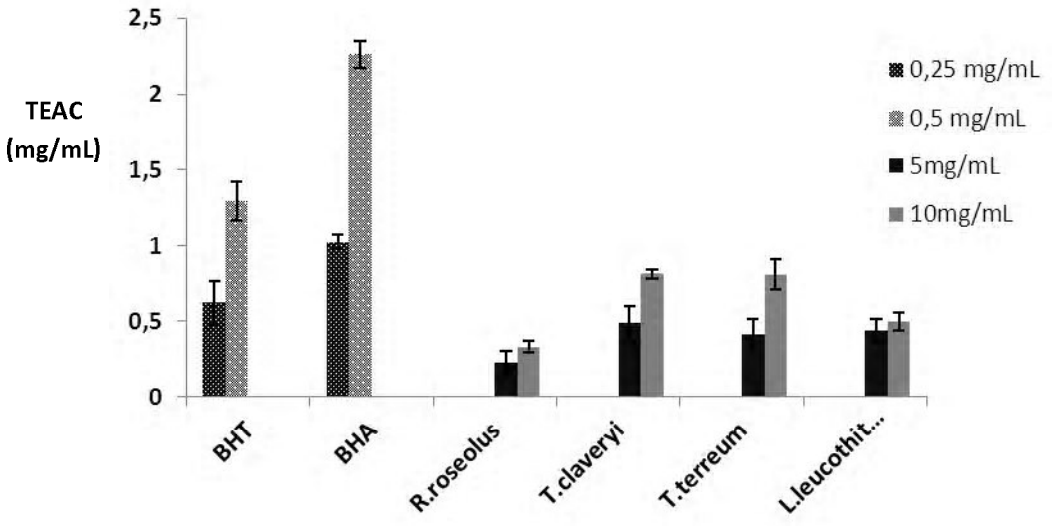
Şekil 4.3. Polisakkarit özütlerin HPLC kromotogramları a)*T.terreum* b)*T.claveryi* c)*R.roseolus* d)*L.leucothites*

4.3. Antioksidan aktivite sonuçları

Bu çalısmada *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus* ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin DPPH· radikalini süpürme ve ABTS· katyonu renk giderimi metoduna göre antioksidan etkileri belirlenmiştir.

DPPH· metoduna göre fungal polisakkarit özütlerinin antioksidan aktivitesi çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 10 mg/mL'de herhangi bir aktivite göstermemiştir.

ABTS· metoduna göre de mantarlardan elde edilen polisakkarit özütlerinin hepsi doza bağlı olarak artan bir aktivite göstermektedir. 5 mg/mL konsantrasyondaki polisakkaritlerin ABTS· süpürücü aktiviteleri kendi aralarında, *T.claveryi* > *L.leucothites* > *T.terreum* > *R.roseolus* şeklinde 10 mg/mL konsantrasyondaki polisakkaritlerin ABTS· süpürücü aktiviteleri *T.claveryi* > *T.terreum* > *L.leucothites* > *R.roseolus* şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 ABTS· metoduna göre antioksidan aktivite (n=3, TEAC: Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite, BHA: Bütillenmiş Hidroksi anisol, BHT: Bütillenmiş Hidroksi toluen)

T. terreum, T. claveryi, R. roseolus ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin toplam fenolik içerikleri sırasıyla 29,77±0,55, 49,26±0,93, 33,88±0,47 ve 31,32±2,14 mgGAE/g ekstre ve toplam flavonoit içerikleri sırasıyla 9,75±0,45, 17,02±0,18, 23,28±2,54 ve 16,93±0,05 mgRE/g ekstre olarak bulunmuştur (Tablo 4.3.)

Tablo 4.3. Fungal polisakkarit özütlerinin toplam fenol ve flavonoit içerikleri (n=3)

	Toplam fenol [mgGAE/g ekstre]	Toplam flavonoit [mgCE/g ekstre]
L.leucothites	31,32±2,14	16,93±0,05
T.claveryi	49,26±0,93	17,02±0,18
T.terreum	29,77±0,55	9,75±0,45
R.roseolus	33,88±0,47	23,28±2,54

GAE: Gallik asite eşdeğer, CE: Kateşine eş değer

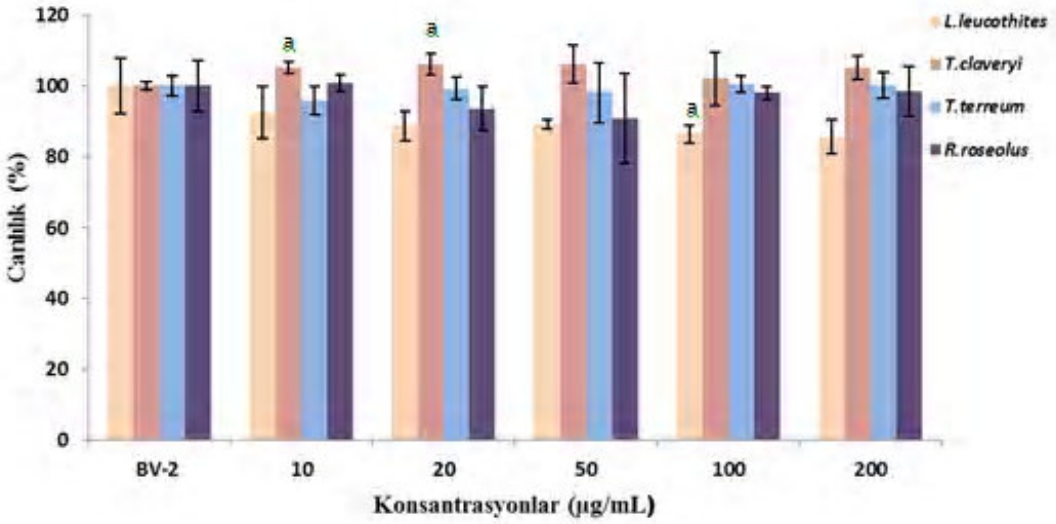
4.4. Antiinflamatuar aktivite sonuçları

4.4.1.Sitotoksik etkinin MTT sonuçları

Mitokondriyal fonksiyonunu sürdüren hücrelerde MTT redüksiyonunun gerçekleşmesi esasına dayanan MTT analizi, hücre canlılığının bir göstergesidir. BV-2 hücre hattında fungal polisakkarit örneklerinin çeşitli konsantrasyonlardaki MTT indirgenme değerleri ve kontrol grubuna göre MTT indirgenmesinin değişimi Tablo 4.4'de verilmiş olup gruplar arası farklılıklar Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Çalışmaların inflamasyon aşamaları sitotoksik etkinin en düşük olduğu en yüksek konsantrasyon olan 200 µg/mL ve ortalama bir konsantrasyon değeri olan 50 µg/mL konsantrasyonlarda gerçekleşmiştir.

Tablo 4.4. Mantarlardan izole edilen polisakkaritlerin hücre canlılığı üzerine etkileri (Ortalama ± SH (n=3)

	% Hücre Canlılığı					
Konsantrasyonlar (µg/mL)	**BV-2**	**10**	**20**	**50**	**100**	**200**
L.leuchothites	100±7,93	92,65±7,29	88,78±4,15	89,30±1,27	86,51±2,51	85,56±4,81
T.claveryi	100±1,27	105,03±1,67	106,08±2,98	106,08±5,42	102,01±7,45	105,03±3,31
T.terreum	100±2,78	95,77±3,91	99,25±3,08	98,05±8,56	100,46±2,19	100,04±3,65
R.roseolus	100±7,28	100,77±2,26	93,53±6,14	90,76±12,63	98,04±1,84	98,40±7,01

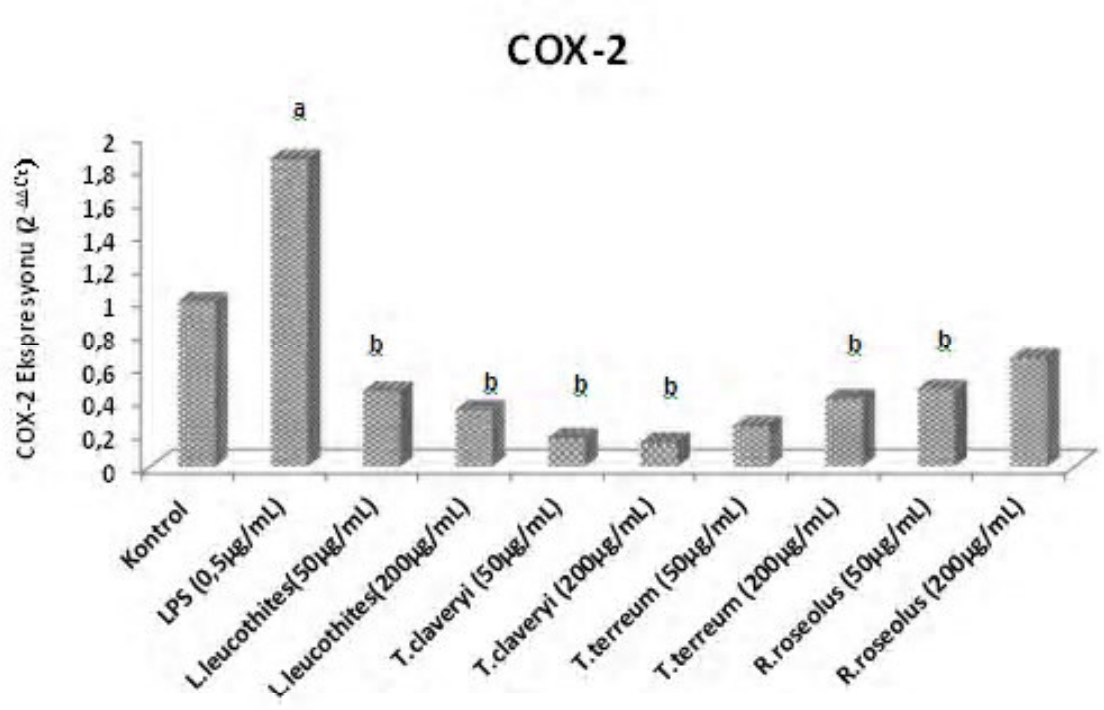


Şekil 4.5. Polisakkarit örneklerindeki MTT redüksiyonunun kontrol grubuna göre % değişimleri (Ortalama ± SH).

[a]$p<0,05$; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

4.4.2.COX-2 ve iNOS genlerinin mRNA ifadelenme düzeyleri

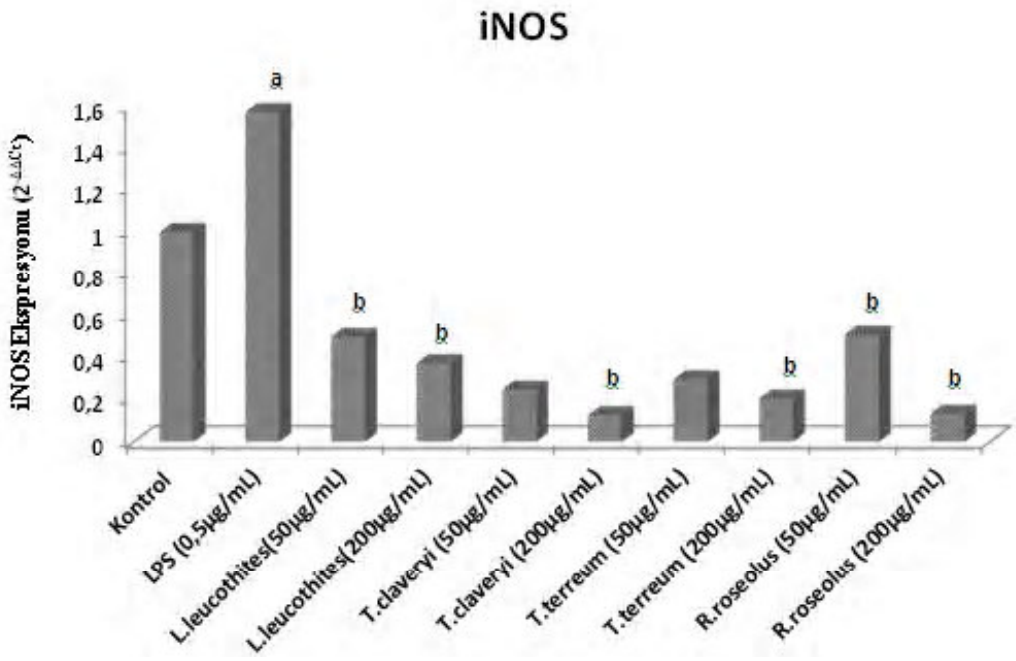
Hücre içi sinyal yolaklarından MAPK inflamasyonda LPS ile aktive edildiğinde iNOS ve COX-2 genlerinin ifadelenme düzeylerini artırır. İnflamatuar hastalıklarda bu iki genin ifadelenmesi artar. COX-2 ve iNOS genlerinin fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki ifadelenme düzeyleri ve gruplar arasındaki farklılıklar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Sonuçlar β-aktin ile normalize edilmiştir.



Şekil 4.6. Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki COX-2 ifadelenme düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı

[a]$p<0,05$; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]$p<0,05$; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

COX-2 gen ifadelenmesi LPS uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre 1,86 kat artması inflamasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Fungal polisakkaritlerin varlığında ise COX-2 ifadelenmenin azaldığı Şekil 4.6'da görülmektedir. İnflamasyonda artış gösteren COX-2 geninin ifadelenmesini en çok baskılayan fungal polisakkarit *T.claveryi* türüne ait polisakkarit özütlerde görülmüştür. *T.terreum* (50 µg/mL) ve *R.roseolus* (200 µg/mL) türlerine ait polisakkaritler de COX-2 gen ifadelenmesini azaltmıştır fakat istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



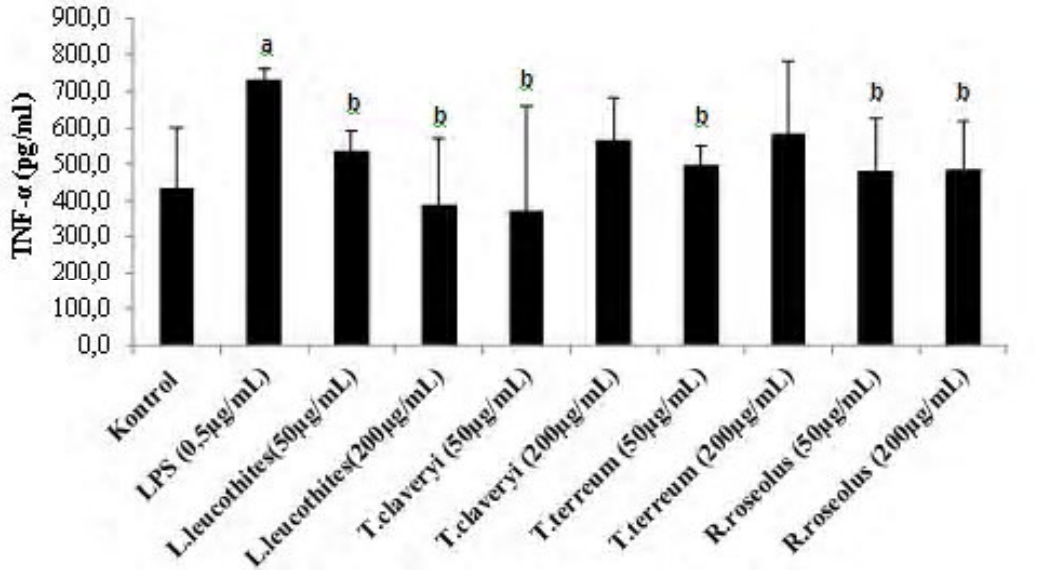
Şekil 4.7. Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki iNOS ifadelenme düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dağılımı

[a]$p<0,05$; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]$p<0,05$; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

iNOS gen ifadelenmesi LPS indüklü hücrelerde kontrol grubuna göre 1,57 kat artması bu genin ifadelenmesinin inflamasyonda arttığını göstermektedir. Fungal polisakkaritlerin varlığında ise iNOS ifadelenmesinin azaldığı Şekil 4.7'de görülmektedir. iNOS geninin ifadelenmesini en çok baskılayan fungal polisakkarit yine *T.claveryi* türüne ait özütlerde görülmüştür. Bunu *R.roseolus* ve *T.terreum* mantarlarına ait polisakkarit özütler izlemektedir.

4.4.3.Proinflamatuar sitokin miktarları

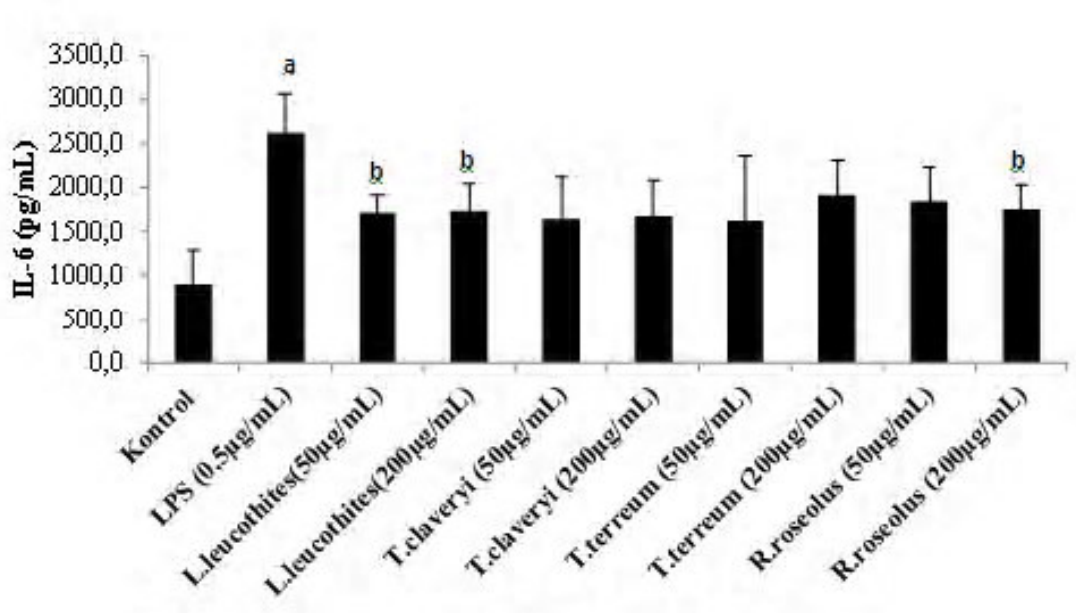
İnflamatuar süreçte makrofajlardan (BV-2 mikroglial hücreleri) sitokin salınımı karakteristiktir. Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki proinflamatuar sitokin düzeyleri ve örnekler arasındaki farklılıklar Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki TNF-α üretim düzeylerinin dağılımı (n=3)

[a]$p<0,05$; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]$p<0,05$; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Mikroglia hücresinin LPS ile muamele edilerek inflamasyonun indüklendiği hücrelerde TNF-α üretiminin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Mikroglia hücrelerine mantarlardan elde edilen polisakkarit özütlerin ön muamelesi sonrası LPS uygulanması, LPS'nin TNF-α üretimini arttırıcı etkisini baskıladığını açıkca göstermektedir. (Şekil 4.8.) TNF-α düzeyleri kontrol grubuna kıyasla mantarlardan izole edilen polisakkaritlerin muamele edilmediği hücrelerde yüksek miktarda artış göstermiştir. Fakat polisakkarit içeren hücrelerde ise LPS grubuna kıyasla azalış göstermiştir. TNF-α miktarı kontrol grubunda 519,30± 81,25 pg/mL iken bu değer *L.leucothites* (200µg/mL) ve *T.claveryi* (200µg/mL) türlerine ait polisakkaritlerde sırasıyla 283,00 ± 11,00 pg/mL ve 499,70 ± 18,75 pg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Fungal polisakkaritlerin LPS indüklü BV-2 hücrelerindeki IL-6 üretim düzeylerinin dağılımı (n=3)

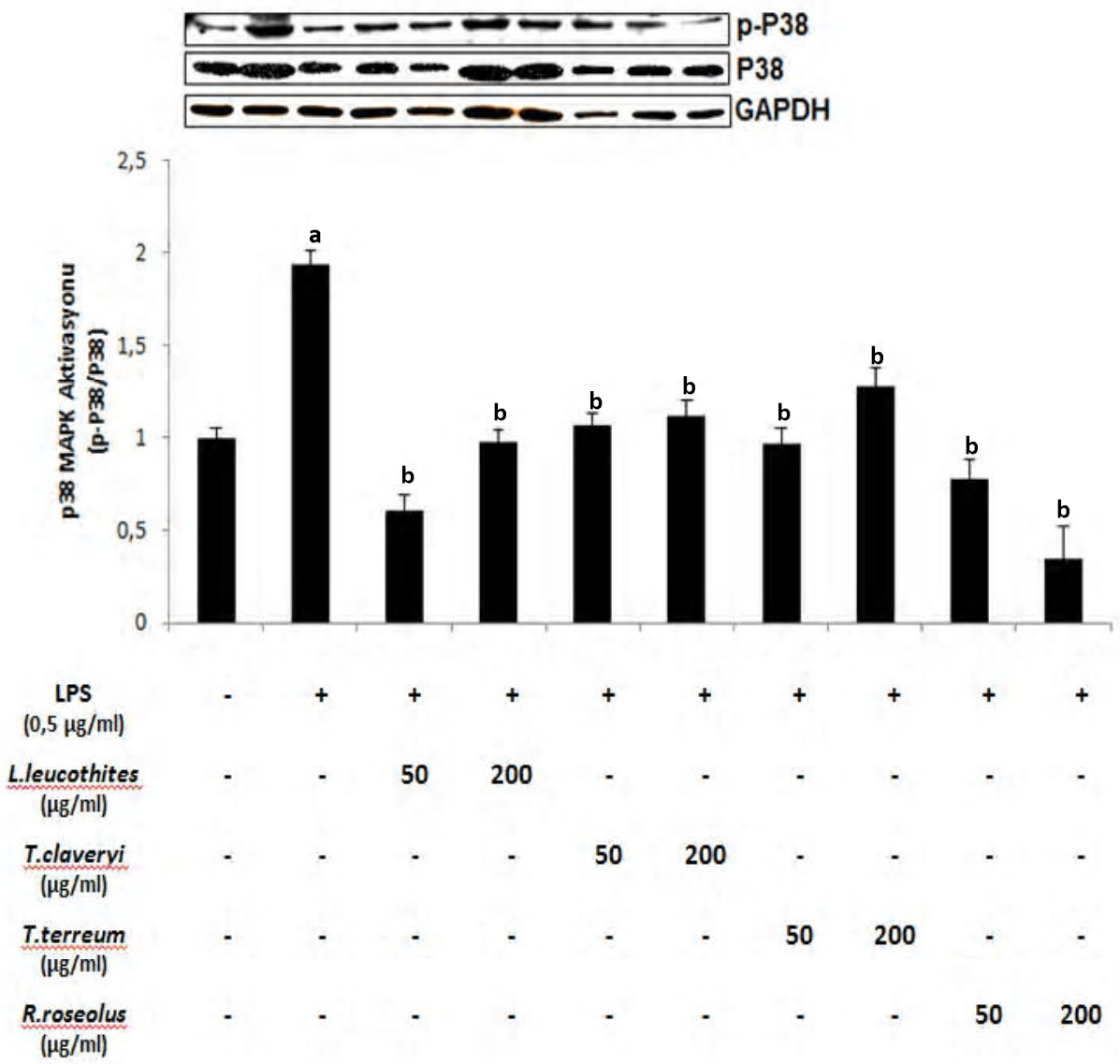
[a]p<0,05; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]p<0,05; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Mikroglia hücresinin LPS ile muamele edilerek inflamasyonun indüklendiği hücrelerde IL-6 üretiminin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (p<0,05). Mikroglia hücrelerine mantarlardan elde edilen polisakkarit özütlerin ön muamelesi sonrası LPS uygulanması, LPS indüklü IL-6 üretimini baskıladığını açıkca göstermektedir. (Şekil 4.9). IL-6 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla mantarlardan izole edilen polisakkaritlerin muamele edilmediği hücrelerde artış gösterirken polisakkarit içeren hücrelerde ise LPS grubuna kıyasla azalış göstermiştir. IL-6 miktarı kontrol grubunda 110,50±157,50 pg/mL iken kontrole en yakın değer *T.claveryi* (200µg/mL) özütünde tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

4.4.4. P38 ve ERK1/2 protein düzeyleri

Western blot yöntemiyle p38 ve ERK1/2 proteinlerinin miktarları saptanmıştır. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. İlgili proteinlere ait bantların kantitasyonu yapılarak gruplar arasındaki farklılıklar ölçülmüştür. Fungal polisakkaritlerin LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattına ait ilgili proteinlerin düzeyleri, western blot görüntüleri

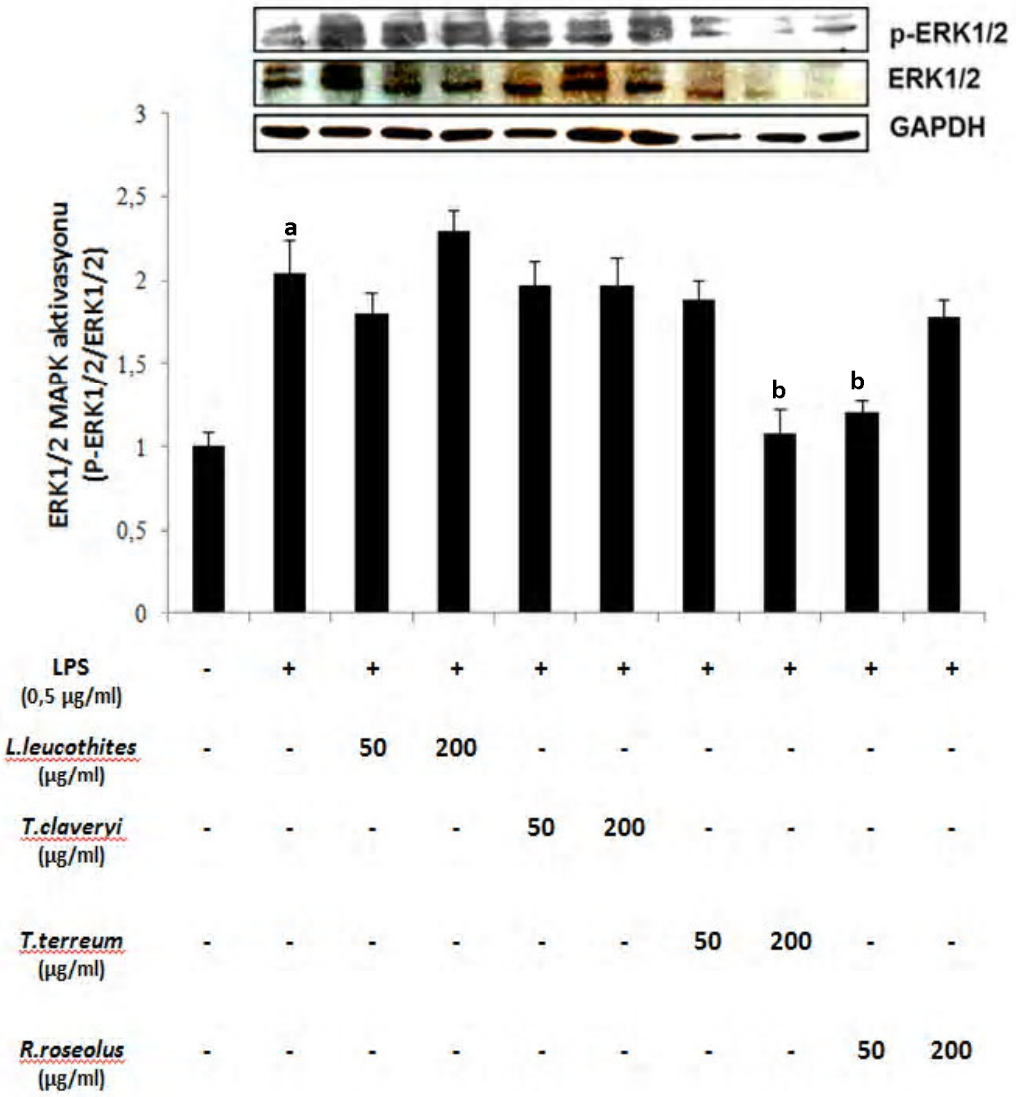
ve gruplar arasındaki farklılıklar Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Fungal polisakkaritlerin LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında p38 proteinlerinin Western Blot görüntüleri ve protein düzeyleri (n=3)
[a]p<0,001; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]p<0,001; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

İnflamasyon esnasında ifadelenmesinin artması beklenen p38 ve ERK1/2'in Western Blot analiz sonuçlarına bakıldığında p38 miktarı LPS verilmeyen kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,93 kat artış gösterirken çalışılan tüm mantar örnekleri p38 üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermiştir. *R.roseolus* (200µg/mL) mantarına ait polisakkarit özütü p38 aktivasyonunu önemli derecede azaltmıştır. Bunu *L.leucothites* ve *T.terreum*

mantar polisakkaritleri izlemektedir.



Şekil 4.11. Fungal polisakkaritlerin LPS ile indüklenen BV-2 hücre hattında ERK1/2 proteinlerinin Western Blot görüntüleri ve protein düzeyleri (n=3)
[a]p<0,001; Kontrol grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.[b]p<0,001; LPS grubu ile polisakkarit örnekleri arasında anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir.

ERK1/2 aktivasyonu kontrol grubuna kıyasla LPS indüklü hücrelerde artarken *L.leucothites* (200µg/mL) polisakkarit özütü hariç diğer türlere ait polisakkarit özütlerinde azalma göstermiştir. ERK1/2 aktivasyonunu en yüksek inhibe eden *T.terreum* (200µg/mL) mantarına ait polisakkarit özütünde gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Makromantarların biyolojik ve farmakolojik etkileriyle ilgili çalışmaların çoğu antimikrobiyal, antitümöral ve immunmodülatör etkileri üzerinedir. Sağlık sıvısı olarak bilinen *Ganoderma lucidum*'un Çin'de 1973'den beri kültüre alınarak klinik uygulamalarda şurup, iğne, tablet ve panzehir olarak kullanılması bir başka tür olan *Trametes versicolar*'ın içeriğinde bulunan proteoglukanların yüksek antikansorejen etkisi sayesinde Japonya'da gastrointestinal kanserlerde ilaç olarak kullanılması, ticari olarak değerli bazı metabolitleri bünyelerinde toplayan mantarlara olan ilginin Dünya da giderek artmasına neden olmuştur (108,109).

Fungal polisakkaritler, hem hücre duvarının bir parçası olan ve enerji deposu olarak hizmet eden, hem de ekstrasellüler hücre korunmasını sağlayan mekanizmalardan sorumlu biyopolimerlerin geniş bir grubunu oluşturmaktadır. Asya ülkelerinde pekçok mantar türünün sağlığı destekleyici özellikleri yüzyıllardır bilinmesine rağmen, mantar özütlerinin farmasötik özellikleri ve uygulamaları ile bunların biyolojik aktivite mekanizmaları özellikle antikanser terapileri ve immün sistem stimülasyonundaki önemli rolleri ve bunların yanı sıra kemo/radyo-terapiye karşı profilaktik aktiviteleri, antimikrobiyal etkileri ve hiperglisemi ve hiperkolesterolemiyi önleyici ve düzenleyici potansiyelleri son yıllarda incelenmeye başlanmıştır. Bu çarpıcı özelliklerine ek olarak toksik olmayan bu biyopolimerler yeni fonksiyonel gıdalar ve nutrisötiklerin gelişimi için ideal bileşikleri sunmaktadır. Fungal glukanların çoğu doğal katil hücreler, T hücreleri, dendritik hücreler, monositler ve nötrofillerin mitojenik aktivitesini içeren, immunoglobulin ile sitokinlerin ifadelenmesini ve fagositozu artıran mekanizmaların kombinasyonu sonucu immun uyarıcı ve antitumör aktivite gösterir (209-212).

Çalışmamızda *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus* ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin toplam şeker içerikleri sırasıyla 0,44±0,05, 0,47± 0,09, 0,43±0,05 ve 0,29±0,04 mg/mL olarak bulunurken kantitatif HPLC analiz sonuçlarına göre, toplam kaba polisakkarit kütlesindeki % D-glukoz ve % fruktoz içeriği *T.terreum* için sırasıyla %12,80 ve %8,94, *T.claveryi* için sırasıyla %14,71 ve %7,36, *R.roseolus* için %7,4 ve %7,46 son olarak *L.leucothites* için %7,22 ve %6,65 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Toplam şeker ve HPLC sonuçlarına göre çalışılan mantar türlerinin D-glukoz ve fruktoz içeriği polisakkarit özütlerin immun uyarıcı olarak bilinen heteroglikan ihtiva ettiğini göstermektedir. *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus* ve *L. leucothites* polisakkaritlerinin toplam protein miktarı ise sırasıyla 0,12±0,01, 0,42±0,01, 0,28±0,05 ve 0,24±0,04 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.2). Çalışılan mantar türlerine ait literatürde geçen araştırmalara göre mantarların sahip olduğu protein miktarı bizim bulgularımızdan daha fazladır. Bu değerler bize deproteinizasyonun gerçekleştiğini göstermekte fakat belirli bir miktarda protein bulaşmasının varlığını göstermektedir. Perez-Gilabert et al, *T. claveryi* mantarının toplam protein miktarını 36 mg olarak tespit etmişlerdir (213). *T. claveryi* türüne ait bir diğer çalışmada %16 protein ihtiva ettiği bildirilmiştir (214). Başka bir çalışmada *T. anatolicum* mantarının %97'sinin protein içerdiği rapor edilmiştir (215).

Çin, Japonya ve Kore'de yapılan çalışmalar fungal polisakkaritlerin insanlar üzerindeki terapötik etkilerini göstermektedir. *Lentinula edodes, Ganoderma lucidum, Schizophillum commune, Sclerotinia selerotiorum, Fomes fomentariu*s gibi mantarlar geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Fungal kaynaklı polisakkarit olan lentinan, Shiitake mantarı olarak bilinen *Lentinus edodes* veya *Lentinula edodes* mantarından izole edilmiştir. Benzer yapıda olan bir diğer polisakkarit schizophyllan (şizofilan), yine yenilebilir bir mantar olan *Schizophyllum commune*'den izole edilmiştir. Bu polisakkaritlerin her ikiside β-(1,3)- D-glukan yapısında en iyi bilinen immunomodulatörlerdir (209,212).

Agaricus blazei mantarından izole edilen polisakkaritler, glukoz, galaktoz ve mannoz ile glukoz, riboz ve ksiloglukandan oluşan iki grup immun uyarıcı heteroglukan ihtiva eder (216).

Mantar polisakkaritleri, glikosidik bağlarla biribirine bağlı D-glukoz monomerlerinden oluşan (1-3), (1-6) β-glukan ya da (1-3) α-glukanlardan oluşan heteroglikan ihtiva eder

(88). *P. tuber-regium, G.lucidum, A. auricula, S. commune, I. obliquus, G. applanatum, P. umbellatus, C. caespitosus, Tramella fuciformi, Omphalia lapidescens, P. linteus, P. vericulosa, T. mongolium* mantarlarına ait polisakkarit özütlerin glukan yapısında olduğu, *G. frondosa* özütlerinin temel yapısının glukoz, mannoz ve galaktoz, *H. erinaceus* özütlerinin mannoz ve glukoz, *A. blazei* özütlerinin ise riboz ve glukoz monomerlerinden oluştuğu literatürde rapor edilmiştir (108).

Smiderle et al. (217) *A. bisporus* mantarına ait polisakkarit özütünün %90'dan daha fazla α-glukan içerdiğini rapor etmişlerdir. Çeşitli mantar türlerinin polisakkarit içeriklerinin belirlendiği başka bir çalışmada farklı polisakkarit özütlerinin glukan içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. Toplam glukan miktarı *A. bisporus* için % 63,80 *A. brasiliensis* için % 40,10, *P. linteus* için % 20,80 ve *G. lucidum* için % 24,50 olarak verilmiştir. Toplam protein içerikleri ise sırasıyla % 0,90, % 7,30, % 5,70 ve % 2,60 olarak verilmiştir. Yine aynı çalışmada *A. bisporus*'un polisakkarit özütlerinin HPLC analiz sonuçlarına göre *A. bisporus*'un %85'den daha fazla glukoz, %4 fukoz ve az miktarda galaktoz ve ksiloz içerdiği rapor edilmiştir (209).

Fungal polisakkaritlerin tümör hücrelerine, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara ve inflamasyona karşı bağışıklık sisteminin spesifik olmayan reaksiyonlarını tetikleyici bir beceriye sahip olduğu Lindequist et al. (11) tarafından bildirilmiştir. Ek olarak bazı uygulamalarda kolesterolü ve kan şekerini düşürdüğü, antioksidan ve serbest radikal süpürücüler gibi davranarak hepaprotektif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (109).

Makromantarlar gıda olarak tüketilmelerinin yanında antioksidan özelliğe de sahiptirler. Mantarların antioksidan etkisinin çeşitli biyoaktif ikincil metabolitlerin, uçucu bileşiklerin, bazı fenoller, gallik asitler, serbest yağ asitleri ve bunların türevlerinin varlığından kaynaklandığı söylenebilir (218,219). Piyasada bulunan pek çok mantar polisakkaritinin çeşitli fenolik bileşikler içerdiği bildirilmiştir. Bu polisakkarit özütlerinin serbest radikal indirgeyici etkileri ile içeriklerindeki fenoller arasında istatiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (209).

Çalışmada antioksidan aktivitenin in vitro ölçümü için antioksidan etkinin farklı seviyelerine karşılık gelen farklı metotlar kullanılmıştır. Polisakkaritlerin toplam fenolik ve flavanoit içerikleri, radikal giderici etkisi için DPPH• serbest radikal süpürücü etkisi ve $ABTS^{\cdot}$ metotları kullanılarak araştırılmıştır. Mantarlara ait polisakkaritlerin en yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoit içerikleri sırasıyla *T.claveryi* (49,26±0,93

mgGAE/g ekstre) ve *R.roseolus* (23,28±2,54 mgRE/g ekstre) mantarlarına ait polisakkaritlerde tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Hamza et al. (220), *T. boudieri* mantarının çeşitli çözücülerle hazırlanan özütlerinin toplam fenolik içeriklerini metanol özütü için 159,67, petrol eteri özütü için 137,22 etil asetat özütleri için ise 108,35 mgGAE/g ekstre olarak toplam flavonoit içeriği sırasıyla 96,18, 46,18 ve 95,12 mg CE/g olarak rapor etmişlerdir. *T. terreum*'un çeşitli özütlerine ait toplam fenolik içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada etilasetat özütünün 128,7 µg/mg hekzan özütünün 112,1 µg/mg toplam fenolik içeriğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir.(135). Ayrıca bu mantar türlerine ait çeşitli çözücülerle hazırlanan özütlerin antioksidan kapasiteye sahip olduğu pek çok literatürde belirtilmiştir (5,6,132,135,220).

Çalışmada serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH·'ın %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (IC_{50}) hesaplanmıştır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir (216). Bu çalışmada *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus* ve *L. leucothites* poliakkaritlerin DPPH·radikali süpürücü etkileri 1–10 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak kateşin kullanılmıştır. Polisakkaritlerin çalışılan en yüksek konsantrasyonuda (10 mg/mL) dahil olmak üzere DPPH·radikalini giderici etkisi tespit edilememiş ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. $ABTS^{\cdot}$ inhibe edici etkisi ise 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda çalışılmış ve çalışılan dört polisakkarit özütü içinde en yüksek inhibisyon aktivitesi *T.claveryi*, en düşük etki ise *R.roseolus* polisakkaritlerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Antioksidan etkinin zayıf çıkmasının nedeni polisakkarit özütlerin serbest radikalleri indirgeyici bir aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir. Bu zayıf etkinin polisakkaritleri oluşturan monosakkarit kompozisyonu ile ilişkili de olduğu söylenebilir.

Kozarski et al. (209), glukan ve nonglukan polimerlerin monosakkaritlerden daha iyi serbest radikal süpürücü etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Karbohidrat polimerlerin antioksidan etkisi ile molekül ağırlığı ve polimer dallanma derecesi arasında bir korelasyon olmadığını, bu etkinin polimerlerin monosakkarit içeriği ile bir ilişkisi olduğunu ifade etmişlerdir. Monosakkaritlerden anomerik hidrojenin ayrılması, zayıf serbest radikal giderici etki göstermelerine neden olur. Monosakkarit birimlerin indirgeyici ucundan ziyade iç monosakkaritlerinden bir anomerik hidrojenin ayrılması bu polimerlerin antioksidan aktivitelerini artırmasına neden olur. Kozarski et al. (209), antioksidan aktivitenin karbohidrat konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Polisakkaritler çalışma konumuzu oluştursa da polisakkarit elde ettiğimiz türlerin yüksek oranda antioksidan özellik ve fenolik bileşikler ihtiva etmeleri bizim özütlerimize de bu bileşenlerin bulaşma ihitimaline karşı ve antiinflamatuar etkinin bu bileşenlerden kaynaklanıp kaynaklanmayacağı düşünülerek toplam fenolik ve flavonoit içerik araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre polisakkarit özütlerde tespit edilen zayıf antioksidan etkinin fenolik içerikten kaynaklandığı söylenebilir. Özütlere bulaşan fenolik ve flavonoit bileşiklerin eser miktarda tespitinin inflamasyon üzerine bir etkisi yoktur.

Başka bir çalışmada, *T. terreum* mantarının hekzan özütünün 0,80 mg/mL konsantrasyonda DPPH·radikali giderici etkisi % 46,40±0,60 olarak bulunurken bu mantarın metanol özütünün ABTS· inhibe edici etkisi ise % 88,40±0,50 olarak tespit edilmiştir (135).

Terfezia boudieri mantarının etanol özütünün 1,00-10,00 mg/mL değişen konsantrasyonlarda DPPH·radikali indirgeyici özelliğinin tespit edildiği bir çalışmada konsantrasyon arttıkça DPPH·radikali gideriminin % 36,62'den % 92,21' e doğru keskin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. 10 mg/mL konsantrasyonda BHA ve α-tokoferol'un %94,70 ve %95,76 oranlarında DPPH·radikali indirgeyici kapasitesi bulunmuştur. Sonuçlar *T. boudieri* mantarının yüksek serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (221).

Leucoagaricus cinsine ait başka bir tür olan *L. pudicus* mantarı ile yapılan bir diğer çalışma da bu mantarın radikal giderici kapasitenin 20 mg/mL'de %64 olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu mantarın 10 mg/mL konsantrasyonda %90,10 oranında lipit peroksidasyonunu önleyici kapasitesini ortaya koymuşlardır (222).

Kalyoncu ve ark. (223), *R. roseolus* mantarının kloroform, su ve etanol özütünün 1 mg/mL konsantrasyonda DPPH· ve ABTS· indirgeyici kapasitesini araştırmışlar ve her özüt için sırasıyla DPPH· indirgeme potansiyeli %10,75, %35,38 ve %32,22, ABTS· radikali inhibisyonu %20,05, %71,76 ve %83,13 olduğunu rapor etmişlerdir.

Dündar ve ark. (221), *T. boudieri* mantarının ethanol özütünün çeşitli konsantrasyonlarda (0,5-10,0 mg/mL), test edilen diğer standartlarla karşılaştırıldığında yüksek oranda oksidatif strese karşı linoleik asit önleyici kapasitesini tespit etmişlerdir. Mantarın toplam antioksidan aktivitesi %87,68 olarak bulunurken standart olarak

kullanılan Trolox %74,73, BHA %65,62, BHT %62,45 ve α-tokoferol %47,44 olarak bulunmuştur.

Mantarların DPPH süpürücü etkilerinin olduğu literatürde ifade edilmektedir. Fakat çalışılan mantarların polisakkarit özütlerinde DPPH süpürücü etki tespit edilmezken *T. terreum, T. claveryi, R. roseolus, L. leucothites*'in polisakkarit özütlerinin ABTS· süpürücü etkileri 10 mg/mL konsantrasyon için sırasıyla 0,81±0,16, 0,82±0,12, 0,33±0,04, 0,50±0,05 mg/mL tespit edilmiştir.

Mantarlara ait fenolik içerik, DPPH ve ABTS· çalışmaları pekçok literatürde yer almasına rağmen fungal polisakkaritlerin toplam fenolik ve flavanoit içeriklerine, DPPH ve ABTS· süpürücü etkilerine ilişkin çalışmalara rastlanılmamıştır. Farklı türlere ait mantarların çeşitli çözücülerle hazırlanan özütleri ile karşlaştırıldığında çalışmada elde edilen bulgulara göre çalışılan polisakkarit özütlerinin ABTS· süpürücü etkiye ve toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriğe sahip olduğu fakat bu etkinin zayıf olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda polisakkarit özütlerin nöroinflamasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Polisakkarit özütler tarafından kronik inflamasyonu tetikleyici olarak bilinen proinflamatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF-α üretiminin ve normal şartlarda vücutta üretilmeyip sadece inflamasyon anında eksprese olan proinflamatuar proteinlerden COX-2 ve iNOS'un mRNA düzeylerinin baskılanıp baskılanmadığı ve inflamatuar yanıtta önemli bir sinyal iletim yolağı olan MAPK'da yer alan ve inflamatuar sinyal ile tetiklenen p38 ve ERK1/2 sinyal kaskadını inhibe edip etmediği araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan makromantarlardan izole edilen heteropolisakkaritlerin LPS indüklü mikroglial hücrelerde IL-6 ve TNF-α salınımını, COX-2 ve iNOS ifadelenmesini azaltarak inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. LPS ile muamele edilmeyen BV-2 hücrelerinde IL-6 miktarı 110,50 pg/mL bulunmuşken, hücrelerin LPS ile indüklenmesi sonucu IL-6 miktarı 2874,00 pg/mL olarak hesaplanmıştır. *T. claveryi* (200µg/mL) mantarına ait özütün BV-2 hücrelerinde IL-6 üretimini en fazla baskılayan polisakkarit olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlara göre dört fungal polisakkaritte proinflamatuar sitokin olan IL-6'yı farklı düzeylerde inhibe etmiştir (Şekil 4.9). TNF- α miktarları ise kontrol grubunda (LPS ile indüklenmemiş hücreler) 519,30 pg/mL, LPS grubunda 714,50 pg/mL olarak bulunurken en yüksek TNF- α inhibisyonu *L. leucothites* (200µg/mL) mantarına ait polisakkaritte 283,00 pg/mL olarak

hesaplanmıştır. Dört fungal polisakkaritte proinflamatuar bir sitokin olan TNF- α'yı inhibe etmiştir (Şekil 4.8). COX-2 ve iNOS genlerinin mRNA ifadelenme düzeyleri çalışmalarında ise COX-2 salınımı kontrol grubuna kıyasla LPS 'li hücrelerde 1,86 kat artarken bu değer mantar polisakkariti uygulanmış hücrelerde azalmıştır. COX-2 salınımını en yüksekten en düşüğe inhibe eden polisakkarit özütler ise sırasıyla *T.claveryi, T.terreum, L.leucothites, R.roseolus* mantarlarına aittir (Şekil 4.6). iNOS salınımı ise LPS'li grupta 1,57 kat artarken fungal polisakkaritlerde iNOS salınımı 1,96-7,93 kat arasında azalmıştır. En yüksek inhibisyon *T.claveryi* (200µg/mL) ve *R.roseolus* (200µg/mL) mantarlarında görülmüştür (Şekil 4.7). Genel olarak analiz sonuçları antiinflamatuar aktivitenin polisakkarit konsantrasyonuna bağlı arttığını göstermektedir.

İmmün düzenleyici bir bileşik olan ve mantarlardan izole edilen β-glukanlar az sayıda 1,6 β bağlı dallar ile 1,3 β bağlı glikopiranosil kalıntılarından oluşmuştur. β-glukanın bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi ile ilgili çok sayıda literatürde bu etkinin makrofaj ve nötrofillerin fonksiyonel aktivitesini artırarak meydana geldiğini belirtmektedir (224,225). T-lenfositler üzerinde bu hücrelerin çoğalmasını sağlayan bir β- glukan reseptörü olan Dectin-1 bir (226). β-glukana karşı olan hücresel yanıtta aracılık eder. Glukan bu reseptöre bağlanarak makrofaj aktivasyonunu düzenleyici etki gösterir. Ayrıca yangı sonrası sitokinlerin üretilmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir (224,227). β-glukanın, insan monositleri ve fare makrofajlarından IL-1, TNF-α ve prostaglandin E2 üretimi üzerinde uyarıcı olduğu gösterilmiştir (228). Ayrıca β-glukanın CD8+T hücrelerin reseptörlerine bağlanmasını engellemesiyle IL-10 düzeylerinde azalış gösterdiğini de açıklamışlardır (99,229). β-glukanın proinflamatuar sitokin üretimini stimüle etmeden, özellikle nötrofil ve makrofajların mikrobisidal etkilerini artırdığı bildirilmiştir (230). Yapılan literatür taramasına göre β-glukanın yüksek derecede immünomodulatör etkisinin olduğu pekçok çalışmada rapor edilmiştir (99,102,224-232). Çalışmamızda bu bilgilerle uyum göstererek polisakkarit grubu hücreleri ile kontrol grubu arasında IL-6 ve TNF-α düzeyleri arasında bir fark gözlenmezken LPS grubu içeren hücrelere göre anlamlı olarak azalış göstermiştir.

A. bisporus, Boletus edulis, Cantherellus cibarius, Cratarellus cornucopioides, Lactarius deliciosus ve *P. ostreatus* mantar türleriyle yapılan bir çalışmada, LPS ile uyarılmış murin makrofaj hücre hattı RAW 264,7'de iNOS, IL-1β ve IL6 'nın gen

ifadelenmesini bastırarak inhibe ettiği rapor edilmiştir *C. cornucopioides* mantarının ise sadece NO üretimini ve iNOS gen ifadelenmesini inhibe ettiği bildirilmiştir (173).

Antrodia camphorata (25– 100 µg/mL) mantarının, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin LPS (1µg/mL) ile muamelesi sonucu iNOS ve COX-2 ifadelenmesi üzerine etkisinin gösterildiği bir araştırmada, *A. camphorata* mantarı RAW 264.7 hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda (0, 25, 50 ve 100 µg/ mL) ön muamele edildikten sonra hücreler 18 saat LPS ile inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda iNOS ve COX-2 miktarlarının belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (233).

Zhang et al. (177), Mezensefalon hücrelerinde (MES 23.5) sitokin miktarlarının az olduğu fakat LPS (0.25 μg/mL) ile indüklendikten sonra bu hücrelerdeki TNF-α ve IL-1β miktarının 6-11 kat arttığını tespit etmişlerdir. *G.lucidum* mantarına ait metanol özütünün (50–400 µg/mL) bu hücrelerdeki TNF-α ve IL-1β salınımının azalttığını rapor etmişlerdir.

A. bisporus, A. brasiliensis ve *P. linteus* mantarlarının meyvelerinden ve *G. lucidum*'un sporlarından elde edilen polisakkaritlerin insan periferal kan mononükleer hücrelerinde (Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)) bağışıklık sistemini ve IFN-γ sentezini uyarıcı bir etkiye sahip olduğu literatürde bildirilmiştir. *A. bisporus, A. brasiliensis* ve *G. lucidum*'un polisakkarit özütlerinin proinflamatuar, *P. linteus*'un polisakkarit özütünün ise IFN-γ sentezini azaltarak bağışıklık baskılayıcı bir aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir (209).

Bir diğer çalışmada, *L. edodes* basidokarpından, soğuk su ile yapılan özütlemeden elde edilen heteropolisakkaritlerin antiinflamatuar etkisi belirlenmiştir (234).

P. linteus mide ağrısı, inflamasyon, diz artriti, mide-bağırsak bozuklukları, insülinden bağımsız diyabet, lenf hastalıkları ve kanser tedavislerinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. İmmun düzenleyici, nörokoruyucu, antitümör, anti-hepatotoksik, antioksidan, antianjiyogenik ve antiinflamatuar özellikleri önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (235-240). Başka bir çalışmada bu mantarın etanolik özütünün ve proteoglikanlarının farelerde oluşturulan kollojen ile indüklenen artrit ve kroton yağı ile uyarılan kulak ödemi üzerinde antiinflamatuar aktivitesi bulunmuştur (11).

A. blazei'nin glukan ve proteoglukanlarının farklı tiplerdeki sarkoma ve karsinomalı farelerin tedavilerinde çok etkili olduğu ve serum içindeki IFN-γ salınımını artırdığı rapor edilmiştir (241).

Diğer immun uyarıcı biyopolimer olan grifolan, *Grifola frondosa*'dan, bir proteoglukan olan krestin, *Coriolous versicolor* (diğer adı *Trametes versicolor*) mantarından izole edilmiştir ve Asya'da immunostimülatif ilaç olarak piyasaya sürülmüştür (242,243).

G. lucidum ile yapılan bir çalışmada insan monosit hücrelerine (THP-1) 24 saat boyunca LPS uygulanmıştır. Bu uygulama NO üretimini kontrol grubuna kıyasla % 253 uyarmıştır. Bu tip bir uyarıcı etki makrofajlarda iNOS aktivitesini arttırmıştır. Süperoksit anyon seviyesi de LPS ile muamele edilmiş makrofajlarda kontrol grubuna kıyasla % 150 yükseltilmiştir. *G. lucidum* (100 μg/mL) özütü ile muamele edilen makrofajlarda LPS ile uyarılan iNOS gen ifadelenmesi ve NO üretimi azalmıştır. Bu çalışmanın sonucu *G. lucidum* mantarının damar sertliğine karşı terapötik bir etki oluşturabileceğini düşündürtmektedir (244). Bu mantarın meyvelerinden elde edilen biyopolimerler, bağışıklık uyarıcı aktiviteye sahip heteroglukan ve proteoglukanları içerir (245). *G. lucidum* polisakaritlerinin, kimyasal olarak yaralı makrofajlara yönelik profilaktik aktivite gösterdiği literatürde bildirilmiştir (246). Başka bir çalışmada, *G. lucidum* polisakkaritleri ve proteoglukanlarının doza ve zamana bağımlı olarak TNF-α ve IFN-ɣ salınımını önemli derecede arttırdığı ve makrofaj ile T hücrelerinin ifadelenmesini uyardığı gösterilmiştir (247). Bununla birlikte *G. lucidum*'un ham özütlerinde mantarın meyve, misel ve sporlarında bulunan sitotoksik aktiviteleri bilinen terpenoid ve ganoderik asit gibi polisakkarit olmayan türevlerininde bağışıklığı düzenleyici etkilerinini olabileceği bildirilmiştir (248).

G. lucidum ile yapılan başka bir çalışmada ise etanol özütünün LPS ile muamele edilmiş BV-2 mikroglia hücrelerinde sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. BV-2 hücrelerinin LPS ile muamelesinden sonra nitrik oksit (NO), prostaglandin E2 (PGE_2) ve proinflamatuar sitokin üretiminin arttığı gözlenmiştir. *G. lucidum*'un etanol özütünün NO, PGE_2 ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı üretimini azalttığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak NF-κB translokasyonunu ve transkripsiyonunu baskılamıştır (249).

I. obliquus mantarının sulu özütünün erkek BALB/c farelerinde DSS ile indüklenen ülseratif kolit oluşumunu baskıladığı rapor edilmiştir (250). Sulu özütün TNF-α, IL-4 ve STAT1, STAT6'nın gen ifadelenmesini azalttığı tespit edilmiştir. Bu özütün RAW

264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenen TNF-α üretimini, STAT1, pSTAT1, STAT6 ve pSTAT6 ifadelenmelerini engellediğini göstermektedir. Çimlenmiş kahverengi pirinç üzerinde yetiştirilen *I. obliquus*'un (IOGBR) etanol özütü farelerde oluşan ülseratif kolit üzerinde kuvvetli bir etki göstermiştir. IOGBR'nin TNF-α, COX-2, IL-4, IFN-γ gibi proinflamatuar sinyalcileri ve STAT1 ve STAT6 proteinlerinin ifadelenmesini azalttığı bildirilmiştir. Özütler DSS ile indüklenen kolit grubuyla karşılaştırıldığında, inflamasyonda önemli rol oynayan immunoglobulin (Ig) faktörleri; IgE ve IgA'nın dalak ve mezenterik lenf düğümlerindeki gen ifadelenmelerini baskılamıştır. Ayrıca özütler DSS'nin neden olduğu kolonik doku yıkımını da azaltmıştır (251).

Bizim çalışmamızda kullanılan mantar polisakkarit özütlerinin inflamasyona uğratılmış BV-2 hücrelerinde hem proinflamatuar sitokinler olan IL-6 ve TNF-α'yı çalışılan dozlarda farklı düzeylerde inhibe ettiğini hem de inflamasyonda önemli rol oynayan COX-2 ve iNOS genlerinin tarnskripsiyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatür ile uygunluk göstermektedir.

Hücre içi sinyal iletim yolaklarından MAPK aktivasyonu, immün ve inflamatuar yanıtlarda önemli rol oynar. İnflamatuar uyarıcıya yanıtta, proinflamatuar sitokinlerin ve makrofajların aktivasyonuna yol açan bir dizi sinyal kaskadı başlatılır. MAPK sinyal yolağı pekçok proinflamatuar mediyatörlerin ve IL-6, TNF-α gibi sitokinlerin, iNOS ve COX-2 gibi enzimlerin transkripsiyonunun düzenlendiği bir yolaktır. P38 ve ERK1/2, LPS'nin neden olduğu inflamatuar sinyal kaskadlarını tetikleyen önemli mediyatörlerdir. Çalışmamızda, BV-2 mikroglia hücreleri LPS ile muamele edildiğinde, MAPK sinyal iletim elemanlarından ERK1/2 ve p38 proteinlerinin aktivasyonunun arttığı fakat fungal polisakkaritlerde ise bu proteinlerin baskılandığı gösterilmiştir. P38 üzerine en yüksek etki *R.roseolus* (200 mμg/mL) mantarına ait polisakkaritte gözlenmiştir (Şekil 4.10). En yüksek ERK1/2 inhibisyonu *T.terreum* (200 mμg/mL) mantarına ait polisakkarit özütünde bulunmuştur (Şekil 4.11).

Cho et al. (252), *P.linteus* mantarının etanol özütünün hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edilen WB 344 hücrelerini (Sıçan karaciğer epitel hücresi) koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, mantar özütünün p38 ve ERK1/2'yi inaktive ederek MAPK sinyal yolağını durdurduğunu rapor etmişlerdir.

İnsan nazofarengeal karsinom hücre hattı olan CNE1 hücrelerinde *Albatrellus confluens* mantarından izole edilen grifolin'in MAPK sinyal yolağı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ERK1/2 ve ERK5 proteinlerinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir (253).

C. militaris mantarından elde edilen polisakkarit özütün LPS ile indüklenen RAW264.7 hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın western blot analiz sonuçlarına göre ERK, SAPK/JNK ve p38 MAPK üzerinde inhibe edici etkisini rapor etmişlerdir (254).

Yapılan literatür araştırmalarında p38 ve ERK1/2 MAPK sinyal yolağına ait fungal polisakkarit çalışmalarının azlığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle bulgularımızın bu konuda literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

T. terreum, T. claveryi, R. roseolus ve *L. leucothites* makromantar türlerinden izole edilen heteropolisakkaritlerin farmakolojik açıdan incelendiği bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre antioksidan etkinin zayıf olduğu, fakat oldukça iyi potansiyel antinöroinflamatuar etkilerinin varlığı tespit edilmiştir. Çalışılan mantar örnekleri kıyaslandığında *T. claveryi* ve *R. roseolus* mantarlarından elde edilen polisakkarit özütlerin aktiviteleri dikkat çekmektedir. *T. claveryi* polisakkarit özütünden çalışılan diğer türlere göre en yüksek verim ve en yüksek toplam şeker miktarı elde edilmiştir. D-glukoz miktarı en çok yine bu mantar türünde tespit edilmiştir. Ayrıca ABTS· serbest radikal giderimi yine bu mantar türünde bulunmuştur. Bu türe ait polisakkaritler, inflamasyon göstergesi olan ve inflamasyon anında ortaya çıkan COX-2 geninin mRNA ekspresyonunu en fazla baskılayan özütler olmuştur. *R. roseolus* ve *T. claveryi* polisakkarit özütleri ise iNOS genini en çok baskılayan iki mantar türü olarak bulunmuştur. MAPK sinyal yolağı elemanlarından olan ve inflamasyonu tetikleyen p38 protein düzeyleri ise *R. roseolus* polisakkarit özütü varlığında azalmıştır.

Sonuç olarak, *T.terreum, T. claveryi, L.leucothites* ve *R. roseolus* mantarlarına ait heteropolisakkaritlerin, BV-2 hücrelerinde LPS ile uyarılmış iNOS ve COX-2 biyosentezi ile IL-6 ve TNF-α gibi sitokin salınımları ile karakterize edilen nöroinflamatuar yanıtları ve inflamasyonda artan p38 ve ERK1/2 proteinlerinin aktivasyonunu bastırarak antinöroinflamatuar bir etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca LPS ile indüklenen MAPK sinyal yolağının bu polisakkaritler varlığında baskılandığı da belirlenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında çalışılan fungal polisakkaritlerin LPS kaynaklı nöroinflamatuar hastalıkların tedavisinde bir değere

sahip olabileceklerini düşündürtmektedir. Bundan yola çıkarak, zengin bir makromantar florasına sahip olan ülkemizde doğal olarak yetişen bu türlerden elde edilen polisakkaritlerin LPS'nin neden olduğu inflamasyon hastalıkların tedavilerine yönelik yeni ilaçların geliştirilmesinde daha ileri çalışmalara yön vereceğini ve özellikle antiinflamasyon etkisi yüksek olan türlerin biyolojik kökenli ilaç hammaddesi olarak endüstriyel üretimlerinin gerçekleştirilmesi halinde ülke ekonomisine katkı sağlayacağını söyleyebiliriz.

6.KAYNAKLAR

1. Güzeldağ G. Polyporaceae Türlerinde (*Ganoderma spp.*,ve *Trametes spp.*) Üretim ve Biyoteknolojik Optimizasyon Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana 2007: 1

2. Elvin-Lewıs M. Should we be concerned about herbal remedies. J Ethnopharmacol 2001; 75: 141-164

3. Kibar B. Bazı Yenilebilir Ektomikorizal Mantar Türlerinin Kültüre Alınması Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun 2009: 1

4. Wani BA, Bodha RH and Wani AH. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. J Med Plant Res 2010; 4(24): 2598-2604

5. Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms. Food Chem 2009; 113: 9–16

6. Barros L, Baptista P, Correia DM, Morais JS, Ferreira ICFR. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. J Agric Food Chem 2007; 55: 4781–4788

7. Barros L, Baptista P, Correia DM, Casal S, Oliveira B, Ferreira ICFR. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. Food Chem 2007; 105: 140–145

8. Barros L, Venturini BA, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. J. Agric. Food Chem 2008; 56: 3856–3862

9. Nedelcheva D, Antonova D, Tsvetkova S, Marekov I, Momchilova S, Nikolova Damyanova B, et al. TLC and GC–MS probes into the fatty acid composition of some Lycoperdaceae mushrooms. J Lıq Chromatogr R T 2007; 30: 2717–2727

10. Vaskovsky VE, Khotimchenko SV, Boolukh EM. Distribution of diacylglycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. Phytochemistry 1998; 47: 755–760

11. Lindequist U, Niedermeyer THJ and Jülich WD. The Pharmacological Potential of Mushrooms. eCAM 2005;2(3):285–99

12. Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, Yadomae T. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)-β-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. Biol Pharm Bull 1994; 17(12): 1554–1560

13. Okazaki M, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Structure-activity relationship of (1→3)-beta-D glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. Biol Pharm Bull 1995; 18(10): 1320–1327

14. Nascimento MS, Magalhães JEM, Pinheiro ST, Da Silva TA, Coutinho LG, Baseia LG, Lima LFA, Leite EL. Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-infl ammatory potential modulate cytokine levels and the expression of Nuclear Factor Kb. Rev. Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn 2012; 22(1): 60-68

15. Hong KJ, Dunn DM, Shen CL, Pence BC. Effects of *Ganoderma lucidum* on Apoptotic and Anti-inflammatory Function in HT-29 Human Colonic Carcinoma Cells Phytother Res 2004; 18: 768–770

16. Catalli A, Kulka M. Chitin and β-Glucan Polysaccharides as Immunomodulators of Airway Inflammation and Atopic Disease. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov 2010; 4:175-189.

17. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation 2012; 9 (115): 2-8

18. Levinson W. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji (9.Baskı), 170-3, Çeviri Editörü Özgünen T, Öncü Basımevi Ankara, 2008:49-60, 391-400

19. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. Moleküler Hücre Biyolojisi (6.Baskı), 94-9, Çeviri Editörü Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö, Özkan Matbaacılık Ankara, 2011:502-3, 1055-60

20. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. İmmünoloji (7.Baskı), 01-8,Çeviri Editörü İmir T, Özkan Matbaacılık Ankara, 2008:19,87,105,127-235

21. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. Int J Cancer 2007; 121: 2373–2380

22. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int J Cancer 2007; 121: 2381–2386

23. Taupin P. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. Int J Med Sci 2008; 5(3):127-132

24. Evren Şentürk E, Esen F. Sepsiste İmmunoglobülin Tedavisi ile Kompleman İnhibisyonu ve Nöroproteksiyon. Türk Anest Rean Der Dergisi 2012; 40(4): 184-192

25. Lin WW, Karin MA. Cytokine-mediated link between innate immunity, Inflammation and cancer. J Clin Invest 2007; 117:1175–1183

26. Laulund F. Experimental Neuroinflammation: A Focus on Mitochondria, Oxygen and Function, Doctor of Philosophy, Institute of neurology, London 2010: 29

27. Lee IS, Lim J, Gal J, Chu Kang J, Kim HJ, Kang BY, Choi HJ. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. Neurochem Int 2011; 58: 153–160

28. O'Shea E, Urrutia A, Green AR, Colado MI. Current preclinical studies on neuroinflammation and changes in bloodebrain barrier integrity by MDMA and methamphetamine. Neuropharmacology 2014; 87: 125-134

29. Simard AR and Rivest S. Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. Mol Psychiatr 2006; 11: 327–335

30. Mangano E. Neuroinflammatory Mechanisms of Parkinson's Disease, Doctor of Philosophy, Carleton University Ottawa, Canada, 2011: 7

31. Sugama S. Stress-induced microglial activation may facilitate the progression of neurodegenerative disorders. Med. Hypotheses 2009; 73: 1031–1034.

32. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends Immnol 2008; 29(8): 357-365

33. Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofrj M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. Brain Behav Immun 2009; 23: 55–63

34. Brown GC and Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. Mol Neurobiol 2010; 41: 242–247.

35. Mc Arthur S, Cristante E, Paterno M, Christian H, Roncaroli F, Gillies GE, Solito E. Annexin A1: A Central player in the anti-ınflammatory and neuroprotective role of microglia. J Immunol 2010; 185: 6317-6328

36. Turunç Bayrakdar SE. Amiloid B-Peptid (1-42) İle Oluşturulan İn Vivo ve İn Vitro Nörodejenerasyon Deney Modellergnde Parp-1 İnhibitörlerinin Nöroterapötik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2012: 14

37. Falsig, J., van Beek, J., Hermann, C. and Leist, M. (2008). Molecular basis for detection of invading pathogens in the brain. J Neurosci Res 86, 1434-1447

38. Lee, S. J. and Lee, S. (2002). Toll-like receptors and inflammation in the CNS. Curr. Drug Targets Inflamm Allergy 1,181-191.

39. Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V. et al. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol 27, 229-237

40. Lund, S., Porzgen, P., Mortensen, A. L. et al. (2005). Inhibition of microglial inflammation by the MLK inhibitor CEP-1347. J Neurochem 92, 1439-1451

41. Hirt, U. A. and Leist, M. (2003). Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. Cell Death Differ 10, 1156-1164.

42. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P and Leist M. The Suitability of BV2 Cells as Alternative Model System for Primary Microglia Cultures or for Animal Experiments Examining Brain Inflammation. ALTEX. 2009;26(2):83-94.

43. Wu, D. C., Re, D. B., Nagai, M. et al. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. Proc Natl Acad Sci USA 103, 12132-12137.

44. Yang, C. S., Lee, H. M., Lee, J. Y. et al. (2007). Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. J Neuroinflammation 4, 27.

45. Brouwer MC, Tunkel AR and Beek D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 467-492

46. Pehlivanoğlu F, Kart Yaşar K, Şengöz G. Beyin omurilik sıvısından izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Derg 2011; 25(1): 1-5

47. Çavuşlu Ş. Akut menenjit sendromu. Akılcı Antibiyotik Kullanımı Ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31 2002; 141-151

48. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. Physiol Res 2010; 59: 459–469

49. Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. Biochem Pharmacol 1999; 57: 231–245

50. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. Trends Endocrinol Metab 2009; 20: 332–340

51. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical Bio Med 2010; 49: 1603–1616

52. Miao L and Clair DKS. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radical Bio Med 2009; 47(4): 344–356

53. Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernolle K, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J Redox regulation of TNF signaling Biofactors 1999; 10: 145–156

54. Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 8115–8119

55. Dringen R and Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. Biol Chem 2003; 384(4): 505–516

56. Gandhi S and Abramov AY. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. Oxidative Med and Cell Longevity 2012; 2012: 1-11

57. Colton CA and Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage the microglia. FEBS Letters 1987; 223(2): 284–288

58. Abramov AY, Jacobson J, Wientjes F, Hothersall J, Canevari L and Duchen MR. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. J Neurosci 2005; 25(40): 9176–9184

59. Noh KM and Koh JY. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. J Neurosci 2000; 20(23): 1-5

60. Brown DI and Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. Free Radical Bio Med 2009; 47(9): 1239–1253

61. Edmondson DE, Binda C, Wang J, Upadhyay AK and Mattevi A. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. Biochem 2009; 48(20): 4220–4230

62. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. J Clin Invest 1988; 82: 1040–1050

63. Bedard K, Krause KH. The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev 2007; 87: 245-313.

64. Bishop AN, Lu T and Yankner AB. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. Nature 2010; 464: 529-535

65. Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J et al. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. Stroke 1997; 28: 2252-58

66. Wilkinson B, Koenigsknecht-Talboo J, Grommes C, Lee CYD and Landreth G. Fibrillar β-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. J Biol Chem 2006; 281(30): 20842–20850

67. Fong Kuan W. Effect of Neuroinflammation on Cognition and Potential Mechanisms Involved, Bachelor's Degree, National Universıty of Singapore, Department of Pharmacology, Singapore, 2009: 12

68. Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I and Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. Glia 2004; 48: 197-206

69. Liou HC. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. J Biochem Mol Biol 2002; 35(6): 537–46

70. Kim KN, Yang HW, Kob SC, Koc YY, Kim EA et al. 6,7-Dimethoxy-4-Methylcoumarin Suppresses Pro-inflammatory Mediator Expression Through inactıvation of The Nf-kB And Mapk Pathways in Lps-induced Raw 264.7 Cells. EXCLI Journal 2014; 13: 792-800.

71. Wang Z, Jiang W, Zhang Z, Qian M, Du B. Nitidine chloride inhibits LPS-induced inflammatory cytokines production via MAPK and NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 2012; 144: 145–150

72. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser yolakları, Arşiv 2011; 20: 187

73. .Gao B, Wang H, Lafdil F, Feng D. STAT proteins – Key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. Journal of Hepatology 2012; (57): 430–441

74. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal Transducer and activator of transcription proteins in leukemias. Blood 2003; 101:2940-54

75. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler C. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Gene 2002; 285(1): 1–24

76. Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, et al. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. EMBO J 2001;20(1):91–100

77. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat 1 and Stat 3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell 1995; 82(2): 241–50

78. Saydam G. Hematolojik Malignitelerde Sinyal İleti Sistemleri. Moleküler Hematoloji Ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, 2005; 49-60

79. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 34-42

80. Barry SP. Investigating the role of the JAK/STAT and MAPK Pathways in Ischaemia/Reperfusion Injury and Inflammation, Doctor of Philosophy (PhD), Medical Molecular Biology Unit Institute of Child Health, University College London, 2009: 74

81. Chan ED, Riches DW. IFN-ɣ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 mapk in a mouse macrophage cell line. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280(3): 441–50.

82. Chen B, Chen Y, Lin W. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. Immunology 1999; 97(1): 124–9.

83. Cario, E., "Bacterial İnteractions with Cells of the İntestinal Mucosa: Toll-Like Receptors and NOD2", Gut 2005; 54: 1182-1193.

84. Underhill DM, Ozinsky A, 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin Immonol 14 (1): 103- 110.

85. Incı A, Bıskın Z. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Rolleri. J Fac Vet Med Univ Erciyes 2007; 4(2): 121-128.

86. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J 1994; 8(2): 217–25.

87. Turul T, Ersoy F. Dostu düşman ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35: 114-118.

88. Agnese DM, Calvano JE, Hahm S, et al. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. J Infect Dis 2002; 186:1522-5

89. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: mammalian “taste receptors” for a smorgasbord of microbial invaders. Curr Opin Microbiol 2002; 5:70-5.

90. Kim HS, Kim JY, Kang JS, Kim HM, Kim YO, Hong IP, Lee MK, Hong JT, Kim Y, Han SB. Cordlan polysaccharide isolated from mushroom Cordyceps militaris induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings. Food Chem Toxicol 2010; 48: 1926–1933.

91. Yoon YD, Han SB, Kang JS, Lee CW, Park SK, Lee HS, Kang JS, Kim HM. Int Immunopharmacol 2003; 3: 1873–1882.

92. Han SB, Yoon YD, Ahn HJ, Lee HS, Lee CW, Yoon WK, Park SK, Kim HM. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus.* Int Immunopharmacol 2003; 3: 1301–1312.

93. Steege JC, Ven MW, Forget PP, Brouckaert P, Buurman WA. The role of endogenous IFN-c, TNF-a and IL-10 in LPS-induced nitric oxide release in a mouse model. Cytokine 1998; 10(2): 115–23

94. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. Annu Rev Med 2002; 53(1): 35–57

95. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J R Soc Med 1999;92(4):164-69

96. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002;105(9):1135–43

97. Manzi S, Wasko MCM. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. Ann Rheum Dis. 2000;59(5):321–5.

98. Coker R, Laurent G. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. Eur Respir J 1998;11(6):1218–21.

99. Büyükbaba Boral Ö, Sönmez Tamer G, Keçeli Özcan S, Sönmez N, İşsever H, Tekeli F. Investigation of Combined Effectiveness of Spiramycin and Beta-Glucan in Mice Models of Acute Toxoplasmosis and Determination of IL-10, IL-12 and TNF-α Levels. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 446-455.

100. Soltys J, Quinn MT. Modulation of endotoxin -and enterotoxin-induced cytokine release by in vivo treatment with β-(1-6)-branched β-(1-3)-glucan. Infect Immun 1999; 67(1): 244-52.

101. Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response modifiers. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2009; 9(1): 67-75.

102. Bousquet M, Escoula L, Pipy B, Bessieres MH, Chavant L, Seguela JP. Enhancement of resistance of mice *Toxoplasma gondii* by 2 polysaccharides beta

1-3, beta 1-6 (PSAT and Scleroglucan). Ann Parasitol Hum Comp1988; 63(6): 398-409.

103.Altıniğne N, Berkan T. Besin değeri ve toksisitesi ile mantar. Pharmacia-JTPA 1985; 25:55(3): 407-412.

104.YaratanakuL M. Yenen Ve Zehirli Mantarların Moleküler Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla 2012: 3-4

105.Apaydın M. Tricholoma fracticum (Britzelm.) Kreisel Mantarının Aktivitesi Ve Kimyasal Bilesimlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,Kimya Anabilim Dalı, Muğla 2011:1

106.Lull C, Wichers HJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites, Mediators Inflamm 2005; 2: 63-80.

107.Tül B. Bazı Mantar Türlerinin Antimikrobiyal Ve Antitümör Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla 2012: 38

108.Zhang M, Cui SW, Cheung PCK and Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci Tech 2007; 18:4-19

109.Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 258-274

110.Sulkowska-Ziaja, K., B. Muszynska, (2005) Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity, Acta Pol Pharm 62(2): 153-159.

111.Kibar B, Peksen A. Nutritional and environmental requirements for vegetative growth of edible ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma terreum*. Žemdirbystė=Agriculture 2011;98(4):409-14

112.Çetin F. Tokat Bölgesinde Yetişen Bazı Yenebilen Yabani Mantar Türlerinde Yağ Asidi Kompozisyonları ve Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması,

Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziosmanpaşa 2010:5

113.Basaran D, Yılmaz F, Gücin F. Antimicrobial Activity of Tricholoma terreum Fr. Kummerekoloji 1999; 8(30): 13-17

114.Uysal Y. Tıbbi Mantar *Ganoderma Lucidum*'un Antikolesterolemik Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana 2006: 4

115.Díez AA and Alvarez A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. Food Chem 2001; 75: 417–22

116.Ertunga NS, Cakmak Ü, Colak A, Faiz Ö, Sesli E. Characterisation of esterolytic activity from two wild mushroom species, Amanita vaginata var. vaginata and *Tricholoma terreum*. Food Chem 2009; 115:1486–90

117.Mau JL, Lin HC, Song LF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. Food Res Int 2002; 35: 519–26

118.Hatakeyama T, Mizuno K, Kurosawa S. Purification and properties of a nuclease from the fruit body of Tricholoma matsutake. Biosci Biotechnol Biochem 2010; 74:206–208

119.Yamac M, Bilgili F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/ or mycelial cultures of some mushroom isolates. Pharm Biol 2006; 44: 660–67

120.Barseghyan GS, Wasser SP. Species Diversity of Hypogeous Ascomycetes in Israel. Mycobiol 2010; 38(3): 159-65

121.Navarro-Rodenas A, Morte A, Pe´ rez-Gilabert M. Partial purification, characterisation and histochemical localisation of alkaline phosphatase from ascocarps of the edible desert truffle Terfezia claveryi Chatin. Plant Biology 2008; 11(2009):678–85

122.Bokhary HA, Parvez S. Chemical Composition of Desert Truffles Terfezia claveryi. J Food Comp Anal 1993;6(3):285-93

123.Janakat S, Nassar M. Hepatoprotective Activity of Desert Truffle (Terfezia claveryi) in Comparison with the Effect of Nigella sativa in the Rat. Pak J Nutr 2010; 9(1): 52-56

124.Gazzani G, Papetti A, Daglia M, Berte F, Gregotti C. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsome and the effect of thermal treatment. J Agric Food Chem 1998; 46: 4123- 27

125.Janakat SM, Al-Fakhiri SM, Sallal AKJ. A promising peptide antibiotic from Terfezia claveryi aqueous extract against Staphylococcus aureus in vitro. Phytother Res 2004;18: 810-13

126.Janakat SM, Al-Fakhiri SM, Sallal AKJ. Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle Terfezia claveryi against Pseudomonas aeruginosa. Saud Med J 2005; 26: 952-55

127.Aldebasi YH, Nouh WG, Atti NMA, Bekhit MM, Qureshi MA, Aly SM. Comparative Pathological Studies on the Healing Effect of Natural (Terfezia claveryi) and Synthetic (Vigamox) Antimicrobials on Corneal Ulcers in Rabbits. J Pharm Biomed Sci 2012;2(6):66-77

128.Solak MH, Kalmis E, Saglam H and Kalyoncu F. Antimicrobial Activity of Two Wild Mushrooms Clitocybe alexandri (Gill.) Konr. And *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries collected from Turkey Phytother Res 2006;20: 1085-87

129.Kawai M, Yamahara M, Ohta A. Bipolar incompatibility system of an ectomycorrhizal basidiomycete, Rhizopogonrubescens. Mycorrhiza 2008;18(4): 205-210

130.Shimomura N, Matsuda M, Ariyoshi K, Aimi T. Development of mycelial slurries containing surfactant for cultivation of the edible ectomycorrhizal mushroom Rhizopogon roseolus (syn. Rhizopogon rubescens). Botany 2012;90: 839-44

131.Pereira E, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR. Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. Food Chem 2012;130:394-403

132.Aslim B and Ozturk S. Phenolic Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Leucoagaricus leucothites* (Vittad.) Wasser. J Med Food 2011;14(11): 1419-24.

133.Zhang A, Lu J, Zhang N, Zheng D, Zhang G and Teng L. Extraction, Purification and Anti-tumor Activity of Polysaccharide from Mycelium of Mutant Cordyceps Militaris. Chem Res Chinese Universities 2010; 26(5): 798-802

134.Erkuş İ. Nevşehir (Gülşehir, Derinkuyu) Yöresinde Yetişen Makromantarlar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziosmanpaşa 2010: 5

135.Tel G, Apaydın M, Duru ME, Öztürk M. Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three Tricholoma Species with Toplam Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia, Food Anal Methods 2012; 5: 495-504

136.Anand N and Chowdhry PN. Anti-Tumour Potential Of Active Compounds (Polysaccharides) Of Wild Mushrooms From Rajourı Dıst. Of Jammu & Kashmır, India. IJPSR, 2013; 4(5): 1743-46

137.Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60: 258-274

138.Yan JK, Wang WQ, Li L, Wu JW. Physicochemical properties and antitumor activities of two -glucans isolated from hot water and alkaline extracts of Cordyceps (Cs-HK1) fungal mycelia. Carbohydr Polym 2011; 85: 753–58.

139.Reis FS, Barreira JCM, Calhelha RC, Griensven LJID, Ciric A, Glamoclija J, Sokovic M, Ferreira ICFR. Chemical characterization of the medicinal mushroom Phellinus linteus (Berkeley & Curtis) Teng and contribution of different fractions to its bioactivity. LWT - Food SciTechnol 2014; 58: 478-85

140.Liu DZ. A review of ergostane and cucurbitane triterpenoids of mushroom origin. Natural Product Research: Formerly Nat Prod Lett 2014; 28(14): 1099–105

141.Tong H, Xia N, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, Jiang R, Tian D, Sun X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Bioresource Technol 2009;100:1682–86

142.Zhang M, Cui SW, Cheung PCK and Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci Tech 2007; 18:4-19

143.Qiao X, An R, Huang Y, Ji S, Li L, Tzeng Y,Guo D, Ye M. Separation of 25R/S-ergostane triterpenoids in the medicinal mushroom Antrodia camphorata using analytical supercritical-fluidchromatography. J Chromatogr A 2014; 1358: 252–60

144.Hetland G, Johnson E, Lyberg T and Kvalheim G. The Mushroom Agaricus blazei Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. Adv Pharmacol Sci 2011;2011:1-10

145.Mothana RAA, Jansen R, Ju¨lich WD, Lindequist U. Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete Ganoderma pfeifferi. J Nat Prod 2000;63:416–8.

146.Alves MJ, Ferreira ICFR, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Planta Medica 2012;78:1707-18.

147.Smania EFA, Delle Monache F, Smania Jr A, Yune RA, Cuneo RS. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. Fitoterapia 2003;74:375–7.

148.Smania Jr A, Delle Monache F, Smania EFA, Cuneo RS. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. (Aphyllophoromycetideae) fruit body. Int J Med Mushrooms 1999;1:325–30

149.Badalyan SM. Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom Lentinus edodes (Berk.) Singer (Agaricomycetidae). Int J Med Mushrooms 2004;6:131–8.

150.Zheng S, Liu Q, Zhang G, Wang H and Ng TB. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom Clitocybe sinopica. Acta Biochim Pol 2010; 57(1): 43-48.

151.Tül B. Bazı Mantar Türlerinin Antimikrobiyal Ve Antitümör Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla 2012: 38

152.El-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, et al. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from Ganoderma lucidum. Phytochemistry 1998;49:1651–7.

153.Kim YO, Park HW, Kim JH, Lee JY, Moon SH, Shin CS. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. Life Sci 2006; 79: 72–80.

154.Lu X, Chen H, Dong P, Fu L and Zhang X. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus*. J Sci Food Agric 2010; 90: 276–280

155.Xiao JH, Xiao DM, Sun ZH, Xiao Y and Zhong JJ. Antioxidative potential of polysaccharide fractions produced from traditional Chinese medicinal macrofungus *Cordyceps jiangxiensis* in vitro. Afr J Biotechnol 2011; 10(34):6607-15

156.Xiao JH, Chen DX, Fang N, Liu ZL, Zhang T Growth arrest of human gastric adenocarcinoma cells by bioactive compounds of *Cordyceps jiangxiensis* (CaoMuWang) through induction of apoptosis. J Food Agric Environ 2006;4(3-4): 66-73.

157.Turlo J, Gutkowska B, Herold F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of Lentinula edodes (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food Chem Toxicol 2010; 48(2010):1085-91

158.Mercimek HA. Trametes versicolor'ın Tekstil Boyalarının Gideriminde Kullanım Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana 2007:12

159.Silva S, Martins S, Karmali A and Rosa E. Production, purification and characterisation of polysaccharides from Pleurotus ostreatus with antitumour activity. J Sci Food Agric 2012; 92: 1826–32

160.Lavi I, Friesem D, Geresh S, Hadar Y, Schwartz B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom Pleurotus ostreatus induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. Cancer Lett 2006; 244: 61–70.

161.Wang CR, Ng TB, Lic L, Fang JC, Jiang Y, Wen TY, Qiao WT, Li N and Liu F. Isolation of a polysaccharide with antiproliferative, hypoglycemic, antioxidant and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the fruiting bodies of the abalone mushroom Pleurotus abalonus. J Pharm Pharmacol 2011; 63: 825–32

162.Daba AS and Ezeronye OU. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms, Afr J Biotechnol 2003; 2 (12): 672-78

163.Zhang BZ, Inngjerdingen KT, Zou Y, Rise F, Michaelsen TE, Yan PS, Paulsen BS. Characterisation and immunomodulating activities of exo-polysaccharides from submerged cultivation of Hypsizigus marmoreus. Food Chem 2014; 163: 120–28

164.Survase SA, Saudagar SP, Bajaj IB and Singhal RS. Scleroglucan: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications. Food Technol Biotechnol 2007;45(2):107–18

165.Wasser SP. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 89:1323–32

166.Khan MA and Tania M. Nutritional and Medicinal Importance of Pleurotus Mushrooms: An Overview. Food Reviews Int 2012; 28(3): 313-29

167.Zhang M, Cheung PCK and Zhang L. Evaluation of Mushroom Dietary Fiber (Nonstarch Polysaccharides) from Sclerotia of Pleurotus tuber-regium (Fries) Singer as a Potential Antitumor Agent. J. Agric. Food Chem 2001; 49: 5059-62

168.Nitha B, Meera CR and Janardhanan KK. Anti-inflammatory and antitumour activities of cultured mycelium of morel mushroom, *Morchella esculenta*. Current Sci 2007;92(2): 235-39

169.Antonyuk VO, Klyuchivska OY. Cytotoxic proteins of Amanita virosa Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells, Toxicon 2010; 55(7): 1297-1305

170.Nguyen TL, Chen J, Hu Y, Wang D, Fan Y, Wang J, Abula S, Zhang J, Qin T, Chen X, Chen X, Khakame SK, Dang BK. In vitro antiviral activity of sulfated Auricularia auricula polysaccharides. Carbohydr Polym 2012; 90(3):1254–8.

171.Li C, Mao X, Xu B. Pulsed electric field extraction enhanced anti-coagulant effect of fungal polysaccharide from Jew's ear (Auricularia auricula). Phytochem Anal 2013;24(1):36–40

172.Zeng F, Zhao C, Pang J, Lin Z, Huang Y and Liu B. Chemical Properties of a Polysaccharide Purified From Solid-State Fermentation of Auricularia auricular and its Biological Activity as a Hypolipidemic Agent, J Food Sci 2013; 78(9):1470-75

173.Moro C, Palacios I, Lozano M, D'Arrigo M, Guillamón E, Villares A, Martínez AJ, García-Lafuente A. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. Food Chem 2012; 130:350–55

174.Lull C, Wichers HJ and Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. Mediators Inflamm 2005;2(2005):63–80

175.Sugui MM, Alves de Lima PL, Delmanto RD, Eira AF, Salvadori DMF, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of Lentinula edodes (Berk.) Pegler mushroom and possible variation amond lineages. Food Chem Toxicol 2003; 4: 555-60

176.Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of Antrodia camphorata, Cordyceps sinensis,and Cinnamomum osmophloeum bark extracts. J Ethnopharmacol 2007; 114:78–85

177.Zhang R, Xu S, Cai Y, Zhou M, Zuo X, and Chan P. Ganoderma lucidum Protects Dopaminergic Neuron Degeneration through Inhibition of Microglial Activation. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2009;2011:1-9

178.Lim BO. Coriolus versicolor Suppresses Inflammatory Bowel Disease by Inhibiting the Expression of STAT1 and STAT6 Associated with IFN-γ and IL-4 Expression. Phytother Res 2011;25: 1257–61

179.Park DK, Choi WS, Park PJ, Kim EK, Jeong YJ, Choi SY, Yamada K, Kim JD, Lim BO. Immunoglobulin and cytokine production from mesenteric lymph node lymphocytes is regulated by extracts of *Cordyceps sinensis* in C57Bl/6N mice. J Med Food 2008; 11: 784–88

180.Han ES, Oh JY, Park HJ. Cordyceps militaris extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. J Ethnopharmacol 2011; 134: 703–10

181.Zhao L, Dong Y, Chen G,Hu Q. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum. Carbohydr Polym 2010;80:783–89

182.Fırat A, Irmak S. Shiitake (Lentinula edodes) Mantarının Subkritik Su İle ekstraksiyonu Ve Bileşenlerinin Tanımlanması. Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü 2008;17(6):28-36

183.Kösoğlu M, Yücel B, Gökbulut C, Konak R, Bircan C. Hasat Zamanının Arı Sütünün Kimi Biyokimyasal ve İz Element Kompozisyonları Üzerine Etkisi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013;19(2):233-37

184.Du Bois M, Gilles KA, Hamitton JK, Reders PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analy Chem 1956;28: 350–56

185.Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehe AT. A new method for rapid determination of carbohydrate and toplam carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydr Polym 2013; 97: 253–261

186.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

187.Gümrah Ö. Toplam Protein Tayin Yöntemleri Ve Enzimlerle Hidrolizlenmiş Protein Çözeltilerinde Toplam Amino Asit Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008:30

188.Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-Radical Scavenging Action of Medicinal Herbs from Ghana Thonningia Sanguinea on Experimentally Induced Liver Injuries. General Pharmacology 1999; 32: 661-67.

189.Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS· Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Bio Med 1999; 26: 1231-37

190.Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Ravento´S RM. Analysis of Toplam Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In Methods in Enzymology, Packer, L. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1999; 299: 152-315

191.Zhishen J, Mengcheng T. and Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999; 64:555−59

192.National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standards, M2-A9, Tagel 2A, Wayne, PA 2008; 27 (1): 32-37

193.Arıkan H. İnsan Korpus Kavernozum Hücre Kültürü Oluşturulması. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2008:14-18

194.Yaylalı C. Tendon Kılıfı Fibroblastlarının Hücre Kültüründe Tenositlere Farklılaşması Ve Tenositlerin Sentezlediği Kollajen Tiplerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,2007:6-14

195.Seydel GŞ. Hepatosellüler Karsinomaya Neden Olan Genlerin Gen İfadelenmesinin Kantitatif Ölçümü. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2011:43-47

196.Yurdakök B. Türkiye'de Yetişen Eryngium kotschyi (Boğadikeni) Ve Eryngium maritimum (Deniz Boğadikeni) Bitkilerinin Sitotoksik Etkilerinin Hep2, Hepg2, Vero Ve U138 Mg Hücre Kültürlerinde Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2010:24-25

197.Costa LG, Fattori V, Giordano G, Vitalone A. An in vitro approach to assess the toxicity of certain food contaminants: methylmercury and polychlorinated bifenyls. Toxicol 2007;23: 65-76.

198.Gürler S. PC12 Hücrelerinde 1-Metil 4-Fenilpridinyum (Mpp+) İle Oluşturulan Deneysel Parkinson Modelinde Zonisamid'in Ca+2 Sinyali, Oksidatif Stres, Hücre Canlılığı, Kaspaz Aktivitesi üzerine Etki. Uzmanlık Tezi, Isparta 2011:28

199.Kim J, Jayaprakasha GK, Uckoo RM, Patil BS. Evaluation of chemopreventive and cytotoxic effects of lemon seed extracts on human breast cancer (MCF-7) cells. Food Chem Toxicol 2012;50(2): 423-30

200.Lan A, Xu W, Zhang H, Hua H, Zheng D, Guo R, Shen N, Hu F, Feng J, Liu D. Inhibition of ROS-Activated p38MAPK Pathway is Involved in the Protective Effect of H2S Against Chemical Hypoxia-Induced Inflammation in PC12 Cells. Neurochem Res 2013;38:1454–66.

201.Watson RJ and Blackwell B. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J Microbiol 2000;46: 633–42

202.Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrin 2002; 29: 23–39

203.Baltimore D, Temin HM, Mizutani S. Viral RNA-dependent DNA polymerase. Nature 1970;226:1211–13

204.Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, van Beurden EACM, Hennipman A, Michels AA, Staal GEJ. Characterization of Protein Tyrosine Kinases from Human Breast Cancer: Involvement of the c-src Oncogene Product. Can Res 1992; 52:4773-78

205.Walker JM. The Protein Protocols Handbook (2.baskı), Humana Press Inc Totowa, New Jersey, 2002:11

206.Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Biochem 1979;76(9):4350-54

207.Taylor SC and Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. BioMed Res Int 2014;2014:1-8

208.WEB_1 (2015), GE Healthcare Life Sciences, http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/applications/electrophoresis/ , 20.02.2015.

209.Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JPFG. Van Griensven LJLD. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus, Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food Chem 2011; 129:1667–75

210.Su MS, Shyu YT, Chien PJ. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. Food Chem 2008; 111: 892–96

211.Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. Free Radic Biol Med 2009;46: 965–88

212.Çanakçı CF, Çiçek Y, Çanakçı V. Reactive Oxygen Species and Human Inflammatory Periodontal Diseases Biocem 2005; 70: 619-628.

213.Pe´rez-Gilabert M, Morte A, Honrubia M, and Garcı´a-Carmona F. Partial Purification, Characterization, and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) Polyphenol Oxidase. J Agric Food Chem. 2001; 49: 1922-1927.

214.Aldebasi YH, Aly SM, Qureshi MA and Khadri H. Novel antibacterial activity of *Terfizia claveryi* aqueous extract against clinical isolates of corneal ulcer. Afr J Biotechnol 2013; 12(44): 6340-6346.

215.Kalmış E, Yıldız H, Ergönül B, Kalyoncu F, Solak MH. Chemical composition and nutritional value of a wild edible ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma anatolicum* Turk J Biol 2011; 35: 627-633.

216.Bursal E, Köksal E, Gülçin İ, Bilsel G, Gören AC. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (Cerasus avium L.) determined by LC–MS/MS. Food Res Int 2013; 51:66–74

217.Smiderle FR, Sassaki GL, Van Arkel J, Iacomini M, Wichers HJ, Van Griensven LJLD. High molecular weight of the culinary mushroom *Agaricus bisporus* is an α-glucan that forms complexes with low molecular weight galactan. Molecules 2010; 15 (8): 5818–5830

218.Bala N, Aitken EA, Cusack A, Steadman KJ. Antimicrobial potential of australian macrofungi extracts against foodborne and other pathogens. Phytother Res 2012; 26(3): 465-69

219.Ramesh C, Pattar MG. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. Pharmacog Res 2010; 2(2): 107-12

220.Hamza A, Zouari N, Zouari S, Jdir H, Zaidi S, Gtari M, Neffati M. Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. Arabian J. Chem. 2013;2013: 1-7.

221.Dundar A, Faruk Yesil O, Acay H, Okumus V, Ozdemir S and Yildiz A. Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of Terfezia boudieri (Chatin) from Turkey. Food Sci Tech Int 2012;18: 317-28

222.Sarikurkcu C, Tepe B, Karslı Semiz D, Solak MH. Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushrooms from Mugla, Turkey. Food Chem Toxicol 2010; 48: 1230–33

223.Kalyoncu F, Oskay M Kayalar H. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. Mycology 2010; 1(3):195–99

224.Keser O, Bılal T. Beta-Glukanın Hayvan Beslemede Bagısıklık Sistemi ve Performans Üzerine Etkisi. J Fac Vet Med Univ Erciyes 2008; 5(2): 107-119

225.Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. Clin Microbiol Rev 2000; 13 (4): 523-533.

226.Brown GD, Gordon S. Immune recognition: A new receptor for β glucans. Nature, 2001; 413: 36-37.

227.Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal β glucans and mammalian immunity. Immunity, 2003; 19 (3):311-315.

228.Yun CH, Estrada A, Van Kessel A, Gajadhar AA, Redmond MJ, Laarveld B. β-(1→3,1→4) oat glucan enhances resistance to Eimeria vermiformis infection in immunosupressed mice. Int J Parasitol 1997; 27(3): 329-37.

229.Picka MCM, Calvi SA, Lima CRG, Santos IAT, Marcondes-Machado J. Measurement of IL-10 serum levels in BALB/c mice treated with beta-1,3 polyglucose or sulfadiazine and acutely infected by *Toxoplasma gondii*.J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2005; 11(4): 540-56.

230.Patchen ML, Liang J, Vaudrain T, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by Betafectin PGG Glucan alone and in combination with granulocyte colony-stimulating factor. Stem Cells 1998; 16(3): 208-17.

231.Nyugen BT, Stadsbaeder S. Effects of beta-1,3 glucan upon infection by T.gondii RH studies in vivo and in vitro (proceeding). Arch Int Physiol Biochim 1978; 86: 207-9.

232.Goldman R, Jaffe CL. Administration of β-glucan following Leishmania major infection supresses disease progression in mice. Parasite Immunol 1991; 34(2): 137-45.

233.Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC. Anti-inflammatory potential of Antrodia camphorata through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-KB pathway. Int Immunopharmacology 2005; 5:1914-25

234.Carbonero ER, Gracher AHP, Komura DL, Marcon R, Freitas CS, Baggio CH, Santos ARS, Torri G, Gorin PAJ, Lacomini M. Lentinus edodes heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. Food Chem 2008; 111:531-37

235.Wu SJ, Liaw CC, Pan SZ, Yang HC, Ng LT. Phellinus linteus polysaccharides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells. J Funct Foods 2013; 5: 679-88

236.Chen W, Feng L, Huang Z, Su H. Hispidin produced from Phellinus linteus protects against peroxynitrite-mediated DNA damage and hydroxyl radical generation. Chem-biol Interact 2012; 199: 137-42

237.Huang HY, Chieh SY, Tso TK, Chien TY, Lin HT, Tsai YC. Orally administered mycelial culture of Phellinus linteus exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. J Ethnopharmacol 2011; 133: 460-66

238.Song KS, Li G, Kim JS, Jing K, Kim TD, Kim JP, et al. Protein-bound polysaccharide from Phellinus linteus inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis and alters Wnt/beta-catenin in SW480 human colon cancer cells. BMC Cancer 2011; 11: 307-27

239.Kim SH, Lee HS, Lee S, Cho J, Ze K, Sung J et al. Mycelial culture of Phellinus linteus protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. J Ethnopharmacol 2004; 95: 367-72

240.Kim SH, Song YS, Kim SK, Kim BC, Lim CJ, Park EH. Antiinflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom Phellinus linteus. J Ethnopharmacol 2004; 93:141-46

241.Firenzuoli F, Gori L and Lombardo G. The Medicinal Mushroom Agaricus blazei Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. eCAM 2008;5(1):3–15

242.Laroche C and Michaud P. New Developments and Prospective Applications for β(1,3) Glucans. Recent Patents on Biotechnol 2007; 1: 59-73

243.Hobbs CR. Medicinal Value of Turkey Tail Fungus Trametes versicolor (L.:Fr.) Pilát (Aphyllophoromycetideae). Int J Med Mushrooms 2005;7(3):346-47

244.Woo CWH, Man RYK, Siow YL, Choy PC, Wan EWY, Lau CS and Karmin O. Ganoderma lucidum inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages, Mol Cell Biochem 2005; 275: 165–171

245.Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from Ganoderma lucidum on herpes simplex viruses. J Ethnopharmacol 2000;72: 475–81

246.Yu-Hong Y, Zhi-Bin L. Protective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. Acta Pharmacol Sin 2002; 3(9): 787-91

247.Nie S,Zhang H, Li W, Xie M. Current development of polysaccharides from Ganoderma: Isolation, structure and bioactivities. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 2013;1:10–20

248.Chan GC, Chan WK and Sze DM. The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. J Hematol Oncol 2009; 2(25):1-11

249.Yoon HM, Jang KJ, Han MS, Jeong JW, Kim GY, Lee J and Choi YH. Ganoderma lucidum ethanol extract inhibits The Inflammatory Response By Suppressing The Nf-Kb And Toll-Like Receptor Pathways İn Lipopolysaccharide-Stimulated Bv2 Microglial Cells. Experimental and Therapeutic Med 2013;5: 957-63

250.Choi SY, Hur SJ, An CS, Jeon YH, Jeoung YJ. Bak JP, Lim BO. Anti-inflammatory effects of Inonotus obliquus in colitis induced by dextran sodium sulfate. J. Biomed. Biotechnol 2010;2010:1-5

251.Debnath T, Hasnat MA, Pervin M, Lee SY, Park SR, Kim DH, Kweon HJ, Kim JM, Lim BO. Chaga mushroom (Inonotus obliquus) grown on germinated brown rice suppresses inflammation associated with colitis in mice. Food Sci. Biotechnol 2012; 21: 1235–41

252.Cho JH, Cho SD, Hu H, Kim SH, Lee SK, Kang KS. The roles of ERK1/2 AND P38 MAPkinases in the prevetive mechanisms of mushroom Phellinus linteus against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. Carcinogenesis 2002;23(7):1163-69

253.Ye M, Luo X, Li L, Shi Y, Tan M, Weng X, Li W, Liu J, Cao Y. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom Albatrellus confluens, induces cell-cycle arrest in G1 phase via the ERK1/2 pathway. Cancer Letters 2007; 258: 199–207

254.Lee JS and Hong EK. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from Cordyceps militaris. Int Immunopharmacol 2011; 11: 1226–1233

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler & İletişim

Adı, Soyadı: Berrak ALTINSOY

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 2 Nisan 1982, Ankara

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 352 2076666/28176

Fax: +90 352 4379169

email: berrdumlu@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD 38039 Talas/Kayseri

Eğitim Bilgileri

Doktora, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Biyokimya, TÜRKİYE, 2010-2015.

Yüksek Lisans, University of Essex, Marine Biology, Marine Biology, INGILTERE, 2008-2009.

Lisans, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, TÜRKİYE, 2001-2005.

İş Deneyimleri

Arş.Gör., Erciyes Üniversitesi, Eczacılık, 2010 - Devam Ediyor.

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1) Yuvali Çelik G., Onbaşli D., Altinsoy B., Alli H. , "In Vitro Antimicrobial And Antioxidant Properties of *Ganoderma Lucidum* Extracts Grown In Turkey", European J Med Plants 2014;4:709-722.

2) Bekci H., Altinsoy B., Sarıkaya S., Onbaşılı D., Yuvalı Çelik G., "Antimicrobial Activity of Some Macrofungi Collected From Kastamonu Province", Kastamonu University J of Forestry Faculty 2011;11(2):187-190.