



Ferit Arpaz, Perihan Güler, Mustafa Türk

Kırıkkale University, Kırıkkale-Türkiye

ferit_arpaz@hotmail.com; perihanguler71@gmail.com; mtrk.35@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0013>

SUILLUS COLLINITUS (FR.) KUNTZE'UN SİTOTOKSİTE, APOPTİK VE NEKROTİK ETKİLERİ

ÖZ

Çalışmada, *Suillus collinitus*'un sitotoksite, apoptik ve nekrotik etkileri incelenmiştir. Kuru basidiokarplardan alınan parçalar malt ekstrakt agarda doku kültürü yöntemiyle geliştirildi. Sırasıyla primer ve sekonder miseller 27°C'de, karanlıkta, 10 gün süreyle inkübe edilerek elde edildi. Sekonder misellerden 5'er pelet nutrient broth'da 27°C'de, 140 rpm'de 7 günde gelişimini tamamladı. Numuneler soxlet cihazında 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edilerek sitoksite, apoptik ve nekrotik çalışmalar için hazırlandı. Sitoksite çalışmalarında, ekstrakt MCF-7 ve L929 Fibroblast hücrelere örnek konsantrasyonları 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml olarak uygulandı. WST-1 solüsyonu eklenerek inkübasyon sonucunda 440 nm dalga boyunda mikroplate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. İkili boyama deneyi ile aynı hücre hattında apoptoz ve nekroz belirlendi. İkili boyama solüsyonu hazırlanarak MCF-7 ve L929 Fibroblast hücrelere aynı konsantrasyonlarda uygulandı. İnkübasyon sonucunda florasanataçmanlı mikroskop FITC ve DAPI filtresinde 20X büyütmede ölçüm yapıldı. Toksite, konsantrasyonlara bağlı olarak değişmektedir. 0.5mg/ml konsantrasyonda %86 oranında toksik etki göstermiştir. Konsantrasyon azaldıkça toksite de azalmıştır. Fibroblastlara yapılan uygulamada ise uygulanan tüm konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Suillus collinitus*, Kanser, Sitotoksite, Apoptik Etki, Nekrotik Etki

THE CYTOTOXIC, APOPTOTIC AND NECROTIC EFFECCTS OF *SUILLUS COLLINITUS* (FR.) KUNTZE

ABSTRACT

In the study, cytotoxicity, apoptotic, necrotic effects of *Suillus collinitus* were investigated. Taken parts from the dry basidiocarps were developed by tissue culture method on malt extract agar. The primary and the secondary mycelium were obtained by incubation at 27°C in the dark for 10 d. Five pellets were taken from the secondary mycelium and were completed their growth in 7 d at 140 rpm at 27°C in nutrient broth. The samples were prepared for cytotoxic, apoptotic, necrotic, studies by extracting at 80°C and 1 h in ethyl alcohol at soxlet device. In cytotoxic studies, sample concentrations for extract MCF-7 and L929 fibroblast cells were applied as 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml respectively. The WST-1 solution was added and the absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 440 nm at the end of the incubation. Apoptosis and necrosis were detected in same cell line as the double staining experiment. Binary staining solution was prepared and MCF-7 and L929 fibroblast fibroblast cells were applied at the same concentrations. As a result of incubation, the measurement was done at fluorescence microscopy at 20X magnification in FITC and DAPI filters. Toksite varies depending on concentrations. At toxicity of 0.5mg/ml showed 86% toxic effect. As concentration decreased, toxicity decreased. In application to fibroblasts, it was determined that it does not show any toxic effect at all applied concentrations.

Keywords: *Suillus collinitus*, Cancer, Cytotoxicity, Apoptotic Effects, Necrotic Effects

How to Cite:

Arpaz, F., Güler, P. ve Türk, M., (2017). *Suillus Collinitus* (Fr.) Kuntze'un Sitotoksite, Apoptik ve Nekrotik Etkileri, Life Sciences (NWSALS), 12(4):56-63, DOI: 10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0013.



1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Makromantarlar "fungi" adı verilen canlılar aleminde yer alan ökaryotik, klorofilsiz, saprofit veya parazit olarak beslenen, sporla eşeyli veya eşeysiz olarak üreyen canlılardır (Bayuk ve ark., 2016). Günümüzde tarımsal üretimdeki kayıpları azaltarak atık maddelerin tekrar üretime kazandırılmasına yönelik çalışmalarda mantarların saprofit olma özelliğinde faydalanarak atık ürünlerin mantar yetiştiriciliğinde kullanılmasıyla hem çevre kirliliği önlenmekte hem de ek gelir elde edilmektedir (Yakupoğlu ve ark., 2011). Antik çağlardan beri varlığı bilinen mantarlar besleyici değerinden dolayı ve tıbbi amaçlı olarak günümüzde hala dünyanın pek çok ülkesinde ilgi görmektedir (Akbaş, 2010). Dünya üzerinde 1,5 milyon mantar türü vardır fakat bunlardan sadece %10 u bilinmekte olup 5 bin yenilebilir mantar türü bilinmektedir (Saldır, 2015). Son yıllarda mantarların yüksek besin ve tıbbi değerlerinin daha iyi anlaşılması mantarlar üzerinde ilginin artmasına neden olmuştur. Besin değerlerine ek olarak içeriğinde bulunan aktif bileşenlerin tedavi edici etkisinin olduğu saptanmıştır (Bayuk ve ark., 2016). Antik Romalılara göre mantarlar tanrıların yiyecekleriydi. Mısırlılar mantarları tanrı Osiris'ten bir hediye olarak nitelendirirken, Çinliler hayatın iksiri olarak düşünmüşlerdir (Akbaş, 2010).

Yapılan çeşitli çalışmalarda mantarların içerdikleri aktif bileşenlerin antitümör, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, kardiyovasküler, hepatite karşı koruyucu, kolestrol düşürücü, bağışıklık sistemi güçlendirici ve düzenleyici etkiler gösterdiği saptanmıştır (Bayuk, 2016). Biyoaktif bileşenler, mantarların fruktifikasyon organından, miselden yada kültür ortamından izole edilir (Çöl ve ark., 2017). Mantarlar temel aminoasitler bakımından zengindir. Yapılan çalışmalarda makromantarlar içerikleri incelendiğinde fosfor ve potasyum başta olmak üzere mineraller ve Tiamin (B1), ribofilavin (B2), niyasin, biyotin ve askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminler bakımından zengindirler (Saldır, 2015). Yapılan çalışmalarda mantarlarda bulunan polisakkaritler, fenolik bileşen türleri antitümör etkisi olan önemli bileşenlerdir (Josiana ve ark., 2012). Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise funguslardan elde edilen metabolitlerin insan bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda pozitif sonuçlar verdikleri görülmüştür. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise, makrofungusların kanser, AIDS/HIV, hepatit ve bağışıklık sistemi hastalıklarına karşı etkileri araştırılmaktadır. (Karakaya, 2012).

Çalışmalarda shiitakenin kan dolaşımını düzenlemesi, beyin kanamalarının, damar sertliğinin, böbrek yetmezliğinin vb. hastalıkları engellediği, *Cordyceps sinensis* mantarının hepatit üzerine etkileri olduğu, karaciğer fonksiyonlarını düzenlediği, antioksidan etki gösterdiği, kolestrol yağlarının birikmesini engellediği, *Grifola frondosa* mantarının tümör gelişimini engellediği rapor edilmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Günümüze kadar yapılan bilimsel çalışmalar bazı makromantar türlerinin antibakteriyel, antifungal, antitümör özellik gösteren çeşitli bileşenler içerdikleri saptanmıştır (Saldır, 2015). Bu çalışmada kullanılan *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze Suillaceae familyasında yer alan halk arasında ayı mantarı olarak bilinen, çam altında, kalkerli topraklarda, yazdan sonbahara kadar, tek tek veya gruplar halinde yetişen bir mantar türüdür. Bu çalışma; *Suillus collinitus*'un sitotoksite, apoptik ve nekrotik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Ülkemizde makrofungusların kanser üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Dünya'nın değişik bölgelerinde antik çağlardan beri mantarların ilaç ve besin kaynağı olarak tüketildiği bilinmektedir. Bu çalışma ülkemizin genelinde yetişebilen, zehirsiz ve yenilebilir olan *Suillus collinitus* (Fr.). Kuntze'un kanser hücrelerine aktivitesini ölçmek için yapılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA (EXPERIMENTAL METHOD)

3.1. Organizma (Organism)

Bu çalışmada Agaricomycetes sınıfında yer alan *Suillus collinitus* kullanılmıştır. Örnekler 2011 yılında Kırıkkale'nin Delice ilçesi Büyükavşar kasabasından toplanmıştır. Numuneler Kırıkkale Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Koruma Biyolojisi, Mikoloji, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

3.2. Kültür Çalışması (Culture Studies)

3.2.1. Katı Besiyerdeki Çalışmalar (Studies on Agar Media)

Suillus collinitus'un suşlarından aseptik şartlarda alınan doku parçaları malt ekstrakt agar (MEA) besiyeri üzerine aşılandı ve 27°C'de 7 gün süre ile primer miseller geliştirildi. Primer misellerden alınan misel agar parçalar MEA'nın merkezine inoküle edilerek 27°C'de 10 gün süre ile inkübe edildi ve sekonder miseller elde edildi (Fritsche, 1972).

3.2.2. Sıvı Besiyerdeki Çalışmalar (Studies on Broth Media)

Katı kültür ortamında gelişimini tamamlayan sekonder misellerden 5 pelet alınarak sıvı kültür ortamında nutrient broth'da 27°C'de 140 rpm'de 7 günde gelişmeye bırakıldı (Kalyoncu ve ark., 2010).

3.3. Ekstrelerin Hazırlanışı (Extract Preparation)

Nutrient broth'da gelişimini tamamlayan numuneler Soxlet cihazına yerleştirilerek 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edildi. Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt evaporatör kullanılarak 40°C'de 75br düşük basınç altında konsantre edildi ve çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.4. WST-1 Sitotoksizite Testi (WST-1 Cytotoxicity Test)

Hazırlanan örnekler MCF-7 ve fibroblast hücreleriyle inkübe edilerek WST-1 hücre canlılık testine tabi tutuldu. Bu amaçla 5x10³ hücre/ml derişiminde hazırlanan hücreler 96 kuyucuklu plakalara ayrı ayrı ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda hazırlanan örnekler besiyeri ile farklı derişimlerde (1, 0.5, 0.25 µg/ml) seyreltildi. Taze besiyeri eklenip üzerlerine de WST-1 çözeltisi (10µl) ilave edilerek etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı kısımlar temiz başka bir plaka içerisine alınarak 440 nm ELİSA mikro-plaka (Biotek, İngiltere) okuyucuda okutuldu. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları alınıp, hücre canlılığı hesaplandı (Değirmenci, 2016).

3.5. İkili Boyama) İle Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

(Determination of Apoptosis and Necrosis by Doublestaining)

Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda *Suillus collinitus*'un konsantrasyonları 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml olarak çalışıldı. Uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin vasatları atıldı, her kuyucuğa 70ul ikili boyama solüsyonu damlatıldı ve 15 dk karanlıkta inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından florasanataçmanlı mikroskopla FITC ve DAPI filtresinde inceleme yapıldı. Tüm görüntüler 20X büyütmede çekildi (Değirmenci, 2016).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA (FINDINGS AND DISCUSSIONS)

4.1. Kültür Çalışmaları (Culture Studies)

4.1.1. Katı Kültür Çalışmaları (Studies of Agar Media)

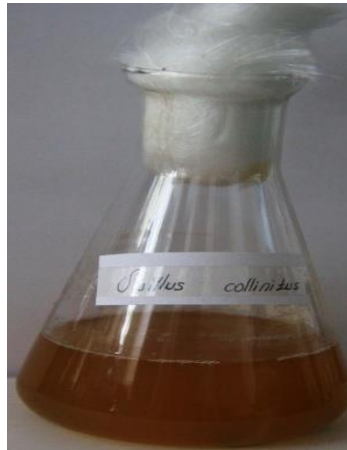
Malt extrat agarlı ortama ekimi yapıldıktan sonra misel gelişimini 7 günde tamamlayan *Suillus collinitus* mantarının hava hifi oluşturmadığı ancak çok yoğun geliştiği gözlemlendi. Pigmentasyon oluşmadı (Şekil 1).



Şekil 1. *Suillus collinitus*'un morfolojik yapısı
(Figure 1. Morphological structure of *Suillus collinitus*)

4.1.2. Sıvı Kültür Çalışmaları (Studies of Broth Media)

Sekonder misellerden alınan 5 pelet nutrient broth'a aşılama yapılarak 27°C 140 rpm'de 7 gün inkübe edildi (Şekil 2).

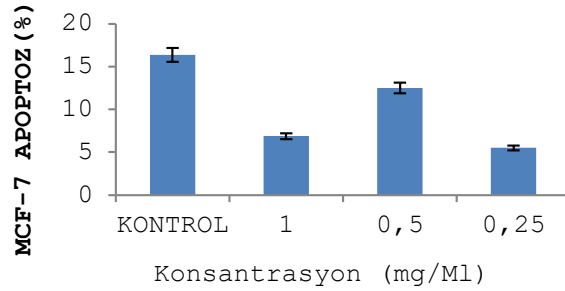


Şekil 2. Nutrient broth da *Suillus collinitus*
(Figure 2. *Suillus collinitus* on nutrient broth)

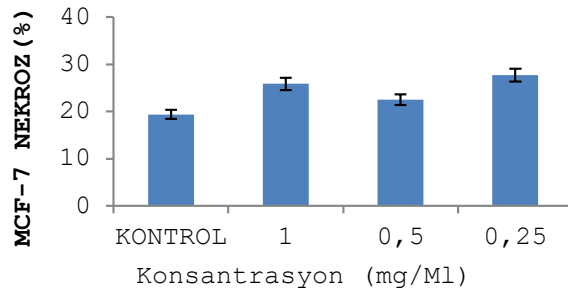
4.2. Hücre Kültür Çalışmaları (Cell Culture Studies)

Sekonder miseller 27°C, 140 rpm'de 7 günde geliştirildi, Soxlet cihazına yerleştirildi, 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edilerek mantar özütleri elde edildi. *Suillus collinitus* mantarının ekstraksiyonu sonucu özütü hücre kültür laboratuvarında konsantrasyonları 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml olacak şekilde MCF-7 ve

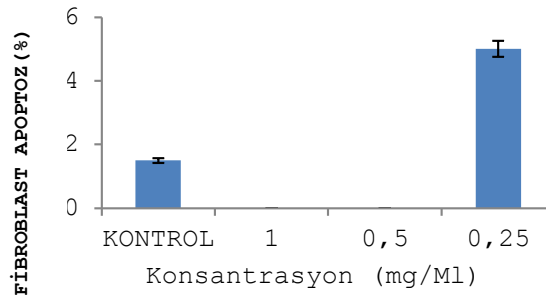
L929 Fibroblast hücrelerine uygulanan ve elde edilen sonuçlar Grafik 1, 2, 3 ve 4'de verilmiştir.



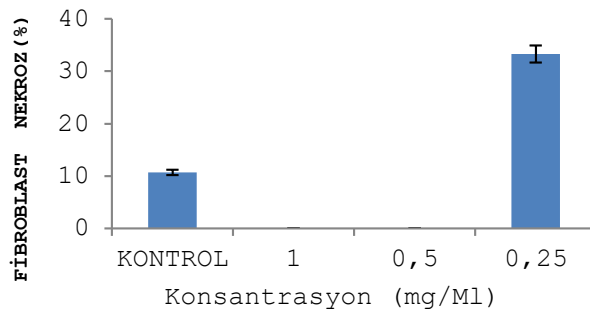
Grafik 1. MCF-7 hücresinin apoptoz durumu
(Graphic 1. The apoptosis situation of MCF-7 cell)



Grafik 2. MCF-7 hücresinin nekroz durumu
(Graphic 2. The necrosis situation of MCF-7 cell)



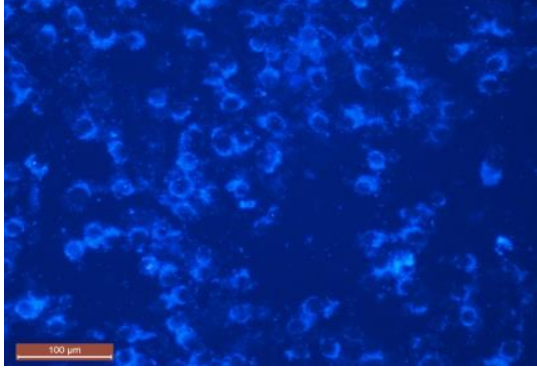
Grafik 3. L929 Fibroblast hücresinin apoptoz durumu
(Graphic 3. The apoptosis situation of L929 Fibroblast cell)



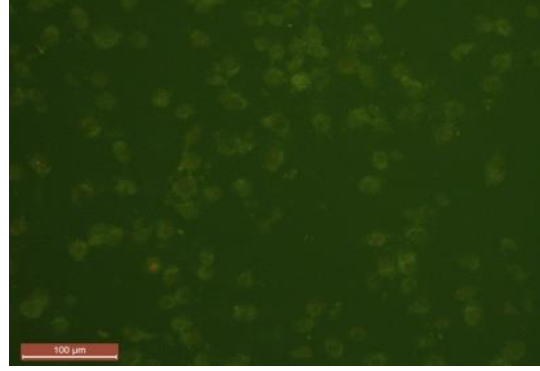
Grafik 4. L929 Fibroblast hücresinin nekroz durumu
(Graphic 4. The necrosis situation of L929 Fibroblast cell)

4.3. Apoptozis ve Nekrozis (Apoptosis and Necrosis)

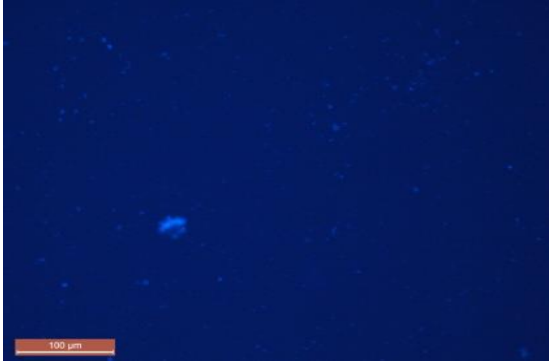
Hücre kültürü çalışmaları sonucunda MCF-7 hücre hattında hücreleri yok ettiği ve L929 Fibroblast hücre hattına zarar vermediği saptanmıştır. Örnekte %86 oranında apoptik ve nekrotik etki gözlemlenmiştir (Şekil 3, 4, 5 ve 6).



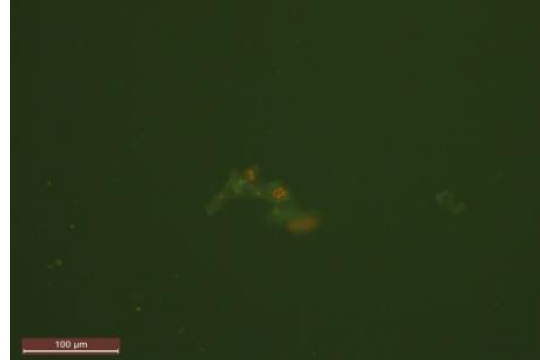
Şekil 3. L929 Fibroblast. 1mg/ml
(Nekroz)
(Figure 3. L929 Fibroblast. 1mg/ml
(Necrosis))



Şekil 4. L929 Fibroblast. 1mg/ml
(Apoptoz)
(Figure 4. L929 Fibroblast. 1mg/ml
(Apoptosis))



Şekil 5. MCF-7 1 mg/ml
(Nekroz)
(Figure 5. MCF-7 1 mg/ml
(Necrosis))



Şekil 6. MCF-7 1 mg/ml
(Apoptoz)
(Figure 6. MCF-7 1 mg/ml
(Apoptosis))

Çalışmada, *Suillus collinitus* mantarının MCF-7 ve L929 Fibroblast hücre hatlarına farklı dozlar kullanılarak hücrelerin apoptoz ve nekroz durumları incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda MCF-7 hücre hattında 1mg/ml dozda hücrelerin öldüğü, aynı dozda L929 Fibroblast hücre hattına zarar vermediği saptanmıştır. Üç farklı doz yapılan çalışmamızda dozlar azaltıldığında MCF-7 hücre ölümlerinin azaldığı, ancak hücrelerde apoptoz ve nekroz'a rastlandığı tespit edilmiştir. Bu bulgular Josiana A. Vaz ve ark. 2012 'nın sonuçları ile uyum içerisindedir. Araştırmacılar *Suillus collinitus* mantarının p53 geni üzerindeki aktivitesinin yüksek olduğunu belirlemiştir. Çalışmanın sonucunda doz arttığında MCF-7 hücrelerinin öldüğü, L929 Fibroblast hücrelerinin apoptoz ve nekroza uğramadıkları belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda mantarın daha etkili olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında mantarların günümüzde ve gelecekte sağlık alanında daha etkin kullanılabileceği düşünülmektedir (Josiana ve ark., 2012).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS)

Suillus collinitus makromantarı zehirsiz ve yenilebilir olmasına rağmen ülkemizde tüketimi yapılmamaktadır. Makromantarların antitümör, antiviral, antikanser, antioksidan etkileri Dünyada geniş bir yer bulmasına karşın ülkemizde çok fazla bilinmemektedir. Bu çalışma ile *Suillus collinitus* mantarının kanserli hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda aktivitesinin yüksek olduğunu, günümüzde oldukça yaygın hale gelen kansere karşı yok edici etki yapması nedeniyle alternatif tıpta kullanılabileceği önerilmektedir.

NOT (NOTE)

Bu çalışma, Ferit Arpaz'ın Yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümü olup Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından 2015/107 numaralı proje ile desteklenmiştir. Ayrıca Bu çalışma 5-8 Eylül 2017 tarihinde Tiflis-Gürcistan'da düzenlenen "2. International Science Symposium (ISS2017)" sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Akbaş, G., (2010). *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers.'nın Antioksidan, Antimikrobiyal Etkilerinin ve Yağ Asidi Kompozisyonun Belirlenmesi' Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Bayuk, B.G., (2016). Acıpayam Denizli Yöresinde Yetişen Makrofunguslar Üzerine Taksonomik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Bayuk, B.G., Gezer K., and Kaygusuz, O., (2016). Mushrooms Reported from Denizli Province and Nutrient Content. International journal of Secondary Metabolite vol:3, pp:27-28.
- Çöl, B., Balcı, E., Güneş, H., and Allı, H., (2017). *Schizophyllum commune* Fr. Türünden Misel Eldesi, Moleküler Tanımlanması ve Antitümör Etkisinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. Cilt:21, sayı:2.
- Değirmenci, E., (2016). *Lepista nuda*'dan Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Fritsche, G., (1972),. Experiments on the Maintenance of Strains of Cultivated Mushrooms. III. Propagation of by Multispore Culture. Mushroom News, 20(8):4-19.
- Josiana, A.V., Isabel, C.F.R.F., Catarina, T., Gabriela M. A., Anabela, M., and Helena, V., (2012). *Suillus collinitus* Methanolic Extract Increases p53 Epression and Causes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in a Breast Cancer Cell Line.
- Kalyoncu, F., Oskay, M. ve Kalmış, E., (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.
- Karakaya, D., (2012). Makrofungusların Antimikrobiyal Aktiviteleri Ve Diğer Tıbbi Etkileri, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitirme Ödevi. T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Öztürk, A. ve Çopur Ö.U., (2009). Mantar Bileşenlerinin Teröpatik Etkileri. Bahçe, 38(1):19-24.
- Saldır, Y., (2015). Bazı Mantarların Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.



-
- Yakupoğlu, G. ve Pekşen, A., (2011). Çay Atığından Hazırlanan Farklı Kompost ve Partikül Büyüklüđünün *Ganoderma lucidum* Mantarının Verimi ve Bazı Morfolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. *Ekoloji* 20(78):4147.