



**Aydın Keskin, Perihan Güler, Mustafa Türk**  
Kırıkkale University, Kırıkkale-Turkey  
dr.emelkeskin@windowslive.com; perihanguler71@gmail.com;  
mtrk.35@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0014>

**LAETIPORUS SULPHUREUS (BULL.) MURRILL'UN SİTOTOKSİTE, APOPTİK VE NEKROTİK ETKİLERİ**

**Öz**

Çalışmada, *Laetiporus sulphureus*'un sitotoksite, apoptik ve nekrotik etkileri incelenmiştir. Laboratuvardaki basidiokarplardan alınan parçalar malt ekstrakt agarda doku kültürü yöntemiyle geliştirildi. Primer ve sekonder miseller 27°C'de, karanlıkta, 10 gün süreyle inkübe edilerek elde edildi. Sekonder misellerden 3'er pelet nutrientbroth'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 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/ml olarak uygulandı. WST-1 solüsyonu eklenerek inkübasyon sonucunda 440nm 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. Kullanılan 0.25 dozajda MCF-7 hücre hatlarında %10 sitotoksitite gözlenmiş. Kullanılan tüm dozajlarda L929 Fibroblast hücre hatlarında canlılık oranları artmıştır. Örneklerde apoptik ve nekrotik etki gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Laetiporus sulphureus*, Kanser, Sitotoksite, Apoptik Etki, Nekrotik Etki

**THE CYTOTOXIC, APOPTOTIC AND NECROTIC EFFECCTS OF LAETIPORUS SULPHUREUS (BULL.) MURRILL**

**ABSTRACT**

In the study, cytotoxicity, apoptotic, necrotic effects of *laetiporus sulphureus* were investigated. Taken parts from the basidiocarps in the laboratory were developed with tissue culture on malt extract agar. The primary and the secondary mycelium were obtained by incubation at 27°C in the dark for 10 d. Three 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 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/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. Ten percent toxicity was observed at 0.25mg/ml dosage used in MCF-7 cell line, At all dosages used, viability rates were increased in L929 Fibroblast cell lines. Apoptotic and necrotic effects were observed in the samples.

**Keywords:** *Laetiporus sulphureus*, Cancer, Cytotoxicity, Apoptotic Effects, Necrotic Effects

**How to Cite:**

Keskin, A., Güler, P. ve Türk, M., (2017). *Laetiporus Sulphureus* (Bull.) Murrill'un Sitotoksite, Apoptik ve Nekrotik Etkileri, Life Sciences (NWSALS), 12(4):64-71, DOI: 10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0014.



## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Mantarlar biyosferde böceklerden sonra gelen tür çeşitliliği bakımından en büyük ikinci organizma grubu olmasına karşın fungal çeşitlilik hakkında bilgiler çok azdır. Dünya genelinde 1.5 milyon fungus türü olduğu tahmin edilirken bu sayının 5.1 milyon türden fazla olabileceği öngörülmüştür (Adanacioğlu ve ark., 2016). Dünya nüfusunun hızla artması beslenme ve sağlıkla ilgili sorunları artırırken insanların alternatif kaynaklara yönelmesine neden olmuştur. Dünyada yenilebilir 5000 mantar türü bulunmaktadır (Öztürk ve ark., 2009). Ülkemizde bulunan makrofunguslar en önemli doğal kaynaklardandır (Duman ve ark., 2003). Mantarların özellikle doğu kültüründe has kokuları ve yumuşak yapıları nedeniyle çay ve besleyici gıda olarak (Karakaya, 2012), aynı zamanda değişik hastalıkların tedavisinde halk ilacı olarak tüketildiği çeşitli kaynaklarda bulunmaktadır (Duman ve ark., 2007). Makro mantarlar gıda olarak kullanılmanın yanında kozmetik, endüstri, tıp ve ilaç sanayinde de kullanılmasıyla yüksek ekonomik değer taşımaktadır (Adanacioğlu ve ark., 2016). Yenilebilir mantarlar diyet lif kaynağı olup hücre duvarında bulunan kitin, hemiselüloz, mannan ve  $\beta$ -glukanlar içerir (Akyüz ve ark., 2007). Tıbbi mantarlar çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bileşikleri yapılarında bulundurulur. İçeriklerinde bulunan aktif maddeler antibiyotik, antiviral, antitümör, antiinflamatuvar, antiprotozoal, iç dengenin onarımında, biyoregülasyonda, biyoritmin düzenlenmesinde, kanser, inme kalp hastalığı, AIDS gibi hastalıkların tedavisinde sağlığa yararlı olduğu düşünülmektedir (Çöl ve ark., 2017). Çalışmamızın materyali *Laetiporus sulphureus* ağaçlar üzerinde yetişen Basidiomycetes sınıfında yer alan bir mantar türü olup *Laetiporus* türleri N-methylated tyramine türevleri, polisakkaritler, birçok lanostane triterpenoid, laetiporik asit ve diğer metabolitler içerir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu ticari mantarın antitümör, antiviral ve immün sistem düzenleyici tıbbi etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir. (Karakaya, 2012). Bu çalışma; *Laetiporus sulphureus*'un sitotoksite, apoptik ve nekrotik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

## 2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Günümüzün en ciddi sağlık problemlerinden biri olan kanserden her yıl milyonlarca insan ölmektedir. Karışık ve anlaşılması zor olan kanserleşme süreci yoğun olarak araştırılmaktadır. Kanser tedavisinde birçok kemoterapi ilacı veya moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar henüz beklenen oranda tedaviye cevap vermemektedir. Bu nedenle doğal ürünlerin kansere karşı etkisi ciddi bir araştırma konusu olmuştur (Sezgin, 2010). Son yıllarda yapılan araştırmalar mantarlardan izole edilen moleküllerin kanserin farklı mekanizmalarına etki ettiğini göstermiştir. Bu çalışma mantarların kansere karşı fizyolojik etkilerinin daha iyi anlaşılması ve kanserin farklı mekanizmalarına etkilerinin belirlenmesi açısından önemlidir.

## 3. DENEYSEL ÇALIŞMA (EXPERIMENTAL METHOD)

### 3.1. Organizma (Organism)

Bu çalışmada Basidiomycetes sınıfında yer alan *Laetiporus sulphureus* kullanılmıştır. Örnekler 2011 yılında Kırıkkale'nin Çelebi ilçesinden toplanmıştır ve Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Koruma Biyolojisi, Mikoloji, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

### **3.2. Kültür Çalışması (Culture Study)**

#### **3.2.1. Katı Besiyerdeki Çalışmalar (Studies in Solid Medium)**

*Laetiporus sulphureus*'un suşlarından aseptik şartlarda alınan doku parçaları malt ekstrakt agar (MEA) besiyeri üzerine aşılandı ve 27°C' de 10 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 in Broth Medium)**

Katı kültür ortamında gelişimini tamamlayan sekonder misellerden 3'er pelet alınarak sıvı kültür ortamında nutrient broth'da 27°C'de 140 rpm'de 7 günde gelişmeye bırakıldı.

#### **3.3. Ekstrelerin Hazırlanışı (Preperation of Extracts)**

Nutrient broth'da gelişimini tamamlayan numuneler Soxhlet 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 Sititoksisite Testi (WST-1 Cytotoxicity Test)**

WST-1 substratı kullanılarak canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolyum halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristallerini oluşturur. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Hazırlanan örnekler MCF-7 ve fibroblast hücreleriyle inkübe edilerek WST-1 hücre canlılık testine tabi tutuldu. Bu amaçla  $5 \times 10^3$  hücre/ml derişiminde hazırlanan hücreler 96 kuyucuklu plakalara ayrı ayrı ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda hazırlanan örnekler besiyeri ile farklı derişimlerde (0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/ml) seyreltildi. Taze besiyeri eklenip üzerlerine de WST-1 çözeltisi (10µl) ilave edilerek etüvde 4 saat boyunca 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.

#### **3.5. İkili Boyama İle Apoptoz Ve Nekrozun Belirlenmesi**

##### **(Determination of Apoptosis and Necrosis by Doublestaining)**

Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. *Laetiporus sulphureus* konsantrasyonları 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/ml olacak şekilde çalışıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 100ul fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 10ul WST-1 solüsyonu ilave edildi ve 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda 440nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. Kontrol grubu olarak kuyucuklara sadece besi ortamı ilave edildi.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA (FINDINGS AND DISCUSSIONS)

##### 4.1. Kültür Çalışmaları (Culture Studies)

##### 4.1.1. Katı Besiyerdeki Çalışmalar (Studies in Solid Medium)

Malt ekstrakt agarlı besi ortamına ekimi yapılan *Laetiporus sulphureus*'un doku parçaları 10 gün süreyle gelişimini tamamlayarak hava hifi oluşturmadığı ve bir süre sonra koloni kenarlarında açık sarımsı-kahverengi pigmentasyon oluşturduğu gözlemlendi.



Şekil 1. MEA besiyerinde *Laetiporus sulphureus*  
(Figure 1. *Laetiporus sulphureus* on MEA)

##### 4.1.2. Sıvı Besiyerindeki Çalışmaları (Studies in Broth Medium)

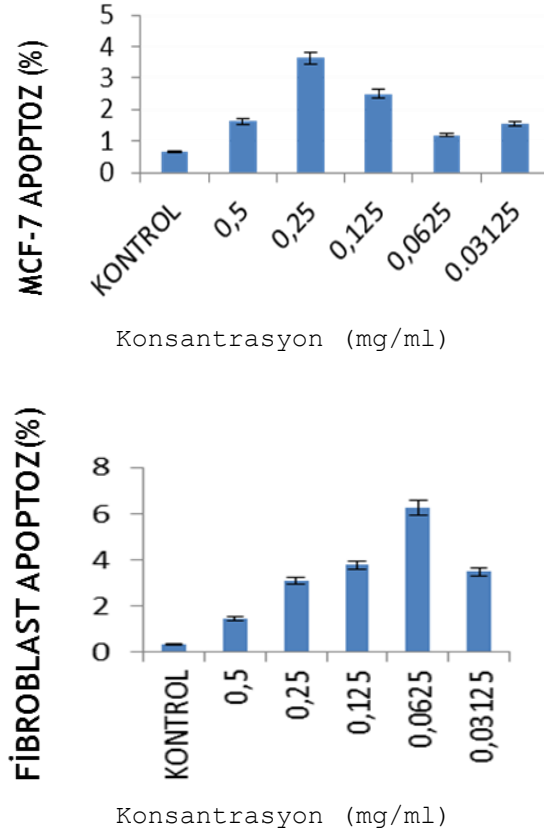
Sekonder misellerden alınan 3'er pelet nutrient broth'a aşılama yapılarak 27°C 140 rpm' de 7 gün süreyle inkübe edildi (Şekil 2).



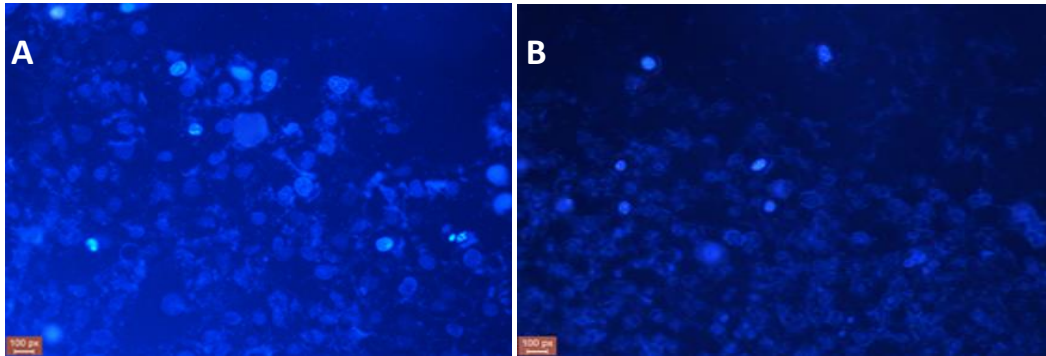
Şekil 2. Nutrient broth besiyerinde *Laetiporus sulphureus*  
(Figure 2. *Laetiporus sulphureus* on nutrient broth)

#### 4.2. Hücre Kültür Çalışmaları (Cell Culture Studies)

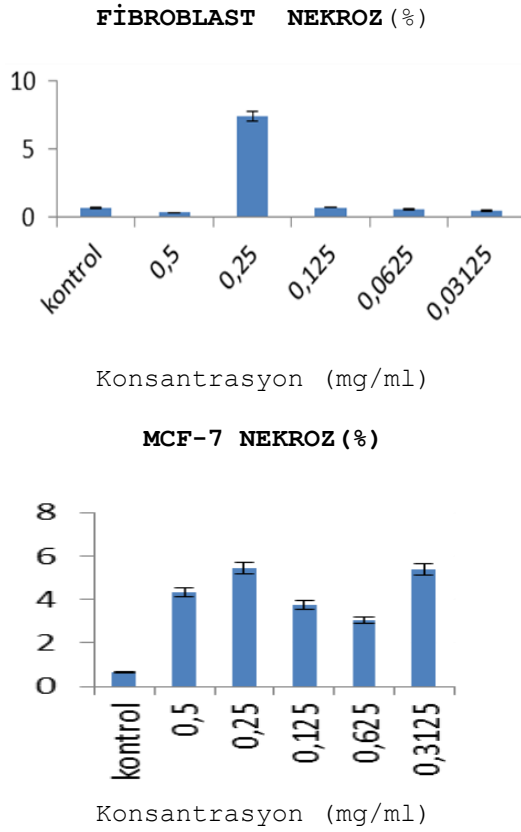
Sekonder miseller 27°C 140 rpm'de 7 gün sonunda geliştirildikten sonra Soxlet cihazına yerleştirilerek 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edilerek mantar özütleri elde edildi. *Laetiporus sulphureus* mantarının ekstraksiyonu sonucu özütü hücre kültür laboratuvarında konsantrasyonları 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml olacak şekilde MCF-7 ve L929 Fibroblast hücrelerine uygulandı. MCF-7 ve L929 hücrelerinin apoptoz sonuçları Şekil 3 ve Şekil 4'de, nekroz sonuçları Şekil 5 ve Şekil 6'da verildi.



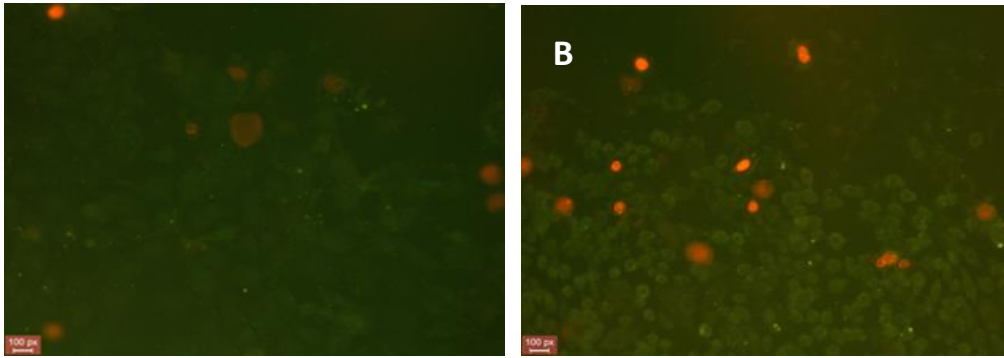
Şekil 3. MCF-7 ve L929 hücrelerinin apoptoz sonuçları  
(Figure 3. The apoptosis results of MCF-7 and L929 cells)



Şekil 4. MCF-7 ve L929 hücrelerinin apoptoz görüntüleri A- MCF-7, B- L929  
(Figure 4. The apoptosis images of MCF-7 and L929 cells) A- MCF-7, B- L929)



Şekil 5. MCF-7 ve L929 hücrelerinin nekroz sonuçları  
(Figure 5. The necrosis results of MCF-7 and L929 cells)



Şekil 6. MCF-7 ve L929 hücrelerinin nekroz görüntüleri A- MCF-7, B-  
L929  
(Figure 6. The necrosis images of MCF-7 and L929 cells) A- MCF-7, B-  
L929)

*Laetiporus sulphureus* mantarının etanol ekstresinin MCF-7 kanser hücresi hatlarında düşük sitotoksosite göstermesine rağmen fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etki gözlenmedi. Leon ve ark., (2004) yaptıkları araştırmada *Laetiporus sulphureus* mantarından izole edilen triterpenin HL-60 insan lösemi hücrelerinde apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını göstermişlerdir. Yin ve ark., (2015); *Laetiporus sulphureus* mantarından izole edilen steroid türü triterpenler farklı insan kanser hücresinde denemiş inhibe edici etkilerini belirmişlerdir.



*Laetiporus sulphureus* mantarının kanser üzerine araştırmaları çok azdır. Kanser üzerine etkilerini belirlemek için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır.

##### 5. SONUÇ VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS)

Çalışmamızda, *Laetiporus sulphureus* mantarının MCF-7 ve L929 Fibroblast hücre hatlarına farklı dozajlar kullanılarak hücrelerin apoptoz ve nekroz durumları incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda MCF-7 hücre hattında 0.25mg/ml dozda yüzde 10 canlılığı azaltmıştır. Kullanılan tüm dozlarda L929 Fibroblast hücre hatlarında hücre canlılıkları artmıştır. Hücrelerde apoptoz ve nekroz'a rastlandığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hatlarında toksisite düşük oranda gözlenmesine rağmen fibroblast hücre hatlarında tüm dozlarda hücre canlılıklarının artması dikkat çekicidir. Mantarların son yıllarda kansere karşı etkileri bilinmesine rağmen ülkemizde araştırmalar yok denecek kadar azdır. Mantarların kanserin farklı mekanizmalarına karşı çalışmaların arttırılması ile umut verici sonuçlara ulaşacağımıza inanmaktayız.

##### NOT (NOTE)

Bu alışma Aydın Keskin'in Yüksek Lisans tezinin bir bölümüdür ve Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından 2015/107 numaralı proje ile desteklenmiştir. Ayrıca bu alışma, 5-8 Eylül 2017 tarihinde Tiflis-Gürcistan'da düzenlenen "2. International Science Symposium (ISS2017)" sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

##### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Adanacıoğlu, N., Yıldız, Ü., Oğur, E., Aykas, L., Tan, A. ve Taylan, T., (2016). Türkiye Makromantarlar Genetik Kaynaklar 1. Ege Bölgesi. Anadolu, J. of Arı, 26(1), 2016, 46-61.
- Akyüz, M. ve Kırbağ S., (2007). Ülkemizde Sebze ve Meyvelerin Yanı Sıra Alternatif Besin Kaynağı: Yabani Mantar (*Pleurotus eryngii* var. *ferulae*) Artvin Çoruh Üni. Orman Fakültesi Dergisi, 8(1), 26-36.
- Çöl, B., Balcı, E., Güneş, H. ve 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.
- Duman, R., Doğan, H.H., and Ateş, A., (2003). *Morchella conica*(Pers) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray Makrofunguslarının Antimikrobiyal aktiviteleri. S.Ü. Fen Ed Fak Fen Dergisi, Sayı 22, 19-24.
- Fritsche, G., (1972). Experiments on the Maintenance of Strains of Cultivated Mushrooms. III. Propagation of by Multispore Culture. Mushroom News, 20, 8, 4-19.
- Karakaya, D., (2012). Makrofungusların Antimikrobiyal Aktiviteleri Ve Diğer Tıbbi Etkileri, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitirme Ödevi. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- León, F., Quintana, J., Rivera, A., Estévez, F., and Bermejo, J., (2004). Lanostanoid Triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and Apoptosis Induction on HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells. J Nat Prod. Dec; 67(12):2008-11.
- Öztürk, A. ve opur, Ö.U., (2009). Mantar Bileşenlerinin Teröpatik Etkileri. Bahçe, 38(1)19-24.



- 
- Sezgin, C., (2010). Kanserde Bitkisel Tedavilerde Örnek Uygulamalar, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, İstanbul, s:73.
  - Yin, X., Li, Z.H., Li, Y., Feng, T., and Liu, J.K., (2015). Four Lanostane-type Triterpenes from the Fruiting Bodies of mushroom *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *J Asian Nat Prod Res.* 2015;17(8):793-9.