



Hayriye Baran, Perihan Güler, Mustafa Türk

Kırıkkale University, Kırıkkale-Türkiye

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

<http://dx.doi.org/10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0012>

RUSSULA DELICA FR.'NİN SİTOTOKSİTE, APOPTİK VE NEKROTİK ETKİLERİ

ÖZ

Russula delica Fr.'nin sitotoksit, 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 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 sitotoksit, apoptik ve nekrotik çalışmalar için hazırlandı. Sitotoksit çalışmalarında, ekstrakt MCF-7 ve L929 Fibroblast hücrelere örnek konsantrasyonları 5mg/ml, 2,5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml, 0.315mg/ml olarak uygulandı. WST-1 solüsyonu eklenecek şekilde inkübasyon sonucunda 440nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorban 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. 5mg/ml de hazırlanan örnekte toksite oranı yüksektir. 2.5mg/ml altında hazırlanan miktarlar arasında bir fark yoktur. Ayrıca kanser ve normal hücrelerin canlılık değerleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Örneklerde herhangi bir apoptik ve nekrotik etki gözlemlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Russula delica*, Kanser, Sitotoksit, Apoptik Etki, Nekrotik Etki

THE CYTOTOXIC, APOPTIC AND NECROTIC EFFECTS of RUSSULA DELICA FR

ABSTRACT

The cytotoxicity, apoptotic, necrotic effects of *Russula delica* 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 days. Three pellets were taken from the secondary mycelium and were completed their growth in 7 days at 140rpm at 27°C in nutrient broth. The samples were prepared for cytotoxic, apoptotic, necrotic studies by extracting at 80°C and 1 hour in ethyl alcohol at soxlet device. In cytotoxic studies, sample concentrations for extract MCF-7 and L929 fibroblast cells were applied as 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml, 0.315mg/ml respectively. The WST-1 solution was added and the absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 440nm at the end of the incubation. Apoptosis and necrosis were detected in the same cell line as the double staining experiment. Binary staining solution was prepared and MCF-7 and L929 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. The sample prepared at 5mg/ml has a high toxicity ratio. There is no difference between the amounts prepared under 2.5mg/ml. There was no significant difference between the viability values of cancer and normal cells. No apoptotic and necrotic effects were observed in the samples.

Keywords: *Russula delica*, Cancer, Cytotoxicity, Apoptotic Effects, Necrotic Effect

How to Cite:

Baran, H., Güler, P. ve Türk, M., (2017). *Russula Delica* Fr.'Nin Sitotoksit, Apoptik ve Nekrotik Etkileri, Life Sciences (NWSALS), 12(4):48-55, DOI: 10.12739/NWSA.2017.12.4.4B0012.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Mantarlar gerçek köke sahip olmayan, yaprakları ve çiçekleri bulunmayan doğada tek hücreli ve çok hücreli olarak bulunabilen ökaryotik canlılardır. Mantar tüketimi insanoğlunun avcılık ve toplayıcılık yaptığı zamanlara dayanmaktadır (Wani ve ark., 2010). İlk kavimler, deneme yanılma yoluyla yenilebilen ve yenilemeyen zehirli mantarlar hakkında bilgi sahibi olmuşlardır (Smith ve ark., 2002). Dünya nüfusunun hızla artmasına karşılık olarak birçok ülkede özellikle Çin, roma ve yunan medeniyetlerinde makrofungusların ilaç ve besin kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalar makrofungusların antimikrobiyal, antiviral antifungal antiprotozoal antitümör ve daha başka etkilere sahip maddeler içerdikleri tespit edilmiştir (Duman ve ark., 2003). Tıbbi amaçla kullanılan pek çok mantar türü sahip olduğu besin ve bileşenlerinde bulunan etken maddelerin ekstrakte edilmesiyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Conchran, 1978).

Tıbbi özellikleri için analiz edilen *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Agaricus blazei*, *Cordyceps militaris*, *Pleurotus ostreatus*, *Hericium erinaceus* mantar türlerinin polisakkaritler oligosakkaritler, peptitler alkoller, fenoller vitaminler aminoasitler başta olmak üzere birçok aktif bileşeni içerdiği tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin bağışıklık sistemini güçlendirdiği anti kanserojen ve kolesterol düşürücü özelliğe sahip olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Ayrıca mantarlar içeriğinde bulunan yağ ve kalori değerleri bakımından düşük fakat protein, mineral ve diyet lifleri bakımından zengindir (Akyüz ve ark 2007). İçerdikleri kalvasin, volvotoksin, flammütoksin, lentinan ve porisin gibi maddeler antitümör etki göstermektedir (Duman ve ark., 2003). *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus* ve *Flammulina velutipes* gibi tıbbi mantarların kültür ortamlarında birkaç farklı antitümör özellik gösteren polisakkaritleri ürettikleri tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Çalışmamızın materyalini oluşturan *Russula delica*, Russulaceae familyasında yer alan bir mantar türüdür. Halk arasında 'Beyaz Melki', 'Beyaz Çıntar' olarak adlandırılmaktadır (Dülger ve ark., 1997). *Russula delica* Türkiye'de bilinen bir mantar türü olup gıda maddesi olarak tüketilmektedir (Alkan ve ark., 2016). Yurdumuzun bazı bölümlerinde turşusu yapılmaktadır. Ancak lezzeti az olduğundan, etinin sert olması ve çabuk kurtlanmasından dolayı ilgi görmemektedir (Dülger ve ark., 1997).

2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Günümüzde mantarın insan beslenmesi ve sağlığı açısından değerinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte kültür mantarı yetiştiriciliğine olan merak ve ilginin hızlı bir şekilde artış gösterdiği bilinmektedir. Dünya nüfusunun hızla artmasına karşılık olarak birçok ülkede özellikle Çin, roma ve yunan medeniyetlerinde makrofungusların ilaç ve besin kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışma ülkemizin belirli bölgelerinde besin kaynağı olarak tüketilen *Russula delica* Fr. makrofungusunun sitotoksite, apoptik ve nekrotik aktivitesini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA (EXPERIMENTAL METHOD)

3.1. Organizma (Organism)

Bu çalışmada Russulaceae familyasında yer alan *Russula delica* kullanılmıştır. Örnekler 2011 yılında Kırıkkale'nin Sulakyurt ilçesi Faraşlı köyünden toplanmıştır. Numuneler PG366 numarası ile Kırıkkale

Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Koruma Biyolojisi, Mikoloji, Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

3.2. Kültür Çalışması (Cultural Studies)

3.2.1. Katı Besiyerindeki Çalışmalar (Studies on Agar Media)

Russula delica suşlarından aseptik şartlarda bir neşter yardımıyla alınan doku parçaları malt ekstrakt agar (MEA) besiyer 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 (Kalyoncu ve ark., 2010).

3.2.2. Sıvı Besiyerindeki Çalışmalar (Studies on Broth Media)

Katı kültür ortamında gelişimini tamamlayan sekonder misellerden 3'er pelet alınarak sıvı kültür ortamında nutrientbroth'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 soxhlet cihazına yerleştirilerek 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edildi. Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt evaporatör kullanılarak 40°C'de 75brdüşük basınç altında konsantre edildi ve çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

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

Çalışma 96 kuyucuklu plate kullanılarak yapıldı. 48 kuyucuğa 5x10³ adet MCF-7 ve kalan 48 kuyucuğa L929 Fibroblast hücre hattı ekildi. Üzerlerine 1929 fibroblast için %10 foetal bovine serum, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM, MCF-7 için RPMI eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından *Russula delica* konsantrasyonları 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml, 0.315mg/ml olacak şekilde 2 tekrarlı olarak çalışıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı yerine 100ul fenol red içermeyen besiyeri eklendi. Her kuyucuğa 10ul WST-1 solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 440nm dalga boyunda mikroplate okuyucuda absorban ölçümü yapıldı. Kontrol grubu olarak kuyucuklara sadece medium ilave edilir (Değirmenci, 2016).

3.5. İkili Boyama İle Apoptoz Ve Nekrozun Belirlenmesi

(Determination of Apoptosis and Necrosis by Doublestaining)

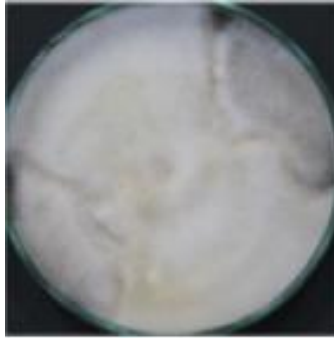
Hücreler HO/PI (Hoechst 33342/Propidium Iodide) yöntemiyle boyanarak apoptotik ve nekrotik etki gösteren ekstraktlar belirlenmiştir. İkili boyama solüsyonu 100ul Ribonükleaz A, 100ul Propidium İodide, 500ul Hoescht 33342 10ml PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. 96 kuyucuklu plate kullanarak, 48 kuyucuğa 5x10³ adet MCF-7 ve kalan 48 kuyucuğa L929 Fibroblast hücre hattı ekildi. Üzerlerine L929 fibroblast için %10 Foetalbovine serum, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM, MCF-7 için RPMI eklendi. Hücreler 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından *Rusula delica* konsantrasyonları 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.625mg/ml, 0.315mg/ml olacak şekilde 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 (Cultural Studies)

4.1.1. Katı Kültür Çalışmaları (Studies of Agar Media)

Russula delica'nın fruktifikasyonlarından alınan doku parçaları malt extract agar (MEA) besiyerine inoküle edilerek karanlıkta 27°C'de 10 gün inkübe edildi. Primer miselyum, agar ortamının merkezine aşılandıktan 48 saat sonra gelişmeye başladı ve gelişme sırasında, miselyum besiyerin orta yüzeyi üzerinde yoğunlaşarak beyaz miselyum gelişti. Hava hifi ve pigmentasyon gözlenmedi. 10 günlük aşılardan sonra, miselyum petri kaplarına tamamen kaplandı ve kolonizasyon tamamlandı (Şekil 1).



Şekil 1. *Russula delica*'nın morfolojik yapısı
(Figure 1. Morphological structure of *Russula delica*)



Şekil 2. *Russula delica*'nın sıvı besiyerindeki gelişimi
(Figure 2. The development of *Russula delica* on broth media)

4.1.2. Sıvı Kültür Çalışmaları (Studies of Broth Media)

Gelişimini tamamlayan sekonder misellerden üçer pelet alınarak nutrient broth'da 27°C' de 140 rpm'de 7 günde çalkalamalı etüvde gelişimini tamamladı ve herhangi bir pigmentasyon gözlemlenmedi (Şekil 2).

4.2. WST-1 Sitotoksosite Testi (WST-1 Cytotoxicity Test)

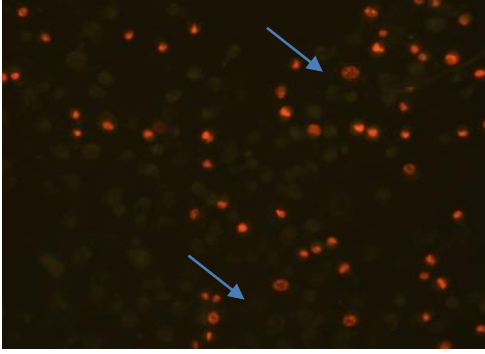
Sitotoksosite testinde toksite, konsantrasyonlara bağlı olarak değişmektedir. 5 mg/ml de hazırlanan örnekte toksite oranı yüksektir. 2.5mg/ml altında hazırlanan miktarlar arasında bir fark yoktur (Tablo 1 ve)

Tablo 1. WST-1 Sitotoksosite canlılık testi
(Table 1. WST-1 Cytotoxicity vivacity test)

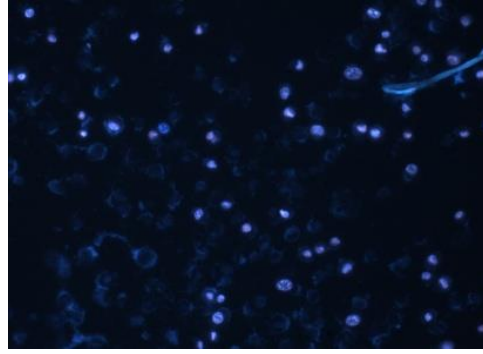
MCF-7	<i>Russula delica</i>	
Konsantrasyon	Absorbans (440nm)	% Canlılık
5 mg/ml	0.523	27.55±0.21
2.5 mg/ml	1.843	97.04±0.04
1.25 mg/ml	1.877	98.83±0.11
0.625 mg/ml	1.877	98.83±0.11
0.315 mg/ml	1.921	101.18±0.01
Kontrol	1.899	100
Fibroblast	<i>Russula delica</i>	
Konsantrasyon	Absorbans (440nm)	% Canlılık
5 mg/ml	0.790	28.17±0.02
2.5 mg/ml	2.408	85.86±0.07
1.25 mg/ml	2.546	90.78 ±0.06
0.625 mg/ml	2.650	94.49±0.20
0.315 mg/ml	2.825	100.75±0.11
Kontrol	2.804	100

4.3. Apoptozis ve Nekrozis (Apoptosis and Necrosis)

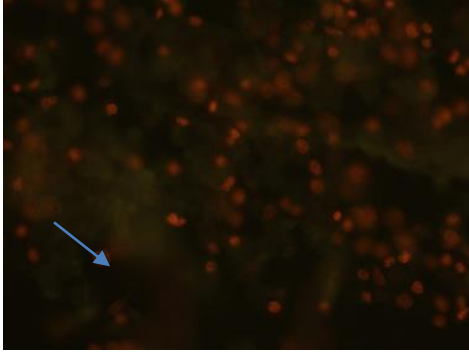
Hücre kültürü çalışmaları sonucunda MCF-7 hücre hattında ve L929 Fibroblast hücre hattına istenilen değerlerde zarar vermediği saptanmıştır. Örneklerde herhangi bir apoptik ve nekrotik etki gözlenmemiştir (Şekil 3, 4, 5 ve 6).



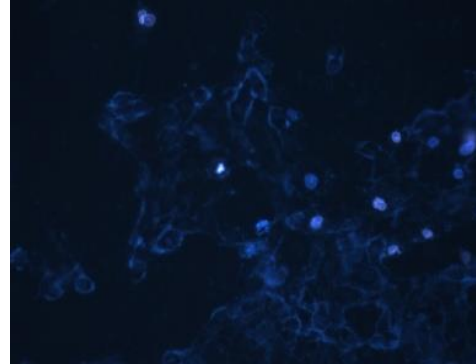
Şekil 3. L929 Fibroblast Apoptoz
(5mg/ml)
(Figure 3. L929 Fibroblast
Apoptosis (5mg/ml))



Şekil 4. L929 Fibroblast Nekroz
(5mg/ml) (Ok=Apoptik hücre)
(Figure 4. L929 Fibroblast Necrosis
(5mg/ml)) (Arrow: Apoptic cell)

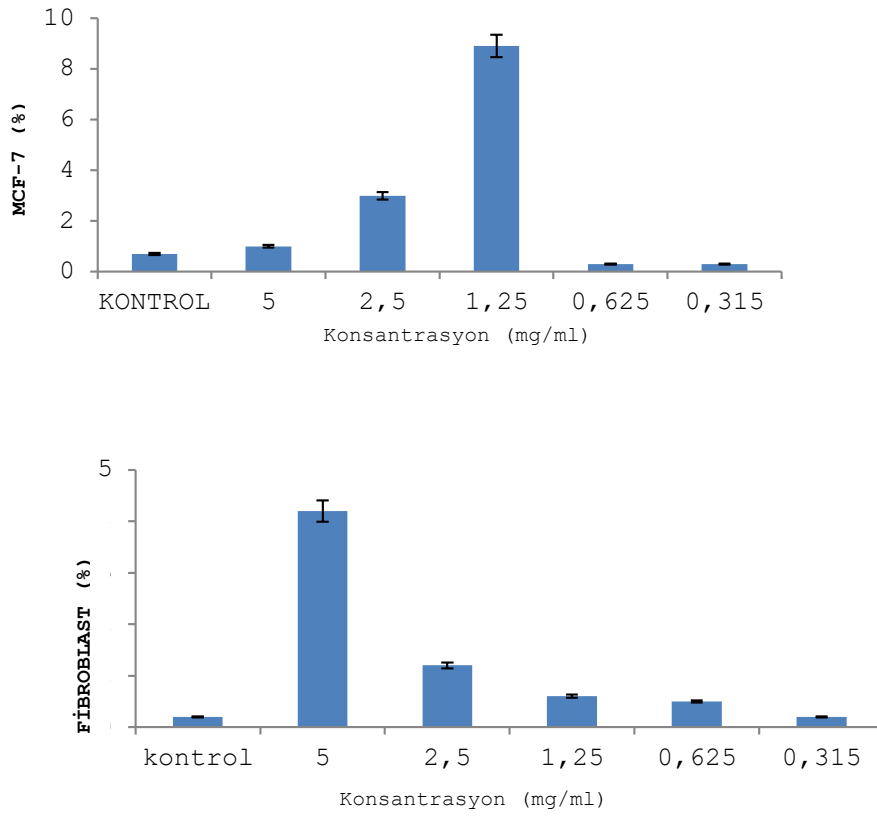


Şekil 5. MCF-7 Apoptoz
(1.25mg/ml)
(Figure 5. MCF-7 Apoptosis
(1.25mg/ml))

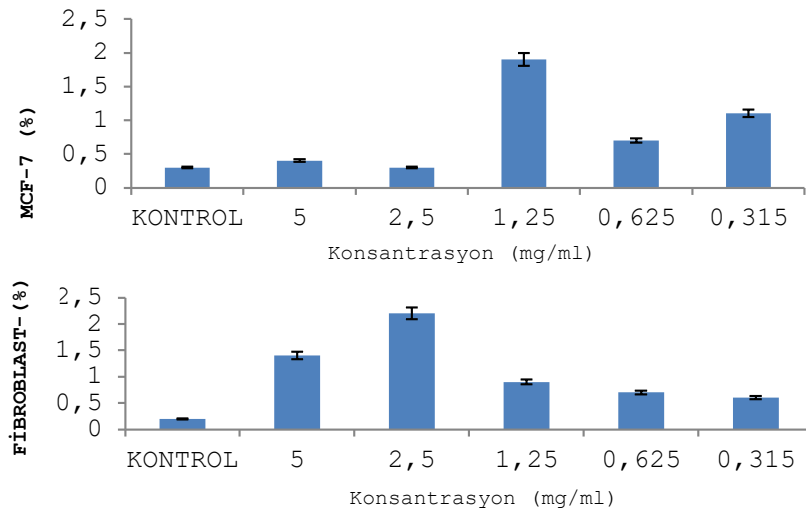


Şekil 6. MCF-7 Nekroz 0.315mg/ml
(Ok=Apoptik hücre)
(Figure 6. MCF-7 Necrosis 0.315mg/ml)
(Ok=Apoptic cell)

Konsantrasyon azaltılan hücrelerin apoptoz ve nekroz durumları, hücre canlılık testleri sonucu grafikteki gibi saptanmıştır (Grafik 1 ve 2).



Grafik 1. L929 Fibroblast ve MCF-1 hücrelerinin nekroz durumu
(Graphic 1. The Necrosis situation of L929 Fibroblast and MCF-1 cells)



Grafik 2. L929 Fibroblast ve MCF-1 hücrelerinin apoptosiz durumu
(Graphic 2. The apoptosiz situation of L929 Fibroblast and MCF-1 cells)

Öztürk ve ark;(2009) *Grifola frondosa* mantarında bulunan β -glukan maddesinin kanser gelişimini azalttığı ve tekrar nükseltmesini ve yayılmasını engelleyici etkiye sahip olduğu bildirmiştir. Mayell, (2001) mantar araştırmacısı Cun Zhuang'ın 38.000 mantar türünden

ellisinin tıbbi özelliklere sahip olduğunu ve bunlardan *Corilous versicolor* mide ve diğer kanser türlerinin tedavisinde Japonya'da popüler olarak kullanıldığını, Shiitake mantarından elde edilen lentinan maddesinin mide kanserinde kullanıldığı, *Schizophyllum commune* mantarının boğaz kanseri tedavisinde tedavi amaçlı kullanıldığını bildirmiştir. Tıbbi özellikleri için analiz edilen *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Agaricus blazei*, *Cordyceps militaris*, *Pleurotus ostreatus*, *Hericium erinaceus* mantar türlerinin polisakkaritler oligosakkaritler, peptitler alkoller, fenoller vitaminler aminoasitler başta olmak üzere birçok aktif bileşeni içerdiği tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin bağışıklık sistemini güçlendirdiği anti kanserojen ve kolesterol düşürücü özelliğe sahip olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS)

Çalışmamızda, *Russula delica* mantarının MCF-7 ve L929 Fibroblast hücre hatlarına farklı dozajlar kullanılarak hücrelerin apoptoz ve nekroz durumları incelenmiştir. Mantarların günümüzde birçok hastalığın yanı sıra özellikle kansere karşı etkileri bilinmektedir. Ancak ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaların az olması üzüntü vericidir. Çalışmamız bu konuda bundan sonra yapılacak çalışmalara katkıda bulunacaktır.

NOT (NOTE)

Bu çalışma, Hayriye Baran'ın yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümü olup Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2015/107 nolu proje ile desteklenmektedir. Ayrıca bu çalışma 5-8 Eylül 2017 tarihinde Tiflis-Gürcistan'da düzenlenen "2. International Science Symposium (ISS2017)" bilim sempozyumunda sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Akyüz, M. ve Kırbağ S., (2007). Meyvelerin Yanısıra Alternatif Besin Kaynağı: Yabani Mantar (*Pleurotus eryngii* var. *ferulae*). Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, 8(1), 26-36.
- Alkan, S., Kaşık, G., Öztürk, C. ve Aktaş, S., (2016). Çorum İli'nin Yenir Özellikteki Makromantarları. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4(3):131-138.
- Conchran, K.W., (1978). Medicinal Effects, In: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms (Ed. Chung, S.T. and Hayes, W.A.), Academic Pres, New York
- Değirmenci, E.H., (2016). *Lepista nuda*'dan Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Dülger, B., Şen, F., and Gucin, F., (1997). *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi Tr.J. of Biology 23, 127-133.
- Duman, R., Doğan, H.H., and Ateş, A., (2003). *Morchella conica* (Pers) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray Makrofunguslarının Antimikrobiyal aktiviteleri. SDÜ Fen Ed. Fak. Fen Dergisi. 22:19-24.
- Kalyoncu, F., Oskay, M. ve Kalmış, E., (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.



-
- Mayell, M., (2001). Maitake Extracts and Their Therapeutic Potential-A Review. *Alternative Medicine Review*, Vol:6 Number1:48-60.
 - Öztürk, A. and Çopur, Ö.U., (2009). Mantar Bileşenlerinin Teröpatik Etkileri. *Bahçe* 38(1), 19-24.
 - Smith, J.E., Rowan, N.J., and Sullivan, R., (2002). *Medicinal Mushrooms: Their Therapeutic Properties and Current Usage with Special Emphasis on Cancer Treatments*. University of Strathclyde, UK.
 - Wani, BA., Bodha, R.H., and Wani, A.H., (2010). Nutritional and Medicinal Importance of Mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol:4(24), pp:2598-2604.