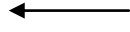




Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PLEUROTUS ERYNGİİ VAR. FERULAE MANTARINDAN
LEKTİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

THOIBA MOGAHİD HUSSEİN SELİMAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. NURTEN ÖZSOY**

**BIYOKİMYA ANABİLİM DALI
BIYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN



ITHAF

Bu tez çalışması beni her zaman destekleyen ve seven anneme, babama, kardeşlerime ve arkadaşlarıma ve tüm Biyokimya bölümündeki ikince aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Mücadele suresinde söylediği gibi "Allah içinizden (gerçekten) iman etmiş olanları ve ilim sahibi olanları yüksek derecelere çıkarsın" her şeyden önce Allah'a olan sonsuz şükürümüzü kabul etmeliyim,

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda sonsuz yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Nurten ÖZSOY'a teşekkür borçluyum.

Mantarları toplayan ve kurutup drog haline getiren, ihtiyacım olduğu zaman deneylerimin aksamaması için hiç zaman kaybetmeden tekrar ve tekrar numune gönderen Munzur Üniversitesi Gıda İşleme Bölümü'nden Sayın Hocam Dr. Öğretim Üyesi Hevidar ALP'a, teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bilimsel tecrübeleri ile bana katkıda bulunan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya, Western Blot analizlerini yapmamda yardımları, sabrı ve büyük desteği olan Arş. Gör. Gülsüm ALTIPARMAK ÜLBEGİ'ye, Arş. Gör. Gülşah Gamze ARCAN'a ve Arş. Gör. Dr. Gözde HASBAL ÇELİKOK'a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan başta Prof. Dr. Nuriye AKEV olmak üzere tüm Öğretim Üyelerine, Yüksek Lisans ve Doktora öğrenci arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde emeklerini, desteklerini, anlayış ve sevgilerini esirgemeyen ve varlıklarından hep güç aldığım aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37626.

İçindekiler

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
RESİMLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİ
ABSTRACT	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tıbbi Mantarlar	5
2.1.1. Mantar Lektinleri	6
2.1.2. Tıbbi Mantarların Terapötik Etkileri	7
2.1.3. <i>Pleurotus</i> Türleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	29
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	31
3.3. <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> Mantarının Toplanması	33
3.4. <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> Mantarından Lektin Elde Edilmesi	33
3.4.1. Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.4.2. Ham ekstrenin hazırlanması	34
3.5. Mantar Ham Ekstresinden Lektinin % 80 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi	34
3.6. % 4'lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması	34
3.7. Hemaglutinasyon Aktivitenin Tayini	35
3.8. Hemaglutinasyon Aktivitenin Hesaplanması	36
3.9. Eringiolizinin Hemoliz Aktivitesi Üzerine Temperaturün ve Bazı Bileşiklerin Etkisinin İncelenmesi	36

3.10. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi - Hemaglutinasyon İnhibisyon Aktivitesi Testi	37
3.11. Bikinkoninik Asid (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	38
3.11.1. Kullanılan çözeltiler	38
3.11.2. Deneyin prensibi	39
3.11.3. Deneyin yapılışı	39
3.11.4. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	39
3.12. DEAE Sefaroz-4B Anyon Değiştirici Kromatografisi	40
3.12.1. Kullanılan çözeltiler	40
3.12.2. Prensibi:	40
3.12.3. Yapılışı	41
3.13. Sefadeks G-100 Jel Filtrasyonu Kromatografisi	41
3.13.1. Prensibi	41
3.13.2. Yapılışı	42
3.14. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE):	42
3.15. Molekül Ağırlığı Tayini	42
3.16. Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi.....	43
3.17. Anti-inflamatuar Etkinin İncelenmesi	43
3.17.1. Hücre kültürü	43
3.17.2. Supernatantların Hazırlanması	44
3.17.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
3.17.4. Western Blot Analizi	52
3.17.5. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
4.1. <i>Pleurotus eryngii</i> var <i>ferulae</i> mantarından elde edilen lektinin saflaştırılması	56
4.2. Eringiolizin hemaglutinasyon aktivitesinin temperatur ve bazı bileşikler tarafından inhibisyonun incelenmesi.	59
4.3. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi.....	60
4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	61
4.5. Antiinflamatur aktivitesinin incelenmesi	62
4.5.1. Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi.....	62
4.5.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sonuçları.....	63
4.5.3. Western Blot Analiz Sonuçları	65

5. TARTIŞMA.....	68
KAYNAKLAR.....	73
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	87



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> mantarından lektinin saflaştırma evrelerindeki hemaglutinasyon titreleri	57
Tablo 4-2: <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> mantarından (30 g toz) lektinin elde edilme basamakları.....	57
Tablo 4-3: PEFL'in özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları.....	60
Tablo 4-4: RAW 264,7 hücrelerinde pefl'in hücre ölümü üzerine etkisi.	63
Tablo 4-5: PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ VE IL-10 parametrelerinin değerlendirilmesi.....	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: NF- κ B yolağı (Chen ve ark., 2018).	10
Şekil 2-2: NF- κ B dimerleri tarafından, değişik uyaranlara cevap olarak proliferasyon faktörlerini, NF- κ B, apoptoz ve immün düzenleyicilerini kodlayan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi (Prescott ve ark., 2021).	11
Şekil 2-3: MAPK yolağı (Chen ve ark., 2018).	12
Şekil 2-4: Hücre siklusunun kontrol noktaları (Cabadak, 2008).	13
Şekil 2-5: p53'ün görevi (Corte-real ve ark., 2008).	15
Şekil 2-6: TLR sinyal yolu (Chen ve ark., 2018).	19
Şekil 2-7: LPS veya DAMPS ile intraselüler yolların aktivasyonu (Kundakci ve Pirat, 2012).	19
Şekil 2-8: Naif T hücrelerinin farklılaşması (Matricon ve ark., 2010).	20
Şekil 2-9: İmmunomodülatör etkili mantar bileşiklerin adaptif immün sistemindeki hedefleri (Lull ve ark., 2005).	24
Şekil 2-10: Lektin tarafından T hücrelerin mitojenik aktivasyonu ve Th1, Th2 VE Th17 cevapları (Coelho ve ark., 2017).	25
Şekil 3-1: Arazi çalışması sonucu ulaşılan makrofungusların harita üzerindeki yetiştirme yerleri (Alp, 2020).	33
Şekil 3-2: Mikrotitrasyon plaklarında hemaglutinasyonun gözle değerlendirilmesinin gösterimi.	35
Şekil 3-3: Hemaglutinasyonun aydınlık saha (normal ışık) mikroskobunda lam - lamel arasındaki görünümü.	36
Şekil 3-4: Lektinin hemaglutinasyon aktivitesi tayininde kullanılan deneyin prensibi (Santos ve ark., 2014).	38
Şekil 3-5: Lektinin özgül karbohidrat biriminin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon inhibisyon aktivitesi deneyin prensibi (Santos ve ark., 2014).	38
Şekil 3-6: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi.	39
Şekil 3-7: Biotin-streptavidin ELISA (Sri ve ark., 2019).	47
Şekil 3-8: TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi.	48
Şekil 3-9 : IL-1 β standart eğrisi ve regresyon denklemi.	49
Şekil 3-10: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi.	49

Şekil 3-11: IL-10 standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	50
Şekil 3-12: INF- γ standart eğrisi ve regresyon denklemi.	51
Şekil 3-13: Prostaglandin standart eğrisi ve regresyon denklemi.	52
Şekil 4-1: <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> ham ekstresi % 80 amonyum sülfat kesitinin DEAE Sefaroz-4B kolonundaki elusion grafiği.....	58
Şekil 4-2: DEAE Sefaroz-4B kromatografisi ile elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren elüatin Sefadeks G-100 kolonundaki elüsyon grafiği.	59
Şekil 4-3: SDS-PAGE’de görülen protein bantları.	62
Şekil 4-4: Standart proteinlerin (MW: 11-250 KDA) SDS-PAGE Standart eğrisi ve regresyon denklemi.	62
Şekil 4-5: Gruplara göre hücre süpernatantlarında sitokin seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).	65
Şekil 4-6: LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 hücrelerinde farklı dozlardaki PEFL’in iNOS ve COX-2 proteinleri üzerine etkileri.....	65
Şekil 4-7: PEFL’in LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde COX-2 protein düzeyleri üzerine etkisi (LPS 1 μ g/ml).	66
Şekil 4-8: PEFL’in LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde iNOS protein düzeyleri üzerine etkisi (LPS 1 μ g/ml).	67

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2-1: <i>Pleurotus eryngyii</i> var. <i>ferulae</i>	27
Resim 4-1: 25 mM Na ₃ PO ₄ ile eringiolizinin hemolitik aktivitesinin inhibe edilmesi.....	59
Resim 4-2: PEFL'in özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları	61



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABL:	<i>Agaricus bisporus</i> Lektini
AP-1:	Aktivatör Protein-1
APC:	Antijen Sunan Hücre
C’:	Aktive Olan Compleman
CD:	Farklılaşma Kümesi
CDI:	Siklin-bağımlı Kinaz İnhibitörleri
CDK:	Siklin-bağımlı Serin/Treonin Protein Kinazlar
COX-2:	Siklooksijenaz-2
CR1:	Kompleman Reseptör Tip 1
CR3:	Kompleman Reseptör Tip 3
CSF:	Koloni Uyarıcı Faktör
DAMPs:	Tehlike İlişkili Moleküler Kalıplar
DC:	Dendritik Hücreler
DMEM:	Dulbecco’s Modified Eagles Medium
ELLA	Enzime Bağlı Lektin Metodu
FBS	Fetal Sığır Serum
FcR:	Fc Reseptör
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
GSH:	Glutatyon
HB:	Hemaglutinasyon Birimi
HRP:	Horse Radish Peroxidase
IKK:	IκB Kinaz
IL-4:	İnterlökin-4

IL-4R:	İnterlökin-4 Reseptörü
IL-6:	İnterlökin-6
INF- γ :	İnterferon- γ
IRAK:	MyD88/IL-1R-ilişkili Kinaz
I κ B:	İnhibitör- κ B
iC3b:	Faktör I ile bölünen C3b
iNOS:	İndüklenen Nitrik Oksit Sentaz
LPS:	Lipopolisakkarit
MAPK=Erk:	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz
MAPKK=Mek:	Mitojenle-Etkinleşen Potein kinaz kinaz
MAPKKK=Raf:	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz Kinaz Kinaz
MHC II:	Temel Doku Uyuşmazlık Antijenleri (Major Histocompatibility Complex)
MyD88:	Miyeloid Diferansiyasyon Faktör 88
NF- κ B:	Nükleer Faktör- κ B
NK:	Doğal Öldürücü Hücreler
NLS	Nükleer Lokalizasyon-Sekans
NO:	Nitrik Oksit
PAMPs:	Patojenle İlişkili Moleküler Yapıları (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PDGF:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEFL:	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> Lektini
PGE2:	Prostaglandin E2
PGHS:	Prostaglandin Endoperoksit H Sentaz
PhoSL:	<i>Pholiota squarrosa</i> Lektini
PRR:	Yapı Tanıyan Reseptörler (Pattern Recognition Receptors)

PSP:	Polisakkaropeptidler
RIPA:	Hücre Lizis Tamponu (Radio-Immunoprecipitation Assay)
SAPK1/JNK:	Stres ile Aktive Edilen Protein Kinaz/c-Jun N-terminal Kinazlar
Src RTK	Src Reseptör Tirozin Kinaz
Tc:	Sitotoksik T Lenfosit
TCR:	T-Hücre Reseptörü
TGF:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
Th:	Yardımcı T hücresi
TLR:	Sirke Sineğinin Toll Reseptörlerine Benzer Reseptörler
TNF- α :	Tümör Nekroz Faktör- α
TRAF6:	TNF-Reseptör İlişkili Faktör 6
Treg:	Regülatör T Hücresi
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Seliman, T.M.H. (2021). *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Mantarından Lektin Saflaştırılması ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada toz haline getirilmiş *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından hazırlanan ham ekstresinden % 80 amonyum sülfat ile çöktürme, DEAE-Sefaroz anyon değiştirici ve Sefadeks G-100 jel filtrasyonu kromatografi yöntemleri kullanılarak lektin 18,3 kez saflaştırıldı. Saflaştırılan lektinin spesifik aktivitesi 5 120 HB/mg protein olarak hesaplandı, molekül ağırlığı ise denatürasyon ve indirgeme koşullarında yapılan SDS-PAGE’de 43 kDa olarak belirlendi.

Pleurotus eryngii var. *ferulae* lektinin (PEFL), lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 makrofajlarda, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenen nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi enzimlerin, tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve interferon- γ (INF- γ) gibi pro-inflamatuar ile interlökin-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin ve prostaglandin E2 (PGE2) üretimi üzerine olan inhibitör etkisi araştırıldı. PEFL’in, LPS ile uyarılmış PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ üretimi üzerine güçlü bir inhibitör etki gösterdiği sonucuna varıldı. LPS uygulanan hücre grubunda, PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken ($p<0,05$), LPS+PEFL uygulanan hücre grubunda yalnız LPS uygulanan hücre grubuna göre PGE2 ve sitokin düzeylerinde de anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Western Blot analiz sonuçlarına göre, kontrol grubunda, iNOS ve COX-2 proteinleri oldukça az düzeyde ifade edildi. iNOS ve COX-2 düzeyleri LPS uygulanan gruplarda anlamlı bir şekilde artmışken ($p<0,05$), LPS+PEFL uygulanan gruplarda doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$). Ayrıca, PEFL uygulaması yapılan LPS grubuna ait hücre süpernatantların IL-10 düzeyinde ise, LPS grubuna oranla, anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Bu çalışmada, PEFL’in anti-inflamatuar etkisinin, iNOS ve COX-2 enzimleri ve sitokin üretimi üzerine olan inhibe edici etkisinden ileri geldiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*, Mantar, Lektin, Lipopolisakkarit, RAW 264.7 makrofajlar, Sitokinler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37626.

ABSTRACT

Seliman, T.M.H. (2021). Purification of Lectin from *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Mushroom and Investigation Some of Its Biological Properties. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry. Master of Science Thesis. İstanbul.

In this study the lectin from the crude extract of mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* (PEFL) was purified to homogeneity by 80 % ammonium sulfate fractional precipitation, DEAE Sepharose-4B anion exchange and Sephadex G-100 gel filtration chromatographies. The enzyme was obtained in 18.3 % yield. The specific activity of the purified enzyme was calculated as 5120 HB/mg protein, the molecule weight was found to be 43 kDa determined by SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions.

In this study we also evaluated the effect of PEFL on lipopolysaccharide (LPS)-induced levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes in RAW 264.7 macrophages and assessed the inhibitory effect of PEFL on the production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrose factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (INF- γ) and anti-inflammatory cytokine IL-10 as well as prostaglandin E2 (PGE2) . We found that PEFL is a potent inhibitor of LPS-induced PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and INF- γ . In the LPS treated group PGE₂, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were significantly ($p < 0,05$) higher than those of the control group. A significant ($p < 0,05$) reduction was observed in the LPS+PEFL treated groups ($p < 0,05$), compared with the only LPS treated group. In addition, a significant increase in the IL-10 levels was observed in the LPS+PEFL treated groups ($p < 0,05$), compared with the only LPS treated group. As determined by Western Blotting analysis, in the control groups, iNOS, and COX-2 protein levels were slightly detectable. However, in the LPS treated groups, iNOS and COX-2 were markedly expressed by LPS, whereas in the LPS+PEFL treated groups, PEFL significantly inhibit the expressions of these proteins in a concentration-dependent manner.

These results suggest that the inhibitions of the iNOS and COX-2 expressions and PGE2 and cytokines production are responsible for the anti-inflammatory effects of PEFL.

Keywords: *Pleurotus eryngii* var *ferulae*, Mushroom, Lectin, Lipopolysaccharide, RAW 264.7 Macrophage, Cytokines.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 37626.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lektinlerin incelenmesi ve uygulanması, son yıllarda şaşırtıcı bir oranda artmıştır. 1960'lı yılları takiben, bu proteinlerin kompleks karbonhidratların, özellikle glikoproteinlerin yapısal ve fonksiyonel incelemelerinde, hücrelerin ayırt edilmesinde, kanser tanısı konulmasında paha biçilmez araçlar oldukları anlaşılmıştır, lektinler daha kapsamlı bir şekilde araştırılmaya ve incelenmeye başlanmıştır

Günümüzde lektinlerin, sinyal iletimi, glikoproteinlerin sentezinin ve hücre içi trafiğinin düzenlenmesi, kanser ve metastazı, infekte edici ajanların konakçı hücrelere tutunması, lökositlerin inflamasyon bölgelere yönlendirilmesi ve bağışıklık sisteminde hücre etkileşimleri, hücre büyümesinin ve apoptozun düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olayda tanıma molekülleri olarak rol aldıkları tespit edilmiştir (Sharon ve Lis, 2004; Pohleven ve ark., 2009; Hassan ve ark., 2015).

Lektinlerin karbonhidratları seçici olarak bağlama özelliklerinden yararlanılarak, enfeksiyon, inflamasyon ve kanser gibi pek çok hastalıkla mücadelede ilaçların tasarlanması ve üretimine imkan verilebileceği ileri sürülmektedir (Seyrek ve Bildik, 2001; Sharon ve Lis, 2004; Sharon, 2007). Lektinler, glikozilasyon olayların aydınlatılmasında, glikozilasyon ile meydana gelen değişikliklerin biyolojik ve fizyopatolojik sonuçlarının incelenmesinde umut vadeden araçlar olarak görülmektedir. Kanser hücrelerinin yüzeyindeki glikoprotein ve diğer glukokonjugatların yapısındaki değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan lektinler, son yıllarda yüzyılın önemli buluşlarından biri olarak dikkat çekmektedir.

Lektinlerin, pro-inflamatuar sitokinlerin I κ B/NF- κ B transdüksiyon yolu ile salgılanmasını azaltarak ve inflamasyonun ileri aşamalarında salgılanan ve inflamatuvar yanıtın kontrolünü sağlayan anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırarak inflamasyondan koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (Coelho ve ark., 2017). Ayrıca pek çok premalign dokuda ve malign tümörlerde ekspresyonu sıklıkla artan siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu yoluyla proinflamatuar prostaglandinlerin (PG) üretimini azaltarak anti-inflamatuar etki gösterdikleri rapor edilmiştir. Lektinlerin, inflamatuvar süreçlerde artmış indüklenen nitrik oksit sentaz

(iNOS) ekspresyonunu baskılayarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azalttıkları gözlenmiştir (Muszyńska ve ark., 2018).

Lektinlerin glikozillenmiş hücre yüzeyi proteinler veya lipidlerin glikanlarına bağlanma özellikleri, lektin aracılı ilaç dağıtım sistemlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır. Bir hücrede eksprese olan glikan dizileri, farklı hücre tiplerine göre farklılık gösterir, özellikle transforme veya kanserli hücreler, normal hücrelere kıyasla sıklıkla farklı glikanları eksprese eder. Bu nedenle lektinler, ilaçları hedeflenmiş spesifik hücre ve dokulara taşıyıcı moleküller olarak kullanılabilir. Bazı çalışmalarda, ilaçların akciğerlere, bukkal kaviteye, gastrointestinal yoluna, kan-beyin bariyerine taşınmasında lektin dağıtım sistemlerin kullanıldığı bildirilmiştir (Bies ve ark., 2004).

Lektin aracılı ilaç dağıtım sistemleri, lektinlerin sadece karbohidratlara spesifik bağlanma yeteneklerinden dolayı değil, aynı zamanda sitotoksik ve apoptoz indükleyici potansiyellerinden dolayı kanser tedavisinde büyük ölçüde faydalı olabilecekleri düşünülmektedir. Sitotoksik potansiyeli olan bu sistemlerin etki mekanizmalarından bir tanesi, ilaç ile kojugat olan toksik olmayan lektinin, hedef hücresinde aktivasyon sonucunda toksik hale gelmesi; ikinci mekanizma ise, apoptoz indüksiyonu yoluyla toksik ajan olarak görev gören toksik bir lektinin kullanımını içermektedir (Ghazarian ve ark., 2011).

Günümüzün en yaygın hastalıklarından biri olan kanserin tanı ve tedavisindeki öneminden dolayı, kanser belirteçlerinin keşfi üzerinde geniş kapsamlı çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Fukosil α , 1-6 oligosakkariti, çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir ve fukosillenmiş fetoproteinde yüksek miktarda bulunmasından dolayı hepatosellüler karsinom için biyobelirteç görevi görmektedir. Yenilebilir bir mantar olan *Pholiota squarrosa*'dan elde edilen lektinin (PhoSL) α , 1-6 fukosilasyonunun ekspresyonu açısından birincil ve metastatik kolon kanserli dokuları arasında ayırım yapma yeteneğinden dolayı PhoSL'nin bir kanser biyobelirteç olarak potansiyel olarak uygulanabileceği belirtilmiştir (Kobayashi ve ark., 2012).

Lektinler, tümörle ilişkili glikanları ve glikoproteinleri saptamak için enzime bağlı lektin metodun (ELLA) geliştirilmesinde monoklonal antikorlarla kombinasyon halinde veya monoklonal antikorların yerine kullanılmaktadır (Tsaneva ve Van

Damme, 2020). Ayrıca kanser hücrelerin kantitatif analizinde ve kanser hücrelerin yüzeyinde en çok eksprese edilen sialik asit miktarının tespitinde lektin tabanlı biyosensörler geliştirilmiş ve bu şekilde kanserin erken teşhisinde ve tedavisinde önem taşıyan hücre yüzeyindeki glikan ekspresyonunun profilininin çıkartılmasına olanak sağlanmıştır (Dan ve ark., 2016). Lektin histokimyası patolojik ve normal dokulardaki glikokonjugatların arasındaki farklılıkları belirlemeye yarayan araçlardan biridir (Coelho ve ark., 2017).

Tıbbi mantarlar birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde destekleyici olarak kullanılmakta. Ülkemizde kültüre alınmış mantar ve doğa mantarlarının üretimine yönelik çalışmaların bir hayli artmasına karşın, mantarların terapötik etkileri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır.

Günümüzde, bilim adamları doğal kaynaklardan elde edilen saf maddelerden ilaç üretimine yönelik araştırmalar üzerine odaklanmıştır. Tıbbi mantarlardan izole edilen lektinler birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde destekleyici olarak kullanılmakta ve son yıllarda tüm dünyada bu konuyla ilgili bilimsel çalışmalar hızla artmaktadır. Mantarlardan izole edilen lektinlerin, mitojenik, antiviral, antitümör, immünomodülatör, anti-HIV1 reverse transkriptaz aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2008; Singh ve ark., 2010; Hassan ve ark., 2015). Tıbbi mantar lektinleri sahip oldukları anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri nedeniyle, çeşitli kanser ve inflamatuvar hastalıklar için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde potansiyel bir tedavi edici ajan olarak düşünülebilmektedir.

Pleurotus türleri önemli ekonomik ve tıbbi değeri olan yenilebilir mantarlardır. Karaciğeri koruyucu, hipolipidemik, antioksidan, antitümör ve immünomodülatör gibi birçok farmakolojik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Mariga ve ark., 2014). Bu türün anti-inflamatuar etkilerinin ve etki mekanizmasının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. *Pleurotus eryngii*'den izole edilen bir glikosfingolipidin T hücrelerinden interferon- γ (IFN- γ) ve interlekin-4 (IL-4) salgılanmasını indüklediği bildirilmiştir (Nozaki ve ark., 2008). *Pleurotus pulmonaristen* izole edilen β -glukanın anti-inflamatuar etkisi, inflamatuvar ağrıyı ölçmek için tipik bir model olan asetik asit ile indüklenmiş kıvrınma reaksiyonu ile incelenmiş ve β -glukanın hasarlı dokulara lökosit göcünü inhibe ettiği görülmüştür

(Smiderle ve ark., 2008). Ayrıca, sıçanlar üzerinde karageenan ile indüklenerek oluşturulan akut veya formalin ile oluşturulan kronik pençe inflamasyonu *Pleurotus florida* ekstresi ile tedavi edilerek anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir (Jose ve ark., 2004). Lipopolisakkarit ile uyarılmış RAW 264.7 makrofajlarda *Pleurotus ostreatus* mantar ekstresinin COX-2 ve iNOS gibi enzimlerin ve prostaglandin E2 (PGE2), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve INF- γ gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi üzerine olan inhibitör etkisi araştırılmış ve anti-inflamatuar etkisinin, iNOS ve COX-2 enzimleri ve sitokin üretimi üzerine olan inhibe edici etkisinden ileri geldiği sonucuna varılmıştır (Jedinak ve ark., 2011; Yuan ve ark., 2017a).

Pleurotus eryngii var. *ferulae* mantarından hazırlanan ekstraktların, antioksidan (Hu ve ark., 2009), anti-aterosklerotik (Mori ve ark., 2008;) ve antitümör etkileri (Lee ve ark., 2011) ile ilgili farmakolojik araştırmalar yapılmıştır, fakat adı geçen mantarın ham ekstresinden izole edilen lektinin anti-inflamatuar etkisi hakkında herhangi bir çalışma bildirilmemiştir.

Bu çalışmada, yapılan literatür taramaları sonucunda, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantar lektinin (PEFL) anti-inflamatuar etkisini inceleyen herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması gözönünde bulundurularak, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından izole edilen lektinin, inflammatuar süreçlerde rol oynayan temel pro-inflamatuar sitokinler olan PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6'nın ve INF- γ ile anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'un üretimi, proinflammatuar sitokinlerin indükledikleri iNOS ve COX-2 enzimlerin Western blot analizi ile ekspresyonunun incelenmesi ile etki mekanizması hakkında fikir sahibi olabilmeyi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Mantarlar

Mantarlar besleyici ve tıbbi değerleriyle tanınırlar. Dünya genelinde 14,000 ile 22,000 makromantar türü tanımlanmıştır fakat tanımlanamayan mantar türlerinin çok fazla sayıda olabileceği ileri sürülmektedir. 2000'den fazla mantar türün yenilebilir, bazıları tüketildiğinde ise çok zehirli oldukları (Patel ve ark., 2012) bildirilmiştir.

Mantarlar, çok eski zamanlardan beri beslenme açısından düşük kalorili olmaları yanı sıra, karbonhidratlar, esansiyel amino asitler, lifler, mineraller ve vitaminler bakımından zengin bir gıda olarak da tüketilmektedir (Öztürk ve Çopur, 2009; Bayuk ve ark., 2016). Son yıllarda mantarların yüksek besin ve tıbbi değerlerinin daha iyi anlaşılmasıyla birçok türün kültür üretimine olan ilgi sürekli artış göstermektedir ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısı da hızla artmaktadır. Günümüzde dünyada ticari olarak *Agaricus bisporus* (düğme mantarı, beyaz mantar, kahverengi mantar veya portobello), *Pleurotus* türleri (özellikle *Pleurotus ostreatus*, istiridye mantarı, hiratake), *Lentinus edodes* (Japon mantarı; shiitake), *Flammulina velutipes* (altın iğneli mantar, enokitake) doğal mantar türleri yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir (Kalač, 2013). Çin mantar yetiştiriciliğinde dünyada ilk sırada yer alırken, onu Amerika, Hollanda, Fransa, Polonya ve İspanya takip etmektedir. Türkiye doğal mantar ve mantar çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir ve mantar ihracatında önemli bir konuma sahiptir. 2008 yılından sonra Türkiye ihracatında mantarlar ilk 5 ürün arasında yer almıştır. 2007 yılında 21 ton kuru mantar ihraç edilerek ülke ekonomisine 1,71 milyon dolar katkı sağlanmıştır (Bayuk ve ark., 2016).

Mantarlar, antimikrobiyal ve antiviral, bağışıklık sistemini düzenleyici ve güçlendirici, antioksidan, antitümör, kolesterol düşürücü, hepatite karşı koruyucu gibi tedavi edici özelliğe sahip birçok aktif bileşen içerdikleri bildirilmiştir (Öztürk ve Çopur, 2009). Terapötik etki gösteren maddeler Lindequist ve ark. (2005) tarafından özetlenmiştir. Bu bileşikler arasında immünomodülatör, anti-proliferatif, antitümör ve hipotansif, HIV-1 reverse transcriptaza karşı inhibe edici aktivitelere sahip lektinler'dir (Wang ve ark., 1998; Singh ve ark., 2015).

2.1.1. Mantar Lektinleri

Lektinler, karbonhidrat bağında herhangi bir değişikliğe neden olmadan spesifik karbonhidratlara geri dönüşümlü ve kovalent olmayan bir şekilde bağlanan ve böylece spesifik karbohidratları taşıyan polisakkaritleri, glikoproteinleri ve glikolipitleri agglütine eden immün kaynaklı olmayan proteinlerdir (Singh ve ark., 2010). Enzim ve antikor özelliğinde değiller. Enzimlerden (glikozidaz ve glikoziltransferaz) farklı olarak glikokonjugatların mono- ve oligosakkaritlerine geri dönüşümlü olarak bağlanmalarına rağmen katalitik aktivite göstermemektedirler. Antikorlardan farklı olarak ise immün yanıtın ürünleri değildirler. Lektinlerin hücrelerdeki sentezi bir antijenle uyarılma sonucu değil, genler tarafından kontrol edilmekte (Seyrek ve Bildik, 2001; Coelho ve ark., 2011). Çoğu lektin birden fazla karbonhidrat bağlama bölgesi içerir ve bu nedenle hücreleri agglütine edebilir veya hücre yüzeyi karbonhidratlarını çapraz bağlayabilir (Pohleven ve ark., 2009).

"Lektin" kelimesi Yunanca "seçmek" anlamına gelen "legere" kelimesinden gelmektedir ve bazı aglütininlerin farklı kan gruplarını ayırt etme yeteneğini açıklamak için önerilmiştir (Perduca, ve ark., 2020). İlk lektin Stillmark (1888) tarafından *Ricinus communis* tohumlarında rapor edilmiştir (Lis ve Sharon, 1986). 19. yüzyılın sonunda farklı bitki özütlerinde birçok lektin tanımlanmış ve kırmızı kan hücrelerini agglütine etme yetenekleri nedeniyle hemagglutininler veya fitoaglütininler olarak adlandırılmıştır. O zamandan beri, ilginç özelliklere sahip yeni lektinler sürekli olarak listeye eklenmektedir.

Benzersiz karbonhidrat bağlama özellikleri nedeniyle mantar lektinlerine ilgi giderek artmaktadır. İlk mantar lektini olan "phallin", *Amanita phalloides*'te tanımlanmıştır. En fazla miktarda lektin, *Lactarius*'ta, ardından *Pleurotus*, *Agaricus*, *Amanita* ve *Boletus* türlerinde tanımlanmıştır (Hasan ve ark., 2015). Yüksek mantarlardaki lektinler Guillot ve Konska (1997) ve Wang ve ark. (1998) tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Singh ve ark. (2010), 336 mantar lektininin hakkında kapsamlı bir inceleme yayınlamışlardır.

Kristal yapısı bilinen mantar lektinlerinin yapılarının karşılaştırılması Goldstein ve Winter (2007) tarafından rapor edilmiştir. Yüksek mantarlarda lektin oluşumu, yüksek bitkilerde olduğundan daha fazladır ve daha yüksek seviyelerde lektinler eksprese edilir. Bu nedenle mantar lektinleri, diğer lektinlerden daha

kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve bugüne kadar 50'den fazla mantar lektini izole edilmiş ve saflaştırılmıştır (Xu ve ark., 2014). Farklı türlerden izole edilen mantar lektinleri molekül ağırlık, alt birim sayısı ve karbonhidrat özgüllüğü bakımından çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca lektinler, mantarın başlık, gövde ve miselyum gibi farklı kısımlarından saflaştırılmıştır ve ekspresyon seviyelerinin meyve gövdesinin yaşına ve mevsimine bağlı olarak değişebildiği görülmüştür.

Bazı mantar lektinleri ticari olarak mevcuttur. *Agaricus bisporus* lektini şu anda Sigma Aldrich Co., ABD ve EY Laboratories Inc., ABD tarafından pazarlanmaktadır. *Aleuria aurantia* lektini, Vector Laboratories, Inc., ABD'den temin edilebilir. *Marasmius oreades* ve *Polyporus squamosus*'tan elde edilen lektinler de ticari olarak EY Laboratories Inc., ABD'den temin edilebilir (Singh ve ark., 2010).

Mantar lektinlerinin keşfi, yüksek mantarların toksisitesi üzerine yapılan araştırmalarla başlamıştır. İlk fungal lektini, lektin aktivitesinin mantarların toksisitesiyle ilişkili olduğunu gözleyen Ford tarafından *Amanita muscaria* (sinek mantarı)'da rapor edilmiştir. *Boletus edulis* ve *Lactarius deliciosus* gibi yenilebilir mantarlardaki lektinlerle ilgili sonraki raporlar, toksisite ve lektin aktivitesinin bağımsızlığını kanıtlamıştır (Singh ve ark., 2010).

2.1.2. Tıbbi Mantarların Terapötik Etkileri

2.1.2.1. Antiproliferatif/Antitümör Aktivite

Mantar preparatları aynı zamanda, Asya'da geleneksel kanser tedavilerinin tamamlayıcısı olarak yaygın bir şekilde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda batı dünyasında da kullanımları yaygınlaşmıştır.

Tümör hücre yüzeyleri, normal hücrelere kıyasla glikokonjugatların bileşiminde farklılık gösterir. Lektinler, bu hücre yüzeyi glikokonjugatlarını çapraz bağlayarak veya immünomodülatör etki yoluyla antiproliferatif potansiyel gösterirler (Hasan ve ark., 2015).

Mantarlardan izole edilen birçok bileşiğin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanser hücrelerinin yayılmasını engelleyici özellik gösterdikleri gösterilmiştir. Bu bileşiklerden en etkili olanlar arasında polisakkaritler veya β -(1→6) dallı β -(1→3)-bağlı glukanolardır. *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa* ve *Trametes versicolor* mantarlarından anti-tümör aktiviteye sahip sırayla lentinan,

sonifilan, grifolan ve krestin β -glukanları elde edilmiştir. Lentinan (1985), schizophyllan (1986) ve PSK (1977), Japonya'da kanser tedavisi için reçeteli ilaçlar olarak onaylanmıştır (Mizuno, 1995).

Beta-D-glukan, yüksek miktarda *Agaricus blazei* Murrill mantarında bulunmaktadır ve Japonya'da kanser kemoterapisinden ve kötü huylu bir tümörün alınmasından sonra geleneksel kanser tedavileriyle birlikte kullanılabilir (Zaidman ve ark., 2005; Okuda, 2007). Maitake mantarından (*Grifola frondosa*) elde edilen proteine bağlı beta-glukan (D-fraction) maddesinin tümör gelişimini azaltıcı etkisinin yanı sıra, kanserin yeniden nüksetmesini ve yayılmasını engelleyici etkiye de sahip olduğu rapor edilmiştir. Maitake mantarının tozu veya ekstraktı, kanser, HIV (AIDS), şeker hastalığı, hipertansiyon, karaciğer rahatsızlıkları tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır (Nanba ve Kubo, 1997). *Cordyceps sinensis* mantar türünden hazırlanan ekstraktın güçlü bir antioksidan ve lipid peroksidasyonu inhibe edici aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Yamaguchi ve ark., 2000). Başka bir çalışmada, aynı mantar türünün hepatit üzerine etkileri araştırılmış ve karaciğer iltihaplanmasını engelleyerek ve sirozun gelişmesini geciktirerek karaciğer fonksiyonlarını düzelttiği gözlemlenmiştir (Liu ve Shen, 2003).

Mantar preparatlarının kanser hastaları için klinik olarak yararlı olabilecek nükleer faktör- κ B (NF- κ B), aktivatör protein-1 (AP-1) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü gibi antiapoptotik olan önemli transkripsiyon faktörlerini inhibe edici etkilere sahip oldukları da gösterilmiştir (Sliva ve ark., 2002).

Son yıllarda, **lektinlerin anti tümör aktiviteleri** sergilediklerinin keşfedilmesi nedeniyle, fungal lektinlere ilgi artmıştır. *Volvariella volvacea* lektini sarkoma S-180 hücrelerine karşı antitümör aktivite gösterdiği (Lin ve Chou, 1984), *Grifola frondosa* lektinin HeLa hücreleri için sitotoksik olduğu (Kawagishi ve ark., 1990), *Agaricus bisporus* lektini insan kolon kanseri hücre hattı HT29 ve meme kanseri hücre hattı MCF-7'ye karşı antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu (Yu ve ark., 1993), *Tricholoma mongolicum* lektini *in vitro* fare mastositoma P815 hücrelerini ve *in vivo* sarkoma S-180 hücrelerini inhibe ettiği (Wang ve ark., 1997), *Pholiota adiposa* lektinin Hep G2 ve MCF-7 hücrelere karşı antiproliferatif etkisi çok güçlü olduğu ve kanser tedavisi için bir ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009). *Agaricus bitorquis* lektinin güçlü HIV-1 ters

transkriptaz inhibitör, kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve fare splenositlerine karşı mitojenik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Bununla birlikte, antitümör aktivitelerinin ayrıntılı mekanizması araştırılmış ve ABL (*Agaricus bisporus* lektini), anti-proliferatif etkisinin, nükleusa NLS (nükleer lokalizasyon-sekans) bağımlı protein alımını bloke etmek suretiyle göstermesi, nükleus periferine doğru lektin trafiğinin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür (Yu ve ark., 1999).

Paxillus involutus, *Lactarius flavidulus*, *Hericium erinaceus*, *Russula delica*, *Pholiota adiposa*, ve *Clitocybe nebularis* mantarlardan izole edilen lektinlerin antiproliferatif etkisi olduğu da rapor edilmiştir (Hasan ve ark., 2015). Birçok mantardan izole edilen lektinlerin antiproliferatif ve kanser hücre hatlarına karşı gösterdikleri anti-kanser aktiviteleri Hasan ve ark. (2015) tarafından özetlenmiştir.

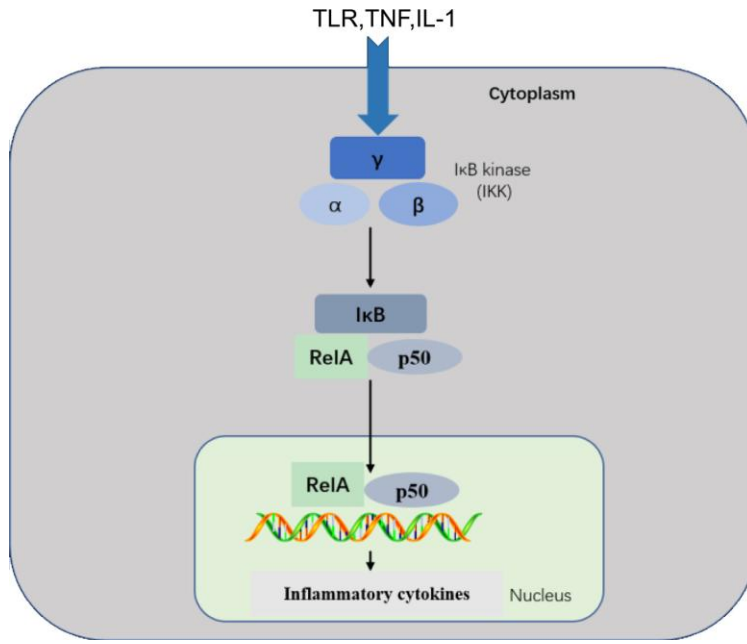
Mantarlarda bulunan doğal bileşiklerin yapısal çeşitliliği ile birlikte tümöröenez ve metastazın moleküler temeline ilişkin genişletilmiş bilgi, kansere yol açan anormal moleküler ve biyokimyasal sinyalleri rasyonel olarak hedefleyen yeni ilaçları keşfetmek için benzersiz fırsatlar sağlamıştır (Zaidman ve ark., 2005).

2.1.2.1.1. NF- κ B Yolağın İnhibisyonu

Rel/NF- κ B transkripsiyon faktörleri immün ve inflamasyon yanıtları, hücre çoğalması ve hücre ölümü gibi pek çok biyolojik olayın kontrolünde görev almaktadır. Buna bağlı olarak, NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu, kanser, artrit, kronik inflamasyon, astım, nörodejeneratif ve kalp hastalıklarının gelişiminde ve ilerlemesinde de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Kumar ve ark., 2004).

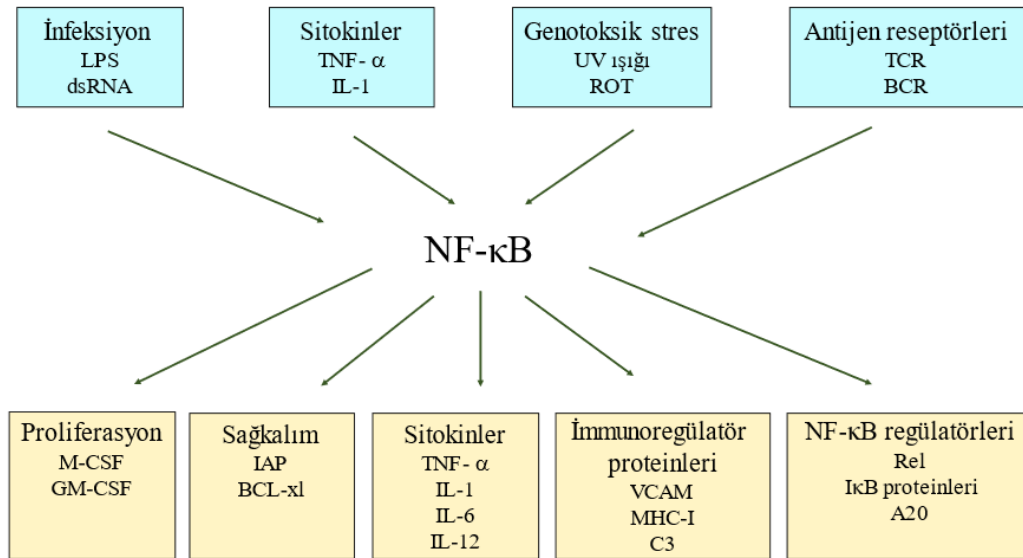
NF- κ B transkripsiyon faktörleri ailesini oluşturan NF- κ B1 (p105, p50), NF- κ B2 (p100, p52), p65/RelA, c-Rel ve RelB proteinleri homodimer veya heterodimerler oluşturarak hedef genlerin ekspresyonunu pozitif veya negative geri bildirim yoluyla düzenlerler. NF- κ B proteinlerinin aktivitesi, bu dimerlere bağlanan inhibitör- κ B (I κ B) proteinleri tarafından kontrol edilir. NF- κ B alt birimlerinin oluşturduğu dimerler, herhangi bir uyarı olmadığı zaman inhibitörleri olan I κ B proteinleri ile birlikte hücrelerin sitoplazmasında inaktif halde tutulmaktadır. Dimerler, ancak I κ B proteinlerinin I κ B kinaz (IKK) kompleksi aracılığıyla fosforilasyona uğraması ve sonrasında parçalanarak ortamdan uzaklaştırılmasıyla aktif hale gelirler. IKK'nin kinaz alt birimlerinin aktivitesi ile I κ B proteinleri özel

serin amino asitleri üzerinden fosforilasyona uğramaktadır. Fosforilasyonu takiben I κ B proteinlerinin ubiquitinasyonu ve daha sonra 26S proteazom tarafından yıkımı gerçekleşmektedir. Serbest kalan NF- κ B dimerleri çekirdeğe geçerek hedef genlerindeki özel κ B bölgelerine bağlanmakta, hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesine aracılık etmektedir (Chen ve ark., 2018) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: NF- κ B yolağı (Chen ve ark., 2018).

NF- κ B dimerleri, değişik uyarılara cevap olarak apoptoz düzenleyici, strese yanıt, sitokin, kemokin, büyüme faktör ve reseptörleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler (Şekil 2-2) (Chen ve ark., 2018).



Şekil 2-2: NF-κB dimerleri tarafından, değişik uyarılara cevap olarak proliferasyon faktörlerini, NF-κB, apoptoz ve immün düzenleyicilerini kodlayan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi (Prescott ve ark., 2021).

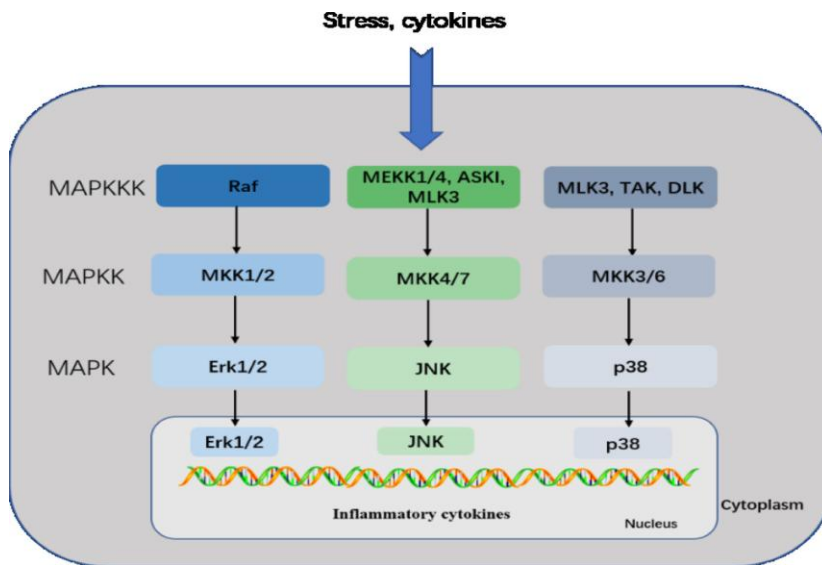
Anti-apoptotik, pro-anjiyojenik, pro-metastatik olan aktif NF-κB'nin promotörleri, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozun inhibisyonunu, tümörün anjiyojenik ve metastatik potansiyelini arttırarak tümörlerin ilerlemesine neden olabilirler ve metastaza aracılık edebilirler. NF-κB sinyal iletim yolunun inhibisyonu, etkileşimde olduğu diğer yolların veya proteinlerin aktivitelerini de etkileyebilir. Bunun nedeni tümördeki hipoksik ortam veya pro-tümör kemokin/sitokinlerin tümör tarafından üretilmesi sonucunda potansiyel bir onkojen olarak tanımlanan NF-κB'nin RelA altbiriminin artmış transaktivasyonu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenlerle, NF-κB sinyal iletim yolunun inhibisyonu kanser tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir. Günümüze kadar, mantarlardan izole edilen ve NF-κB aktivitesinin inhibisyonunda kullanılabilecek birçok inhibitör madde rapor edilmiştir. Panepoxydone, cycloepoxydon, gliotoxin bileşiklerin TNF-α ile uyarılan NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği veya TNF ile uyarılan NF-κB'nin çekirdeğe geçişini veya DNA'ya bağlanmasını baskıladığı, IκB proteinlerin fosforilasyonunu ve degradasyonunu önlediği hücre ve hayvan modellerinde gösterilmiştir (Zaidman ve ark., 2005; Jedinak ve ark., 2011).

2.1.2.1.2. MAPK Protein Kinaz Sinyal Yolunun İnhibisyonu

Kanser ile ilgili başka bir yolak da, mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) sinyal yolağıdır. MAPK'ler, osmotik stres, mitojenler, ısı şoku ve inflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 ve IL-6) gibi çeşitli uyaranlara cevap olarak aktive olan ve hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, hayatta kalmasını ve apoptozu düzenleyen serin/treonin protein kinaz ailesidir.

Mitojenle-etkinleşen protein kinaz ailesi, hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinazlar (ERK1/2), stres ile aktive edilen protein kinaz/c-Jun N-terminal kinazlar (SAPK1/JNK) ve p38 MAPK olmak üzere üç kaskad'tan oluşur. Sinyal iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve mitojenle-etkinleşen protein kinaz kinaz kinaz (MAPKKK=Raf)'ın aktivasyonundan sonra sırasıyla mitojenle-etkinleşen protein kinaz kinaz (MAPKK=Mek), ve mitojenle-etkinleşen protein kinaz (MAPK=Erk) aktive olur. MAPK'lar ise sitoplazmik diğer protein kinazları, hücre iskeleti proteinleri, büyüme faktörleri reseptörlerini ve/veya nükleusta p38 transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin immün yanıtı oluşur.

ERK genellikle mitojen ve farklılaşma sinyalleri tarafından aktive edilirken, JNK ve p38 inflamasyonu uyarırlar ve stres ile aktive olurlar. MKK1 ve MKK2 ERK1/2'yi, MKK4 ve MKK7 JNK'yı, MKK3 ve MKK6 ise p38'i aktive eder (Şekil 2-3) (Chen ve ark., 2018).



Şekil 2-3: MAPK yolağı (Chen ve ark., 2018).

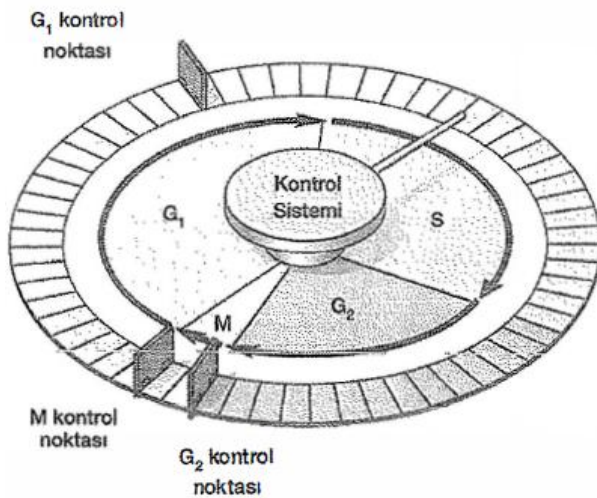
İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolağın aşırı aktivasyonu söz konusudur. Kanser gelişimi sürecinde, mutasyonlar sonucu onkogene dönen ErbB-2 ve Src reseptör tirozin kinazın (Scr RTK), Ras ve Raf proteinlerinin mutasyonu sonucunda, bu proteinlerin ekspresyonu veya aktivasyonunun kontrolü ortadan kalkar ve tümörün büyümesi hızlanır (Chen ve ark., 2018).

Ganoderma lucidum mantar ekstresinin, PC12 hücrelerinin nöronal farklılaşmasını indüklediği ve sinir büyüme faktör bağımlı PC12 nöronlarının apoptozdan korunmasını sağladığı bildirilmiştir. ERK1, ERK2 ve CREB'nin fosforilasyonundan yola çıkarak, *G. lucidum*'un bu etkileri, Ras/ERK ve CREB sinyal yolları aracılığıyla ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (Cheung ve ark., 2000).

2.1.2.1.3. G₁/S ve G₂/M Kontrol Noktalarının Modülatörleri

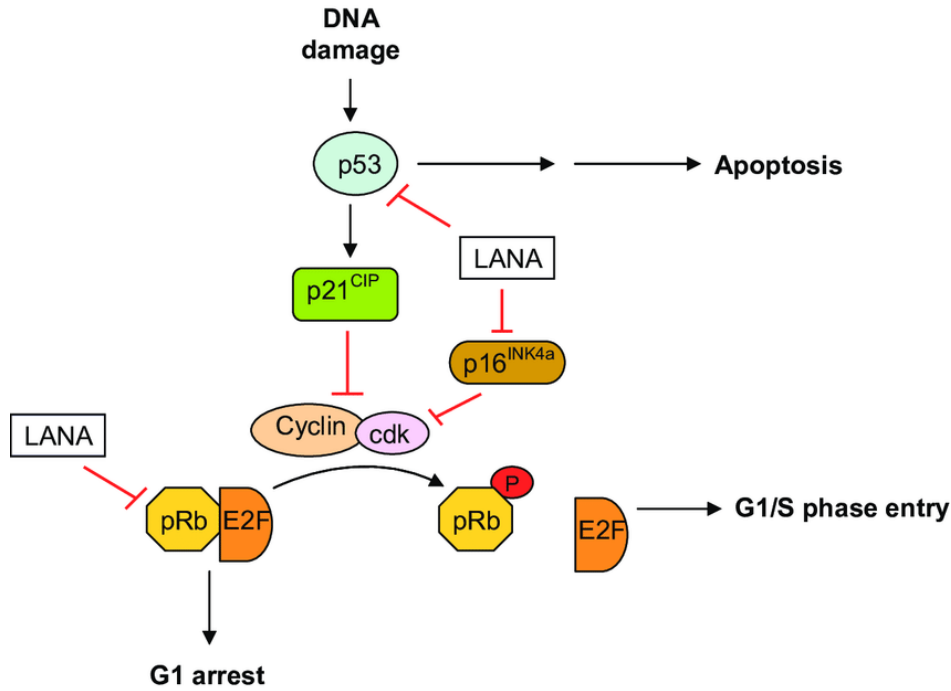
Günümüzde birçok antikanser ilacın tümörlü hücrelerde apoptozu indüklemek suretiyle etki ettiği bilinmektedir ve bu nedenle tümör hücrelerine karşı apoptoz mekanizması birincil olduğu düşünülmektedir (Koyama ve ark., 2002). Son yıllarda bazı lektinlerin apoptozu indükledikleri gösterilmiştir (Kim ve ark., 1993).

Hücre siklusu, proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (G₁/S ve G₂/M) tarafından düzenli olarak kontrol edilir (Şekil 2-4). Hücre siklusu, siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir (Cabadak, 2008).



Şekil 2-4: Hücre siklusunun kontrol noktaları (Cabadak, 2008).

Apoptoz ve hücre siklusu birbirleriyle kompleks ve yakın bir ilişki içinde çalışırlar. Örneğin apoptozda rol alan bir protein olan p53 aynı zamanda hücre siklusunu durduran ve hücreye, DNA'sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür. Eğer (hipoksi, radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. Apoptozun düzenlenmesi pro-apoptotik (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_l) proteinlerin oranına bağlıdır. p53, Bax'ın ekspresyonunu arttırmak ve Bcl-2/Bax oranını değiştirmek yoluyla apoptozu indükler. Ubikitin-aracılı degradasyonu, p53'ün aktivasyonuna ve hücre siklusu kontrolünde (p21WAF1/CIP1) ve apoptozda (BAX ve Apaf-1) görevli hedef genlerin transkripsiyonuna yol açar. p53 normal olarak bir CKI'ü olan p21'in sentezini artırarak hücre proliferasyonunu bloke eder. p21, siklin-CDK kompleksine bağlanarak onu inaktive eder ve hücre siklusu durur. Hücre siklusunun ilerlemesi, hücre bölünmesi ve diferansiyasyonun kontrolünde anahtar bir rol oynayan pRb proteininin fosforillenmesi ile belirlenmektedir. Az fosforillenmiş pRb, G1 fazından S fazına geçişini sağlayan bir transkripsiyon faktörü olan E2F'i bağlayarak ve dolayısıyla inaktive ederek hücre siklusunu G1 fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında (G1/S) durdurur. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA'sını tamir eder. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyük ise, p53 hücreyi apoptozla götürür. İstirahat durumunda bir hücre bölünme sinyali almış ise pRb fosforillenir ve E2F, Rb'den ayrılır. E2F, hücre döngüsünün S fazına girmesi için gerekli genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Zaidman ve ark., 2005; Cabadak, 2008) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: p53'ün görevi (Corte-Real ve ark., 2008).

Kanserlerin % 50-55'inde p53 mutant'tır. Tümör baskılayıcı p53 geni işlevini kaybederse hücre proliferasyonun kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder. Kanser hücrelerinde proliferasyon oranının ve apoptoz sıklığının artmasına rağmen kanserli dokuda hızlı hücre çoğalmasının nedeni kanserli hücrelerde gelişen apoptoza direnç'tir (Zaidman ve ark., 2005).

Mantarlardan izole edilen genisteinin, hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisi, p53'ten bağımsız bir şekilde siklin B1'in belirgin bir inhibisyonu ve CDK inhibitörü olan p21'in (WAF1/CIP1) indüksiyonu ile birlikte hücre döngüsünün G2/M control noktasında durdurması ile ilişkilendirilmiştir (Choi ve ark., 2000).

Kurokawa mantarından (*Boletopsis leucomelas*) izole edilen lektinin tümör hücresi apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (Koyama ve ark., 2002).

Agrocybe aegerita mantarından izole edilen lektinin antitumor etkisi apoptozu uyarıcı ve DNaz aktivitelerinden ileri geldiği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2003).

Psathyrella asperospora (PAL)'dan izole edilen GlcNAc-spesifik lektinin antiproliferatif etkisinin etki mekanizması incelendiğinde, HT29 hücrelerinin, hücre

siklusunun G2/M fazında tutuldukları ve GlcNAc ilave edilmesiyle bu etkinin durdurulabildiği gözlenmiştir (Rouf ve ark., 2014).

2.1.2.1.4. Anjiyogenez İnhibisyonu

Tümör büyümesi ve metastazı, tümör içinde ve çevresinde yeni bir damar sisteminin gelişmesine bağlıdır. Anjiyogenez, önceden var olan kan damarlarından yeni kan damarı oluşum sürecidir. Anjiyogenez, endotelial hücre proliferasyonu, endotel hücrelerinin hücre dışı matriks yoluyla anjiyogenik uyarılara doğru hareketliliği ve kapiller farklılaşması dahil olmak üzere bir dizi birbiriyle ilişkili yollarla tümöre yeterli oksijenlenme sağlayarak ilerleyici tümör büyümesini kolaylaştırır. Tümör ve mikroçevresi tarafından salınan uyarıcı ve baskılayıcı faktörler arasındaki denge bu süreci düzenler. Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF'ler) α ve β , trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), anjiyogeninler, IL-8 ve TNF- α en çok araştırılan uyarılar arasındadırlar. Anjiyogenezin hedeflenmesi, yeni kan damarlarının gelişmesini ve dolayısıyla tümörün büyümesini ve metastazı önlemek için etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Anti-anjiyogenik terapi, endotel hücrelerini doğrudan hedefleyebilir ve tümör hücreleri veya konakçı tarafından pro-anjiyogenik peptitlerin üretimini veya etkisini veya her ikisini de inhibe edebilir, dolayısıyla tümör içindeki anjiyogenez inhibitörlerinin ekspresyonunu artırabilir. Doğrudan tümör hücrelerinden ziyade endotel hücrelerini hedef alan anti-anjiyogenik tedavi, malign hastalıklar için yeni bir terapötik strateji olarak değerlendirilmiştir. Bu tedavinin teorik avantajı, endotel hücrelerinin ilaç direncine yol açan mutasyonlara uğraması olasılığının düşük olmasıdır. Anti-anjiyogenik tedavinin antiproliferatif olduğu yaygın olarak varsayılmasına rağmen, son zamanlarda anti-anjiyogenik tedavinin apoptozu ve tümör regresyonunu indükleyebileceği bulunmuştur (Zaidman ve ark., 2005).

Agaricus brasiliensis'ten izole edilen ergosterol'ün, *Phellinus linteus*, *Gymnopilus marginatus*, *Gymnopilus patriae*, *Gymnopilus parvisporus* ve *Inonotus hispidus*'tan izole edilen hispidin'in ve *Ganoderma lucidum*'daki triterpenlerin antitümör etkisinin tümörler üzerinde indüklenmiş anjiyogenezin inhibisyonundan ileri gelebileceği ileri sürülmüştür (Zaidman ve ark., 2005).

2.1.2.2. Mitojenik / Anti-Mitojen Aktivite

Bazı lektinlerin, lenfositlerin küçük dinlenme bölünmeyen hücrelerden büyüme ve çoğalma yeteneği olan hücrelere dönüşümünü uyarıcı bir özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir. Lenfositlerin aktivasyonu ve proliferasyonunu içeren bu mitojenik aktivitenin mekanizması, genellikle ligandların T-hücre reseptörlerine bağlanmasıyla başlar, bu da sinyal kaskadını, IL-2 gen ekspresyonunu ve ardından proliferasyonu tetikler. Günümüzde kanser hastaların sayısı artması ile doğal kaynaklı antimutajenik bileşiklerin tespit edilmesi önemi gün geçtikçe artmaktadır (Hasan ve ark., 2015).

Birçok mantarın mutajenik-antimutajenik potansiyellerine bakılmıştır. *Volvareilla volvacea*, *Boletus satanas* Lenz, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* ve *Agrocybe cylindracea*'dan elde edilen lektinler, güçlü mitojenik aktiviteler sergilerken, *Tricholoma mongolicum*, *Laetiporus sülfürik* ve *Lactarius deliciosus* mantar kaynaklı lektinleri mitojenik olmadıkları bildirilmiştir (Ho ve ark., 2004).

Ganoderma capense (Ngai ve Ng 2004), *Schizophyllum commune* (Han ve ark., 2005), *Boletus edulis* (Zheng ve ark., 2007), *Cordyceps militaris* (Jung ve ark., 2007), *Pleurotus citrinopileatus* (Li ve ark., 2008), *Hericium erinaceum* (Li ve ark., 2010) ve *Pholiota adiposa*'dan (Motta ve ark., 2021) kaynaklı lektinler, fare splenositlerine karşı mitojenik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir.

Diğer umut verici lektinler arasında, F344 sıçanlarının dalak lenf hücrelerine karşı mitojenik aktivite ve HIV-1 gp120 için güçlü bağlanma afinitesi gösteren *Hygrophorus russula*'dan (HRL) elde edilen mannoz spesifik lektini yer alır (Singh ve ark., 2015).

2.1.2.3. İmmünomodülatör Etki

Mantarların genellikle bağışıklığı güçlendirici ajanlar oldukları ileri sürülmüştür. Mantarların antikanser, otoimmün hastalıkları baskılaması ve alerji gibi terapötik etkileri immünomodülatör etkileri ile ilişkilendirilmiştir. Mantarlardan immünomodülatör ve/veya antitümör aktivitesi olan polisakkaritler (özellikle β -D-glukanlar), polisakkaropeptidler (PSP), polisakkarit proteinleri gibi birçok madde izole edilmiştir. Mantarlardan elde edilen bu aktif maddelerin başlıca immünomodülatör etkileri, hematopoietik kök hücreler, lenfositler, makrofajlar,

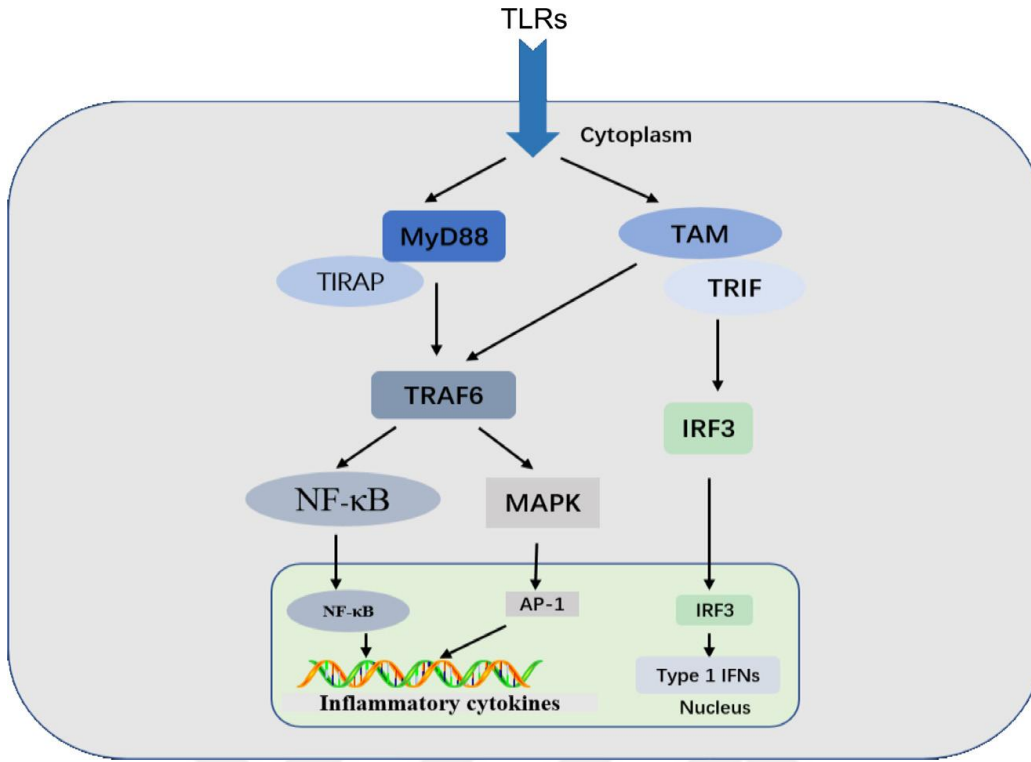
dendritik hücreler (DC'ler) ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi immün hücrelerin aktivasyonunu ve mutajenitesini içerir ve sitokinlerin üretimine yol açar (Valverde ve ark., 2015).

İmmün yanıt, patojenlerin hızlı bir şekilde tanınmasını sağlayarak inflamatuvar cevapları indükleyen doğal ve kronik inflamatuvar olayların ilerlemesinde rol oynayan edinilmiş (adaptif) immün yanıtları içermektedir (Lull ve ark., 2005).

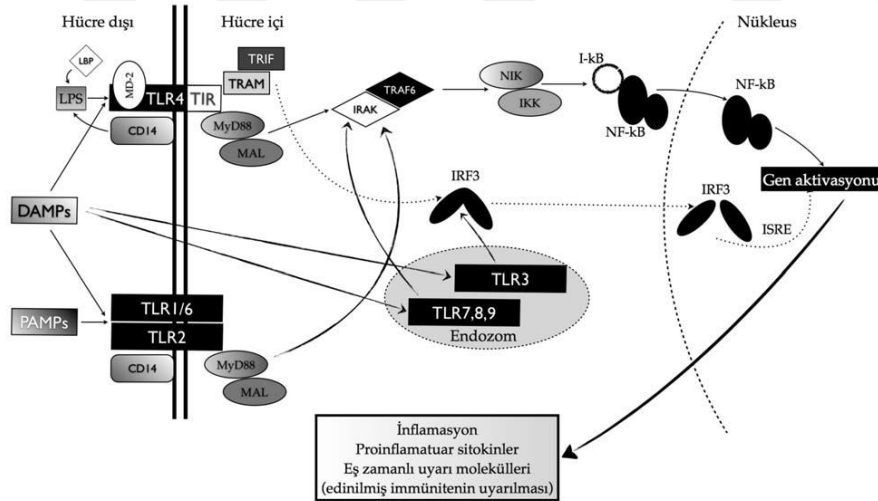
Doğal immün yanıtta görevli olan nötrofilik granüositler ve makrofajlar tarafından tanınan mikroorganizmalar fagositoz ile yok edilir. Makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından mikroorganizmanın tanınması yapı tanıyan reseptörler (PRR: Pattern Recognition Receptors)'lerin en önemli bileşeni olan TLR (Sirke sineğinin Toll reseptörlerine benzer reseptörleri) tarafından gerçekleşir. Mikroorganizmanın patojenle ilişkili moleküler yapıları (PAMPs: pathojen-associated molecular patterns), bu reseptörlere bağlanması ile inflamatuvar yanıt başlatılır (Lull ve ark., 2005; Chen ve ark., 2018).

Lektinlerin immünomodülatör aktivitelerini başlatmak için en önemli adım, lektin reseptörü olarak görev gören hücre yüzeyindeki glikanlara lektinin bağlanmasıdır. TLR-2 lipoglikanları bağlarken, TLR-4 bakteri duvarındaki lipopolisakkariti, TLR-5-flagellin polisakkariti, TLR-9 ise bakteri duvarındaki metillenmemiş CpG nukleotidi bağlar. TLR tarafından miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (MyD88) bağımlı veya bağımsız sinyal yolağı ile MAP kinazların uyarılması AP-1 ve NFκB gibi transkripsiyon faktörlerin nükleer translokasyonuna ve sitokin üretimini sağlayan genlerin transkripsiyonunun başlamasına yol açarlar ve patojenlere karşı savaşır (Şekil 2-6) (Chen ve ark., 2018).

Lipopolisakkarit (LPS) veya DAMPs (tehlike ilişkili moleküler kalıplar) ile TLR4'in etkileşimi sonucunda intraselüler yollar aktive olur (Şekil 2-7) (Kundakçı ve Pirat, 2012).



Şekil 2-6: TLR sinyali yolu (Chen ve ark., 2018).

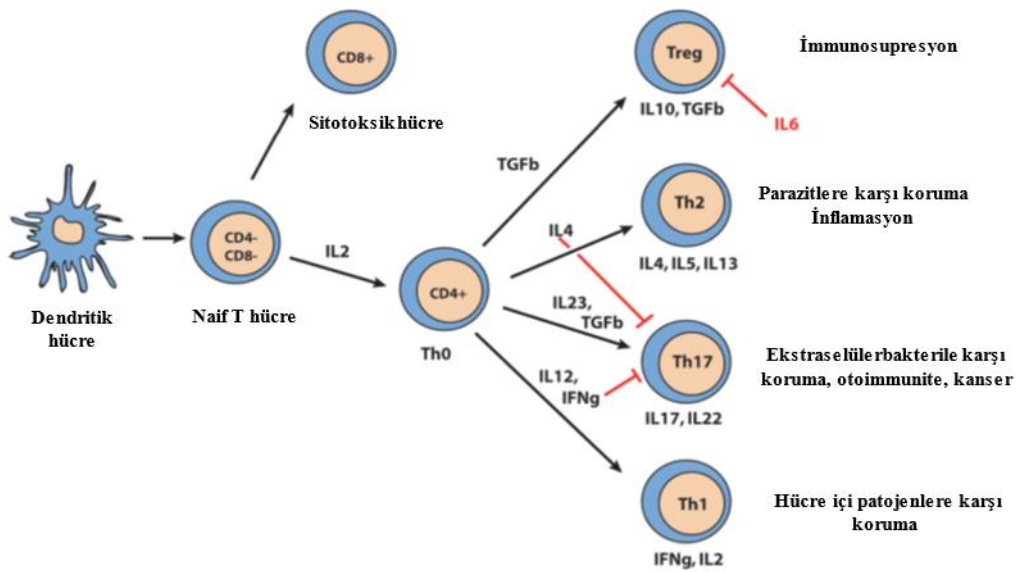


Şekil 2-7: LPS veya DAMPs ile intraselüler yolların aktivasyonu (Kundakci ve Pirat, 2012).

DAMP: danger-associated molecular patterns
 MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88
 NIK: nuclear factor-κB inducing kinase
 PAMP: pathogen-associated molecular pattern.
 TIR: toll-like receptor
 LPS: lipopolisakkarit
 TRAM: TRIF-related adapter molecule
 TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β.

MAL: MyD88 adapter-like
 IRAK: interleukin-1 receptor associated kinase
 IRF3: interferon regulatory factor 3
 ISRE: interferon sensitive response element
 LBP: lipoprotein binding protein
 TRAF6: TNF receptor associated factor 6
 IKK: IκB kinase

Edinilmiş (adaptif) immün yanıt ise lenfositler (T hücreleri) tarafından oluşturulur ve her mikroorganizma için özgüldür. T lenfositleri, T yardımcı (Th) ve sitotoksik T (Tc) hücrelerini kapsar. Antijen ile henüz etkileşime girmemiş bu hücrelere naif T hücreleri denir. Th hücreleri B hücreleri ile etkileşir ve onların bölünmelerine, farklılaşmalarına ve antikor yapmalarına veya mononükleer fagositlerle etkileşime girmelerine ve hücre içi patojenleri yok etmelerine yardımcı olur. Th hücreleri, çözünür sitokinler salgıyarak ve/veya doğrudan hücre-hücre etkileşimi yoluyla etkilerini gösterirler. Tc hücreleri, patojenler tarafından enfekte olmuş hedef konakçı hücreleri yok eder. CD4+ yüzey molekülleri taşıyan Th hücreleri (Th0) sitokin salınımını uyararak hücre dışı patojenleri, CD8+ yüzey molekülleri taşıyan T hücreleri hücre içi patojenleri yok eder. Makrofajlar tarafından salgılanan IL-1 ile kenetlenmesi sonucunda Th0 aktive olur ve farklılaşma geçirerek T-regülatör (T-reg) hücresi olarak da bilinen T supresör (Ts) hücreye dönüşür (Lull ve ark., 2005) (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Naif T hücrelerinin farklılaşması (Matricon ve ark., 2010).

CD4+ yüzey molekülleri taşıyan T hücreleri Th1, Th2 veya Th3 olarak sınıflandırılır. Th-1 hücreleri IL-2, IFN- γ , TNF- β ve IL-2 gibi proinflatuar sitokinleri salgırlar ve hücre içi parazitlere karşı immün yanıt oluştururlar. Th-2

hücreler ise IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13 sitokinleri salgırlar ve hücre dışı parazitlere karşı hümöral immün cevapta önemli role sahiptir. Farklılaşmamış (Th0) hücreleri IL-4 ve INF- γ salgırlar (Lull ve ark., 2005).

İnflamasyon tarafından aktive edilen makrofajlar ve adipositler gibi inflamatuvar hücreler, IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin ve enzimlerin üretimini indükler. Bu nedenle hastalık teşhisi, prognoz ve terapötik tedavi için inflamatuvar belirteçler olarak kullanılabilirler. İnflamatuvar sitokinler, enfeksiyona veya inflamasyona karşı bağışıklık yanıtını modüle eder ve karmaşık bir etkileşim ağı aracılığıyla inflamasyonun kendisini düzenler. Sitokinler, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar özelliklere sahiptirler. İnflamatuvar sitokinler interlökinler, koloni uyarıcı faktörler (CSF), IFN'ler, TNF'ler, TGF'ler ve kemokinler olarak sınıflandırılır ve hücreler tarafından öncelikle lökositleri enfeksiyon veya yaralanma bölgesine toplamak için üretilir.

TNF- α , makrofajlar ve antijen sunan hücreler tarafından salgılanan bir proinflamatuar sitokindir. Makrofajları aktive ederek IL-1 β ve IL-6 salgılanmasını, adezyon moleküllerin ekspresyonunu, fibroblastların proliferasyonunu arttırarak, prokoagülan faktörlerini aktive ederek, apoptozu inhibe ederek inflamasyon sürecinin şiddetlenmesine neden olur. T hücreleri tarafından IFN- γ salgılanmasını uyarır, B hücrelerini stimüle eder (Chen ve ark., 2018).

Monosit, makrofajlar, NK hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler tarafından, enfeksiyon, lezyon ve strese cevap olarak immün yanıtın erken fazında salgılanan bir proinflamatuvar sitokin olan IL-1, karaciğerden akut faz proteinlerin, sinir sistemi üzerine olan etkisiyle prostaglandinlerin salgılanmasını, CD4 T hücrelerinin farklılaşmasını ve lökosit/endotel hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyonunu artırır (Duque ve Descoteaux, 2014). IL-1, ateşi indüklemek için hipotalamusa etki ederek klinik öneme sahiptir, bu nedenle, buna endojen bir pirojen denir. IL-1 kan basıncında düşmeye veya şoka neden olur, etkileri kortikosteroidler tarafından inhibe edilir (Justiz ve Qurie 2020).

Makrofajlar, endotel hücreleri ve aktive edilmiş T hücreleri tarafından salgılanan IL-6, B hücresi farklılaşmasında ve akut faz proteinlerinin uyarılmasında rol oynar (Duque ve Descoteaux, 2014).

Bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10, aktive olan makrofajlar, B ve T hücreleri tarafından salgılanır, makrofaj aktivasyonunu ve TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-12 salgılanmasını baskılar. IL-10 aktive makrofajlardaki MHC-II ekspresiyonunu baskılayarak antijen sunumunun güçlü inhibitörü olarak görev görür. Ayrıca Th1 ve NK hücreleri tarafından IFN- γ salgılanmasını inhibe eder, immunoglobulinlerin büyümesini, farklılaşmasını ve B hücreleri tarafından salgılanmasını uyarırlar (Duque ve Descoteaux, 2014). Patojenik Th17 hücre yanıtlarını aşağı düzenleme ile regüle eder (Justiz ve Qurie 2020).

Aktive olan NK hücreleri, Th1 ve CD8+ sitotoksik hücreler tarafından salgılanan ve bir proinflamatuar sitokin olan IFN-y (Tip II interferon olarak da bilinir), ilk olarak anti-viral aktivitesi ile tanımlanmış olan önemli bir immün düzenleyici sitokindir. Anti-viral, antiproliferatif ve immün düzenleyici aktivitelerinden dolayı konak savunmasında kilit rol oynar. IFN-y, sitokinlerin üretimini indükler, sınıf I ve II MHC antijenleri, Fc reseptörleri, lökosit adezyon molekülleri ve B7 antijeni dahil olmak üzere çeşitli membran proteinlerinin ekspresyonunu yukarı düzenleme ile regüle eder (Chen ve ark., 2018).

Prostaglandin E2'nin inflamasyondaki rolü karmaşıktır. Hücre tipine ve çeşitli reseptörlerin ekspresyonuna bağlı olarak bazı durumlarda pro-inflamatuar aktivite gösterirken, bazı durumlarda ise anti-inflamatuar bir rol oynar. İnflamatuar Th17 hücrelerinin aktivasyonunu uyarabilir, ancak diğer T hücresi alt gruplarında IL-2 ve IL-12 üretimini baskılayabilir. In vitro deneyler, prostaglandin E2'nin T-hücre üretimini engelleyebileceğini göstermiştir (Xi ve Gerriets, 2020).

Mantar preparatlarının kullanımıyla, dendritik hücre olgunlaşması ve aktivasyonu, makrofaj ve fagositik aktivasyon, NK hücre aktivasyonu, CD4 / CD8 ve Th1/Th2 oranlarının iyileştirilmesi olmak üzere çok sayıda immünolojik olarak ilişkili aktivite doğrulanmıştır (Anonymous, 2006).

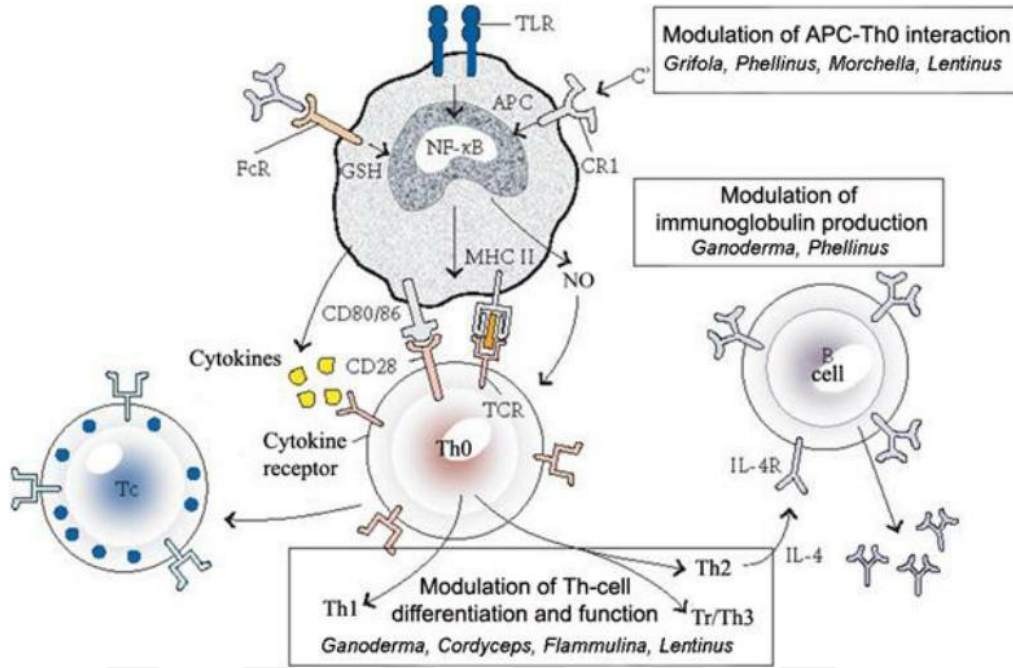
Birçok çalışmada mantar β -glukanların, mononükleer fagosit sistemini (örneğin, makrofajlar, monositler) ve bazı lenfositleri (örneğin, NK hücreleri) uyarmak suretiyle konakçı savunma sistemindeki humoral ve hücre aracılı immün yanıtların oluşmasından önce enfekte veya transforme edilmiş hücreleri başarılı bir şekilde ortadan kaldırabilen interferon ve interleokinler gibi sitokinlerin üretimini arttırdıkları gösterilmiştir (Zaidman ve ark., 2005). Mac-1, CD11b / CD18 veya

α M β 2-integrin olarak da bilinen kompleman reseptör tip 3 (CR3)'ün, bir adhezyon molekülü ve makrofajlar gibi immün efektör hücreler üzerindeki β -glukanı tanıyan faktör I ile bölünen C3b (iC3b) için bir reseptör olarak görev görmesi, bu reseptörün lökositler üzerinde başlıca β -glukan reseptörü olduğu ve bu karbonhidratların tüm immünomodülatör etkilerine aracılık ettiği önerisine yol açmıştır (Zaidman ve ark., 2005).

Cheung ve ark. (2002), çok sayıda tümör hücre hatlarında β -glukanların monoklonal antikolarla kombinasyonunun etkisini araştırmış ve sitotoksitede çok önemli bir artış görüldüğü bildirmişlerdir. Bunun, C3 ile opsonizasyona karşı tümör hücresi direncinin üstesinden gelinmesiyle ortaya çıktığı görülmüştür. Artan ilgi ve monoklonal antikoların artan kullanımı ile mantarların bu özelliği potansiyel bir öneme sahip olduğu ileri sürülmüştür (Anonymous, 2006).

Yenilebilir bir mantar olan *Flammulina velutipes*'ten elde edilen Fip-fve immünomodülatör proteininin, insan kırmızı kan hücrelerini aglutine ettiği, insan periferik kan lenfositlerini uyardığı, sistemik anafilaksi reaksiyonunu ve fare ayak yastıklarının lokal şişmesini baskıladığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu proteinin p38 mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal yoluyla IL-2 ve IFN- γ 'nin transkripsiyonel ekspresyonunu (Ko ve ark., 1995) akış yukarı regüle ettiği ve IFN- γ salgılayan Th1 hücrelerini (Wang ve ark., 2004) uyardığını rapor edilmiştir.

Volvariella volvacea mantarından elde edilen Fip-vvo proteinin Bal b/c farelerinde BSA ile indüklenen Arthus reaksiyonunu baskıladığı ve IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , lenfotoksin ve IL-2 reseptörünün transkripsiyonel ekspresyonunu arttırdığı, böylece sitokin düzenlemesi yoluyla bağışıklık modülasyonunu etkilediği bildirilmiştir (Hsu ve ark., 1997). İmmunomodülatör etkili mantar bileşiklerin edinilmiş immün sistemindeki hedefleri Şekil 2-9'da gösterilmiştir.



Şekil 2-9: İmmunomodülatör etkili mantar bileşiklerin adaptif immün sistemindeki hedefleri (Lull ve ark., 2005).

APC: antijen sunan hücre; APC grubu olarak makrofaj, dendritik ve B hücreleri görev alır.

C': aktive olan compleman

CD: farklılaşma kümesi

CR1: compleman reseptör tip 1

FcR: Fc reseptör

GSH: Glutasyon

IL-4: İnterlökin-4

TR: Regülatör T hücresi

IL-4R: İnterlökin-4 reseptörü

NO: Nitrik oksit

TC: Sitotoksik T lenfosit

TCR: T-hücre reseptörü

TH: Yardımcı T hücresi

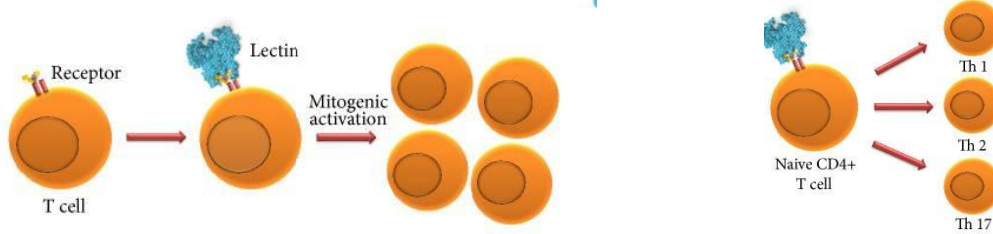
TLR: Toll-benzeri reseptör

MHC II: Major Histocompatibility Complex (Temel Doku Uyuşmazlık Antijenleri);

APC hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve CD4+ veya CD8+T hücrelerine antijenik peptidi sunan hücreler

Mantar lektinleri, immün yanıtın güçlü modülatörleri olarak etki ettikleri bildirilmiştir. *Tricholoma mongolicum* mantarından izole edilen TML-1 ve TML-2 lektinlerin, lektin uygulanan farelerden elde edilen makrofajları aktive ederek Th1 yanıtını uyardıkları ve makrofajlar tarafından TNF- α üretimini arttırdıkları görülmüştür. Bu etkinin, makrofajların yüzeyindeki glikanlara lektinlerin bağlanmaları ve immün yanıtını düzenlenmelerinden ileri geldiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 1996). *Volvariella volvacea* mantarından saflaştırılan VVL lektini fare dalak lenfositlerin proliferasyonunu indüklediği ve Th1 yanıtını arttırarak, IL-2, INF- γ 'nın transkripsiyonel ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (She ve ark., 1998). Benzer aktivite *Ganoderma capense* (Ngai ve Ng, 2004) ve *Pleurotus citrinopileatus* (Li ve ark., 2008) lektinin gösterdiği de rapor edilmiştir. Lektin tarafından T

hücrelerin mitojenik aktivasyonu ve Th1, Th2 ve Th17 cevapları Şekil 2-10'de gösterilmiştir.



Şekil 2-10: Lektin tarafından T hücrelerin mitojenik aktivasyonu ve Th1, Th2 ve Th17 cevapları (Coelho ve ark., 2017).

2.1.2.4. Antimikrobial Aktivite

Antiviral etki gösteren en önemli maddeler arasında insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1)'e karşı etkili olan ve *Ganoderma lucidum*'dan izole edilen ganoderiol F, ganodermanontriol, ganoderic acid B; influenza virüsü tip A'ya karşı etkili olan ve *Ganoderma pfeifferi*'den izole edilen ganodermadiol, lucidadiol, applanoxidic acid G gibi triterpenler'dir. *Flammulina velutipes* mantar türünden izole edilen ribozomu inaktive eden bir protein olan velutin, HIV-1 ters transkriptaz inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Antitümör etki gösteren en önemli maddeler ise kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, lentinan ve porisin denilen vb. yalnızca makro mantarlardan izole edilmiş maddelerdir. Bu bileşikler aynı zamanda antiviral özellik de göstermektedir. Thomas Jefferson Üniversite hastanesi tarafından bildirilmiş bir çalışmada, Coriolus, Shitake, Reishi ve Maitake mantarlarının etken maddelerinden özellikle aktif heksoz (AHCC) ve MGN-3 bileşenleri incelenmiş ve tümör yayılımını engellediği ve antioksidan etkilerinden dolayı bağışıklık sistemini güçlendirdiği belirlenmiştir (Lindequist ve ark., 2005; Anonymous, 2006).

Pleurotus ostreatus (Iwalokun ve ark., 2007; Wolf ve ark., 2008; Mustafa ve ark., 2015), *Pleurotus cornucopiae* ve *Pleurotus salmoneostramineus* (Mustafa ve ark., 2015) mantarların meyve gövdesi ve miselyumdan hazırlanan infüzyon veya ekstraktların antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca, antiviral aktiviteleri de ilgi çekmiş ve rapor edilmiştir (Seo ve Choi, 2021). *Pleurotus ostreatus* mantarının meyve gövdesinden izole edilen ubiquitin benzeri N terminal

dizisi içeren bir glikoprotein HIV-1 ters transkriptazı inhibe ettiği bildirilmiştir (Wang ve Ng, 2000).

Agaricus blazei, *Schizophyllum commune*, *Boletus edulis*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Cordyceps militaris* ve *Inocybe umbrinella* lektinleri HIV-1 ters transkriptaz inhibitörleri oldukları bildirilmiştir (Hasan ve ark., 2015). Bugüne kadar tanımlanmış en güçlü HIV-1 ters transkriptaz inhibitörü, *Pleurotus citrinopilatus*'tan izole edilen lektinin olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2008).

Bazı lektinler, konak hücre yüzeyindeki glikan zincirleri ile etkileşim yoluyla enfeksiyon mekanizmasına aracılık ederek virüsün hücreye girmesine neden olur.

2.1.3. *Pleurotus* Türleri

İstiridye mantarı olarak da bilinen bu cinsin yaklaşık 40 türü vardır. *Pleurotus* türleri, önemli farmakolojik/nutrasötik özelliği olan birçok bileşik içerdiklerinden dolayı uzun süredir tıbbi mantar olarak kullanılmaktadır. *Pleurotus* türleri, immünomodülatör, antiproliferatif ve antitümör aktiviteleri olan lektinler; antioksidan aktiviteye sahip olan fenolik bileşikler, triterpenoidler ve saponinler (Wang ve ark., 1998), immüno-arttırıcı ve antikanser aktiviteleri olan polisakkaritler (polisakkaropeptidler), hipokolesterolemik ajan olarak kullanılan lovastatin içerdikleri bildirilmiştir. Diğer yenilebilir mantarlardan daha zengin protein, amino asit ve diyet lif kaynağı olarak kullanıldıkları (Jo ve ark., 2019), A, D, K, B ve C vitaminleri bakımından zengin ve az yağ ile sindirilebilir karbonhidrat içerdikleri için düşük kalorili diyetler için uygun oldukları saptanmıştır (Han ve ark., 2011).

Pleurotus türlerinin antitümör, antiviral, antibakteriyel, hipokolesterolemik, hipoglisemik, antitrombotik ve immünomodülatör etkilere sahip oldukları, kan basıncını ve kan lipid konsantrasyonlarını düşürdükleri gösterilmiştir (Jedinak ve Sliva, 2008; Mori ve ark., 2008; Jayakumar ve ark., 2008; Patel ve ark., 2012; Khan ve Tania, 2012; Mariga ve ark., 2014; Valverde ve ark., 2015; Ajana ve Savita, 2017; Choi ve ark., 2017). Bu türe ait olan *P. ostreatus* ve *P. eryngii*, ticari olarak üretilen yenilebilir mantarlardır (Wang ve Ng, 2004).

Apiaceae familyası üyesi olan *P. eryngii* var. *ferulae*, 1000-2500 m gibi yüksek olan dağlarda ve dağ yamaçlarında yayılış gösteren, ilkbahar aylarında doğadan toplanarak yol kenarlarında ve yöre pazarlarında satılan; çasır, çakşır, çasur, heliz,

kırkor, göbek, göbelek ve mendik mantarı adı ile bilinmektedir. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Elazığ, Adıyaman, Malatya, Tunceli, Bingöl vb. illerde sıklıkla tüketilmekte (Akyüz ve Kirbağ, 2007).

Yaygın olarak kral istiridye mantarı olarak adlandırılan popüler bir yenilebilir mantar türü olan *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus* türlerine ait bir tetrapolar basidiomycete'dir (Sun ve ark., 2017). Çin'de "çiçek cennetinin mantarı" olarak anılır ve geleneksel Çin tıbbında canlandırıcı ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkili çay şeklinde tüketilir. Ayrıca cilt bakımı, eklem ve kas gevşemesi gibi birçok rahatsızlığın yanı sıra zayıflık ve yorgunluğun tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir (Mariga ve ark., 2014). Olağanüstü tadı, besin değeri ve biyolojik işlevleri nedeniyle yenilebilir bir mantar olarak popülerdir, bu nedenle üretimi hızla büyüyerek Kuzey Afrika, Avrupa ve Asya'daki tüketici talebini karşılamaktadır (Sun ve ark., 2017).

P. eryngii var. *ferulae*'den elde edilen bazı ekstraktlar, önemli antitümör (Choi ve ark., 2004; Yuan ve ark., 2017b), antijenotoksik, antioksidan ve tirozinaz inhibe edici (Hu ve ark., 2009; Alam ve ark., 2012), anti-kolinerjik ve beyin hücrelerini koruyucu (Hong ve ark., 2004) aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Mantarın meyvesinden izole edilen pleuron adlı bir maddenin güçlü nötrofil elastaz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2011).



Resim 2-1: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* (Alp, 2020)

Lektinlerin geniş uygulama yelpazesi, bilinen lektinlerin derinlemesine araştırılmasının yanı sıra ilginç karbonhidrat bağlama özellikleri veya biyolojik aktivitelere sahip yeni lektinlerin araştırılması da lektinolojinin önemli hedeflerinden biridir.

Anabilim Dalımızda lektinler üzerinde yapılan bir çalışmada, *A. vera* yaprak pulpasından tuzla fraksiyonlu çöktürme ve hidroksilapatit sütun kromatografi yöntemleri kullanılarak Aloctin I ve Aloctin II olarak adlandırılan iki izolektinin kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi (Akev ve Can, 1999). Bir sonraki çalışmada kısmi olarak saflaştırılmış aloktin I, Sephadex G-50 jel filtrasyonu kolonundan elüe edilerek saf olarak elde edildi. Lektinin molekül ağırlığı 45 000 dalton olduğu belirlendi ve SDS – PAGE’de her birinin molekül ağırlığı 15 000 dalton olan üç altbiriminden oluştuğu sonucuna varıldı (Akev ve ark. 2002-2003). Daha sonraki çalışmada *Aloe vera* yapraklarının pulpasından, amonyum sülfatla çöktürme ve çok daha spesifik bir saflaştırma yöntemi olan ovalbumin bağlanmış siyanojen bromür ile aktive edilmiş Sefaroz 4B affinite kromatografisi ile aloktin saflaştırılması gerçekleştirildi (Özsoy ve ark., 2012). *Aloe vera*’dan izole edilen lektinin antikanser (Akev ve ark., 2007; Kuruca ve ark., 2019; Akev ve ark., 2020a; Akev ve ark., 2020b) aktivite gösterdiği belirlendi.

Lektinler üzerindeki çalışmalarımızın bir devamı olan bu çalışmada, *Pleurotus eryngyii* var. *ferulae* mantarından saflaştırılan, poliakrilamid jel elektroforezi ile saflığı kontrol edilen lektinin molekül ağırlığının ve şeker inhibisyon deneyleri ile lektine spesifik olan bir karbohidrat biriminin tespit edilmesi ve anti-inflamatuar etkilerinin incelenmesi ile mantar lektinlerinin rolünün anlaşılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra, bu proteinlerin inflamatuvar ve kanser hastalıklarında tedavi edici amaçla kullanımlarına dair bir fikir verebileceği de düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Albumin (BSA) [Sigma A7906]

Amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; Merck 101217]

Anti-iNOS antibody [ABCAM ab15323]

Bakır sülfat $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$; Sigma 7758]

Bikinkoninik Asid Kiti [Sigma B9643, BCA1]

Bromfenol mavisi [Merck 8122]

Coomassie brilliant blue R-250 [Fluka; 221234]

COX-2 Antibody [NOVUS NB100-689SS]

DEAE Sepharose [Sigma DCL6B100]

D-Fukoz [Sigma F8150]

D-Galaktoz [Merck 4060]

D-Glukozamin hidroklorür [Fluka K5402]

Disodyum hidrojen fosfat $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ [Riedel de Haën 4272]

D-laktoz [Merck7656]

D-Mannoz [Fluka 232576]

D-Metil- α -D-mannopiranoz [Sigma M6882]

D-PBS [Multicell 311-425-CL]

D-Rafinoz [Fluka 223802]

Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) [Multicell 319-005-CL]

Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate [Sigma E5134]

Fare makrofaj RAW 264.7 [ATCC TIB-71]

Fetal bovine serum [Capricorn Scientific FBS-11A]

GAPDH [ABCAM ab8245]

Glasiyal asetik asit [Merk K46982863]

Glisin [Sigma G8898]

Goat Anti-mouse IgG (HRP) [Santa Cruz Biotechnology sc-2005]

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) [ABCAM ab205718]

Hidroklorik Asid [Merck, 109057]

LPS (Escherichia coli, serotip O26:B6) [Sigma L2654]

Luminol/Enhancer ve Peroksit çözeltileri [Bio-Rad, 170-5060]

Maltoz [Merck 5911]

Methanol [Merk 1.06009.2511]

Mini Protein TGX Gels [Bio-Rad L007087 B]

Mouse IFN-gamma Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS606]

Mouse IL-10 Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS614/2]

Mouse IL-1beta Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS6002]

Mouse IL-6 Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS603/2]

Mouse TNF-alpha Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS607/3]

MTS Reaktif Tozu [Promega G1112]

N-Asetil-D-galaktozamin [Sigma A2795]

N-asetil-D-glukozamin [Fluka K6478]

4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit [Fluka 73673]

4-nitrofenil- β -D-glukopiranozit [Fluka 73676]

Nonidet P-40 [Sigma, 74385]

Ovalbumin [BDH Chemicals, Poole, England, 33008]

Penisilin-Streptomisin 10000 U/mL [WISENT, 450-201-EL]

PGE2 (Prostaglandin E2) ELISA Kit [ELABSCIENCE E-EL-0034]

Poliviniliden diflorür (PVDF) Membran [Bio-Rad 170-4156]

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) [Merck 104871]

Protein Marker [Invitrogen LC5615]

Sephadex G-100 [Pharmacia 17-0061-01]

Sodyum dodesil sülfat (SDS) [Fluka 71725]

Sodyum klorür [Merck 106404]

Transfer Tamponu 5x [Bio-Rad 10026938]

Tris (hidroksimetil) aminometan [Merck 108387]

Trypan blue [Merck E11732]

Trypsin [Sigma T4799]

Tween 20 [P1379]

Yağsız Süt Tozu [Sigma M7409]

β -Merkaptoetanol [Merck, 805740]

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buz Makinesi [Eurfrigor]

Buzdolabı [Ariston]

Çalkalamalı İnkübatör [N-Biotek]

Çalkalayıcı [IKA KS260]

Cam kolon [Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden]

CO_2 Destekli İnkübatör [N-Biotek]

Değirmen [IKA-WERKE M20]

Derin dondurucu [-20°C , Bosch]

Derin dondurucu [-85°C , Nuare]

Etüv [Heraeus]

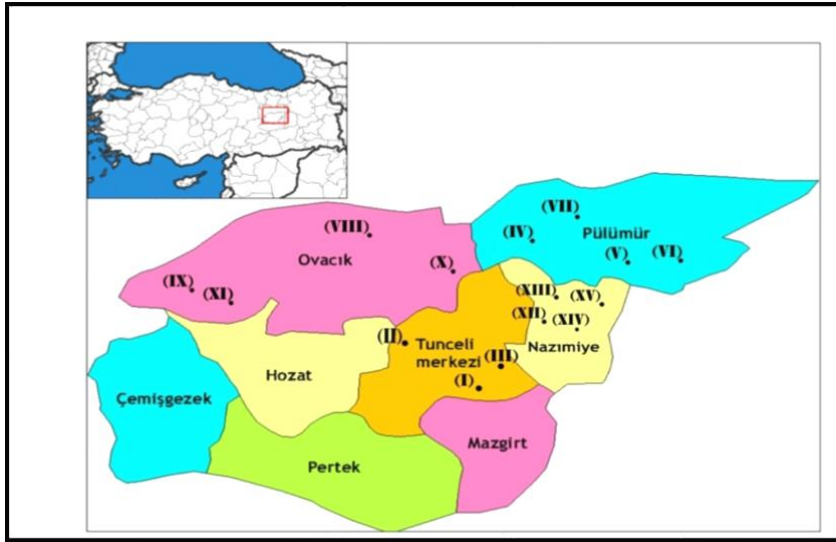
Fraksiyon toplayıcı [Gilson FC 204]

Hassas Terazî [AND HM 200]

Hemaglutinasyon aktivitesi tayininde, Işıık Mikroskopu [Olympus]
Hemositometre Lamı [Isolab]
Inverted Mikroskop [Olympus]
Isı Bloğu [Lab Line]
Jel Görüntüleme Cihazı [Vilber Lourmat, Fusion FX5]
Laminar Flow Kabin [N-Biotek]
Manyetik karıştııcı [Kermanlar]
Mikro-plaka Okuyucu [Eon Biotek]
Otomatik hücre sayım cihazı [LUNAI]
Otomatik pipet takımı [Gilson ve Eppendorf]
pH Metre (WTW) [Radiometer 92]
Santrifüj işlemlerinde, masa tipi soğutuculu santrifüj [Heraeus-Megafuge 1.OR]
Şırınga [Set Inject]
Spektrofotometre [Shimadzu UV-1208]
Steril 15 mL'lik Santrifüj Tüpü [NEST 601052]
Steril 50 mL'lik Santrifüj Tüpü [NEST 602052]
Steril 96 Kuyucuklu Plaka [NEST 701001]
37°C'lik Su Banyosu [Memmert]
Turbo Transfer Sistemi [Bio-Rad]
Ultra Saf Su Cihazı [Elga]
Ultrasonik banyo [Elmasonic S10]
Ultrasonik Homojenizatör [Art-MİCCRA D-1]
Vertikal Jel Elektroforezi Cihazı [Bio-Rad]
Vorteks [Velp Scientifica]

3.3. *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Mantarının Toplanması

Arazi çalışması, 2020 yılında Tunceli İl sınırı içerisinde kalan Pülümür, Ovacık, Nazımiye ilçelerindeki ve Tunceli merkeze bağlı Kocakoç Köyü, Karşılar Köyü ve Güleç Köyü civarındaki mantarların doğal olarak yetişebildiği uygun habitatlarda, Nisan-Mayıs-Haziran aylarında Munzur Üniversitesinden Dr. Öğretim üyesi Hevidar Alp tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 3-1). Toplanan makrofungus örnekleri kurutuldu. Türlerin tanısı, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 3-1: Arazi çalışması sonucu ulaşılan makrofungusların harita üzerindeki yetiştirme yerleri (Alp, 2020).

* I. Kocakoç Köyü, II. Karşılar Köyü, III. Güleç Köyü, IV. Kocatepe Köyü, V. Çobanyıldızı Köyü, VI. Balpayam Köyü, VII. Ardıçlı Köyü, VIII. Akyayık Köyü, IX. Yenikonak Köyü, X. Yalmanlar Köyü, XI. Cevizlidere Köyü, XII. Büyükyurt Köyü, XIII. Dokuzkaya Köyü, XIV. Sarıayla Köyü, XV. Yaylacık Köyü

** VI., IX. ve XIV. bölgelerden *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*

3.4. *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Mantarından Lektin Elde Edilmesi

3.4.1. Kullanılan Çözeltiler

- **0,06 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7,4)**

9,072 g KH_2PO_4 ve 11,866 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 600 ml distile suda çözüldü. pH'sı N HCl veya N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- **0,006 M Fosfatla Tamponlanmış Serum Fizyolojik (PBS; Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4)**

900 ml % 0,9 NaCl çözeltisine 100 ml 0,06 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ilave edilerek hazırlandı.

3.4.2. Ham ekstrenin hazırlanması

30 g kuru mantar, değirmende toz haline getirildikten sonra 500 ml PBS (pH 7,4) içeren ve buz içine yerleştirilmiş olan 1000 ml'lik behere aktarıldı ve manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Bir gece buzdolabında bekledildikten sonra 13000 devir/dakikada soğutuculu santrifüjde 30 dakika santrifüje edildi, elde edilen sıvı kısım alındı ve bu şekilde **ham ekstre** elde edildi.

3.5. Mantar Ham Ekstresinden Lektinin % 80 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

Ham ekstreye ortamdaki konsantrasyonu % 80 olacak şekilde havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi ve soğuk dolapta manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra karışım 4°C'de 13 000 rpm'de, 30 dakika santrifüje edildi. Çökelti, çözünbileceği en az miktardaki PBS ile çözüldü ve 4°C'de PBS'e karşı dializ edildi. Çözünmemiş katı partikülleri uzaklaştırmak üzere çözelti tekrar 4°C'de 13 000 rpm'de, 30 dakika santrifüje edildi. Supernatant **% 80 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı, hemaglutinasyon aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra DEAE Sefaroz-4B anyon değiştirici kromatografisi uygulandı.

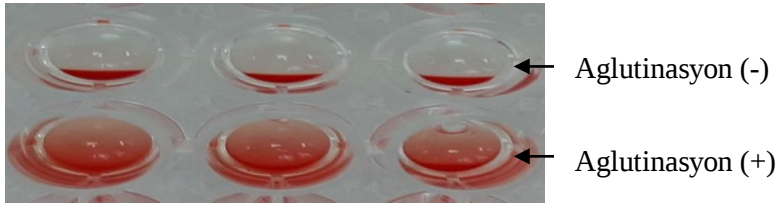
3.6. % 4'lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması

A grubu RH+ insan kanı ile çalışıldı. 2 ml kan sodyum okzalat'lı tüpe alındı, 3 ml % 0,9 NaCl (pH 7,4) ilave edilerek 2 300 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi üstteki sıvı renksiz olana kadar tekrarlandı. Çöken eritrosit hacmi ml olarak okundu. % 4'lük eritrosit süspansiyonunu hazırlamak için Denklem 3-1'den yararlanıldı (Lis ve Sharon, 1972).

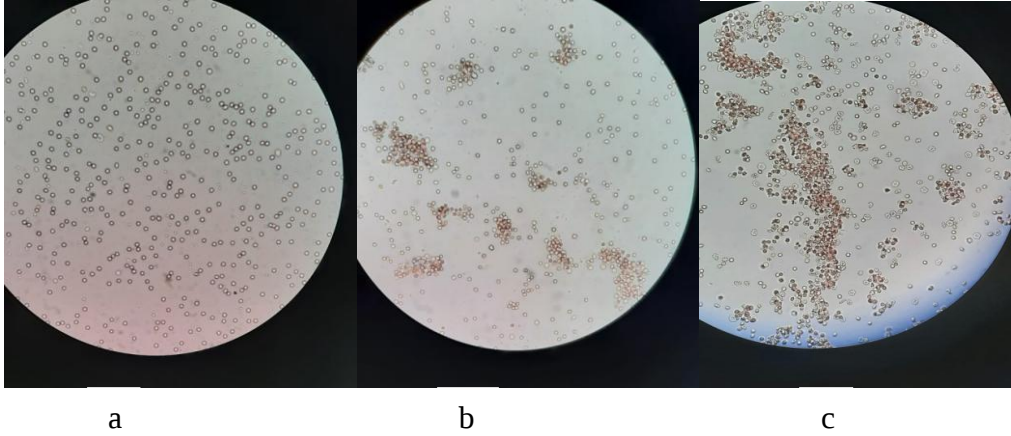
$$\text{Total hacim} = \frac{\text{Çöken eritrosit hacmi}}{\text{İstenen \% eritrosit konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3-1)$$

3.7. Hemaglutinasyon Aktivitenin Tayini

Hemaglutinasyon aktivitesini ölçmek için, seri halinde yarı yarıya seyreltme yöntemi kullanıldı. Deney mikrotitrasyon plağında yapılırken, ilk kuyucuğa 50 μ l örnek (lektin çözeltisi), diğer 9 kuyucuğa 25'er μ l % 0,9 NaCl çözeltisi mikropipet ile konuldu. Birinci kuyucuktan 25 μ l çözelti alınarak ikinci kuyucuğa aktarıldı. Pipet birkaç kez bu kuyucuktaki çözelti ile yıkandıktan sonra, ikinci kuyucuktan 25 μ l çözelti alındı ve üçüncü kuyucuğa aktarıldı. İşlemlere bu şekilde onuncu kuyucuğa kadar devam edildi. Onuncu kuyucuktaki çözeltinin 25 μ l'si dışarı atıldı. Böylece, kuyucuklardaki lektinin (örnek) seyreltme oranları sırasıyla 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64; 1: 128, 1: 256 ve 1: 512 oldu. Seyreltmeler tamamlandıktan sonra, her kuyucuğa % 0,9 NaCl ile hazırlanmış %4'lük eritrosit süspansiyonundan 25'er μ l konuldu. Hafifçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün, yine hafifçe karıştırılarak, hemaglutinasyon aktivitesi, en fazla aglutinasyon (++) ve aglutinasyon olmayan kuyucuk (-) olmak üzere gözle (Şekil 3-2) ve sonra ışık mikroskobu altında (Şekil 3-3) değerlendirilerek saptandı.



Şekil 3-2: Mikrotitrasyon plaklarında hemaglutinasyonun gözle değerlendirilmesinin gösterimi.



Şekil 3-3: Hemaglutinasyonun aydınlık saha (normal ışık) mikroskobunda lam - lamel arasındaki görünümü.

- a) - Hemaglutinasyon (normal eritrositler) (M.B. 40x10),
 b) + Hemaglutinasyon (M.B. 40x10),
 c) ++ Hemaglutinasyon (M.B. 40x10).

3.8. Hemaglutinasyon Aktivitenin Hesaplanması

Bir hemaglutinasyon birimi (HB), deney koşullarında belirgin (++) hemaglutinasyon aktivitesi gösteren en az lektin miktarı olarak tanımlandı ve Denklem 3-2'e göre hesaplandı (Liener ve Hill, 1952).

$$Hb/mg = \frac{Da \times Db \times S}{V} \quad (3-2)$$

V) 1. kuyucuktakilektin çözeltisinin hacmi (ml)

Da) 1. kuyucuktakilektin çözeltisinin seyreltme oranı (hiç seyreltilmemiş lektin çözeltisi, 1: 1)

Db) 1 HB aglutinasyon aktivitesi gösteren kuyucuktakilektin çözeltisinin seyreltme oranı.

S) 1. kuyucuktaki mg/ml lektin (protein) miktarı.

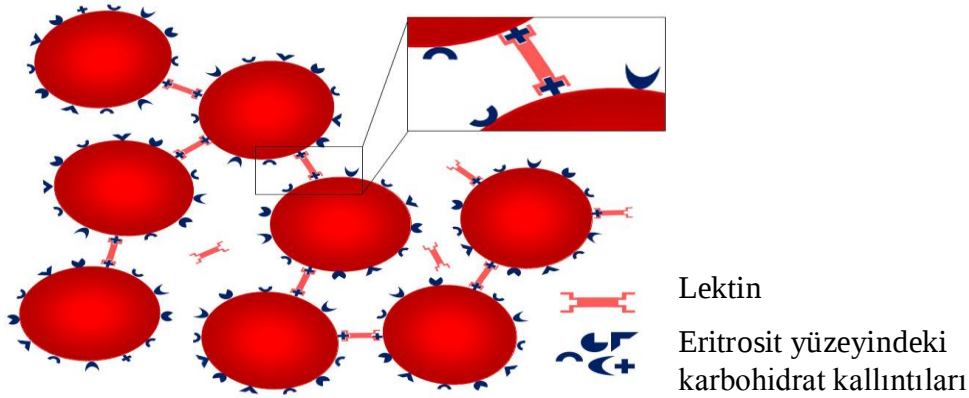
3.9. Eringiolizinin Hemoliz Aktivitesi Üzerine Temperaturün ve Bazı Bileşiklerin Etkisinin İncelenmesi

Eritrositlerin hemolizine neden olan ve lektinin hemaglutinasyon aktivitesinin belirlenmesine engel olan eringiolizinin aktivitesi üzerine temperaturün etkisini belirlemek üzere 1 ml ham ekstre 30 dakika boyunca 37°C ve 50°C'de ısıtıldıktan sonra hemaglutinasyon aktivitesine bakıldı.

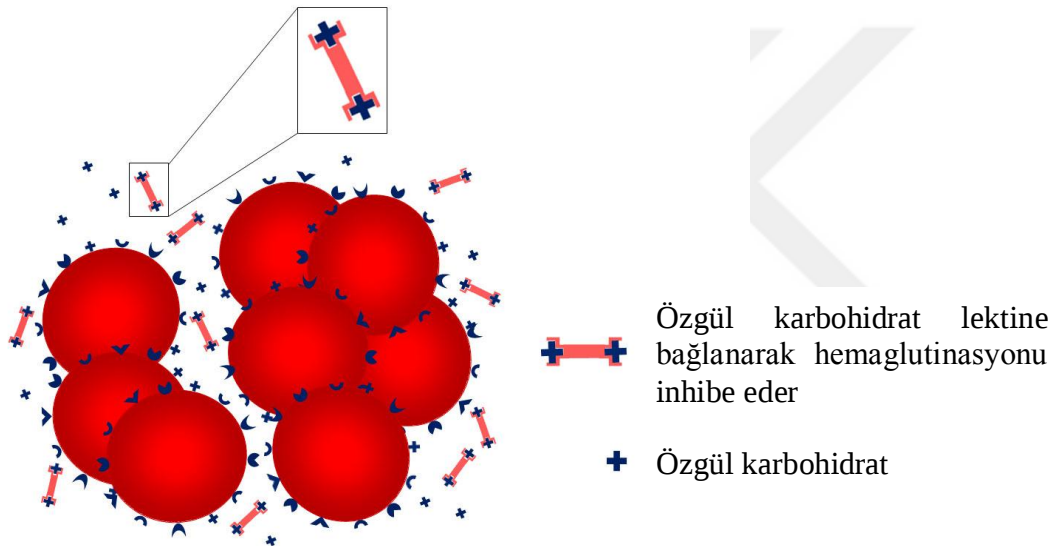
Eringiolizinin hemolitik aktivitesine bazı tuzların etkisinin incelenmesi amacıyla hazırlanan 50 mM Na_2CO_3 , Na_3PO_4 , FeCl_2 ve CuCl_2 tuz çözeltilerin ham ekstreye ilave edilmesinden sonra hemaglutinasyon aktivitesi tayin edildi.

3.10. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi - Hemaglutinasyon İnhibisyon Aktivitesi Testi

Lektinin özgül karbohidrat biriminin belirlenmesinde Wang ve Ng (2000) belirttiği hemaglutinasyon inhibisyon testi modifiye edilerek yapıldı. Bu testte, lektine özgü karbohidrat birimi ortama ilave edildiğinde lektine hızla bağlanır ve böylece aglutinasyon inhibe olur (Şekil 3-4 ve 3-5). Lektinin özgül karbohidrat biriminin seçimi 96-kuyucuklu U-tabanlı mikrotitrasyon plaklarında yapıldı. İlk kuyucuğa 50 μl karbohidrat (100 mM) veya glikoprotein (10 mg/ml), diğer 7 kuyucuğa 25'er μl PBS çözeltisi çoklu otomatik mikropipet ile konuldu. Birinci kuyucuktan 25 μl çözelti alınarak ikinci kuyucuğa aktarıldı. Pipet birkaç kez bu kuyucuktaki çözelti ile yıkandıktan sonra, ikinci kuyucuktan 25 μl çözelti alınıp üçüncü kuyucuğa aktarıldı. İşlemlere bu şekilde sekizce kuyucuğa kadar devam edildi. Sekizce kuyucuktaki çözeltinin 25 μl 'si dışarı atıldı. Daha önce HA titresini belirlenen lektinin 1:4'lük ara stoğu hazırlandı. Tüm kuyucuklara 25 μl 1:4'lük lektin çözeltisi çoklu otomatik mikropipet ile konuldu. Böylece kuyucuklarda son hacimde HA titresini 1:8 olan lektin ile çalışılmış oldu. Mikro plaka yanlardan avuç içleriyle 5 dakika hafifçe vurmak suretiyle kuyucuklardaki çözeltilerin homojen olması sağlandı. Karışım 1 saat oda ısısında bekletildikten sonra kuyucuklara, % 4'lük eritrosit süspansiyonundan çoklu otomatik mikropipet ile 50'er μl ilave edildi ve 2. saatte hemaglutinasyon inhibisyonu gözle değerlendirildi.



Şekil 3-4: Lektinin hemaglutinasyon aktivitesi tayininde kullanılan deneyin prensibi (Santos ve ark., 2014).



Şekil 3-5: Lektinin özgül karbohidrat biriminin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon inhibisyon aktivitesi deneyin prensibi (Santos ve ark., 2014).

3.11. Bikinkoninik Asid (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

3.11.1. Kullanılan çözeltiler

- **Bikinkoninik Asid (BCA) Solüsyonu (pH 11,25):** 0,1 N sodyum hidroksit içinde çözülmüş BCA, sodyum karbonat, sodyum tartarat ve sodyum bikarbonat karışımıdır.
- **BCA Çalışma Ayıracı:** 50 mL BCA solüsyonuna (pH 11,25) 1 mL % 4'lük bakır (II) sülfat pentahidrat çözeltisi eklenerek taze olarak hazırlanır.

3.11.2. Deneyin prensibi

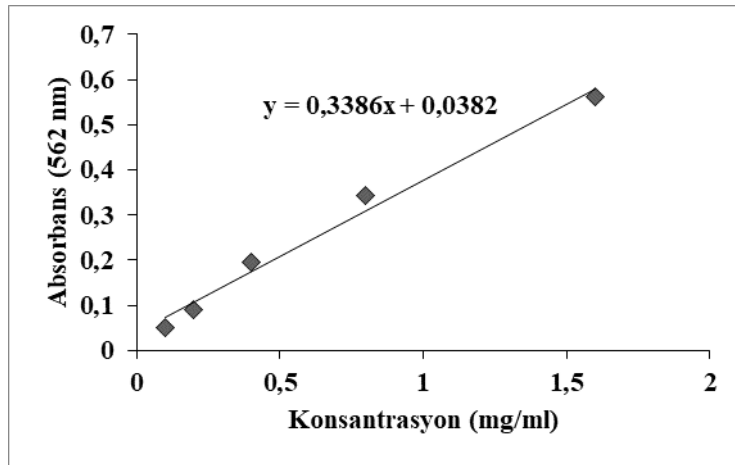
BCA yöntemi, üretici firmanın önerdiği protokol optimize edilerek gerçekleştirildi. Yöntem, Cu^{+2} 'nin alkali ortamda proteinler ile kompleks oluşturması ve Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi esasına dayanır. Cu^{+1} , BCA ile reaksiyona girerek, mor-mavi bir renk oluşturur.

3.11.3. Deneyin yapılışı

Örneklerin protein miktarları 96 kuyucuklu mikro-plakalar kullanılarak tayin edildi. Kuyucuklara 10 μL örnek ve 80 μL BCA çalışma ayıracı eklendi. Plaka 60°C'de 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra absorbanslar 562 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Bu absorbans değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

3.11.4. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 1,6 mg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,8 mg/ml; 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, BCA deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.12. DEAE Sefaroz-4B Anyon Değiştirici Kromatografisi

3.12.1. Kullanılan çözeltiler

- **0,025 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

0,146 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

- **0,05 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

0,292 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

- **0,1 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

0,584 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

- **0,2 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

1,168 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

- **0,5 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

2,92 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

- **1 M NaCl içeren PBS, pH 7,4**

5.84 g NaCl 100 ml PBS'ta çözölerek hazırlandı.

3.12.2. Prensibi:

Örnekte bulunan iyonlar ile iyon değişim reçinesinde bulunan iyonlar arasındaki tersinir iyon değişimine dayanır. Her proteinin net yükü yapısındaki yüklü amino asitlerin miktarına ve bulunduğu çözeltinin pH'sına bağlı olarak değişir. Proteinler izoelektrik noktalarının üzerindeki pH'larda negatif, altındaki pH'larda ise pozitif yüklüdürler. Belirli bir pH değerinde farklı proteinler farklı net yüke sahiptir. Proteinlerin ayırma işlemlerinde de bu yük farklılığından yararlanılmaktadır. İyon değiştiricilerin matriks kısmı, genellikle selölöz, dekstran ve reçine gibi polimerlerden oluşmaktadır. Anyon değişim reçinelerinin yüzeylerinde pozitif yüklü gruplar bulunmaktadır, karşıt iyonlar ise (–) yüklüdür ve (–) yüklü iyonlarla yer değiştirebilirler. Proteinler pI değerinin üzerindeki pH değerinde negatif yüke sahip olduğu için anyon değişim kromatografisi de negatif yüklü proteinleri bağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Anyon değiştiriciler, proteinlerin (–) yüklü karboksil gruplarını bağlarken protonlanmış amino gruplarını iterler. Protein karışımındaki

iyonlar, sabit fazdaki aynı yüklü iyonlarla $[(-) \rightarrow (-)]$ ile yer değiştirerek, kolona bağlanırlar. Bağlanmayan proteinler, kolondan en önce çıkarlar. Daha sonra, iyonik gücü (düşük→yüksek oranda tuz içeren tamponlarla) /pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilir ve bağlı proteinlerin yükü değiştirilerek elüsyonu sağlanır (Jungbauer ve Hahn, 2009).

3.12.3. Yapılışı

1 x 30 cm boyutlarındaki kolona, 15 cm yüksekliğe kadar DEAE Sefaroz-4B dolduruldu ve pH'sı 7,4 olan 10 mM PBS'ten (pH 7,5) 3 kolon hacmi geçirilerek dengelendi. % 80 amonyum sülfat kesiti uygulandıktan sonra, kolondan önce, pH sı 7,4 olan 10 mM PBS'in, daha sonra adı geçen tampona sırasıyla konsantrasyonları 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM ve 1M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan tamponların geçirilmesiyle elüsyon gerçekleştirildi ve fraksiyonlar 1 ml'lik hacimler halinde 30 ml/saat akış hızı ile toplandı. Elüatların 280 nm'deki absorbansları okundu. Diyaliz edildikten sonra her tüpten 25'er µl alınıp, mikropalakalara aktarıldı, 25'şer µl % 4'lük eritrosit süspansyonu ilave edilerek hemaglutinasyon aktivitesi gösterip göstermediği saptandı ve elüsyon grafiği çizildi. Protein pikine rastlayan ve en yüksek hemaglutinasyon aktivitesi gösteren tüplerdeki çözeltiler birleştirildi. 10 mM PBS (pH 7,4)'e karşı dializ edildi ve ultrafiltrasyon membranından geçirilerek (Amicon, PM 10) konsantre edildi. DEAE-Sefaroz CL-6B kromatografisiyle elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren fraksiyona Sefadeks G-100 kromatografisi uygulandı.

3.13. Sefadeks G-100 Jel Filtrasyonu Kromatografisi

3.13.1. Prensibi

Boyut dışlama veya moleküler eleme kromatografisi olarak da bilinen jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin ve diğer biyolojik makromoleküllerin boyutlarındaki farklılığa dayalı bir ayırma tekniğidir. Kolona uygulanan örnek molekülleri, porların boyutundan çok büyükse, matriks tarafından tutulmaz ve kolonu ilk olarak terk eder. Küçük moleküller ise matriks porlarına girer ve burada tutulur (Hagel, 2001).

3.13.2. Yapılışı

Öngörülen kolon hacminin her 2.5 ml'si için 1g Sefadeks G-100 tartıldı ve distile su ile karıştırıldıktan sonra karışım bir gece +4°C de bekletildi. Çapı 1 cm olan cam Pharmacia Fine Chemicals kolona yüksekliği 20 cm oluncaya kadar dolduruldu. Bu suretle hazırlanan kolon, pH'sı 7,4 olan 10 mM PBS geçirilerek dengelendi. DEAE-Sefaroz kromatografisiyle elde edilen fraksiyon Sefadeks G-100 kolonuna uygulandı. Bundan sonra, kolona pH sı 7,4 olan 10 mM PBS'in geçirilmesiyle elüsyon gerçekleştirildi ve elüatlar, 30 ml/saat akış hızı ile 1 ml'lik hacımlar halinde toplandı. Elüatların 280 nm'deki absorbansları okunarak elüsyon grafiği çizildi. Her tüpten 25'er µl alınıp, mikropalakalara aktarıldı ve 25'şer µl % 4'lük eritrosit süspansyonu ilave edilerek hemaglutinasyon aktivitesi gösterip göstermediği saptandı. Protein pikine rastlayan ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren tüplerdeki çözeltiler birleştirildi ve dializ kesine konulduktan sonra şekerde bir gece bekletilerek konsantre edildi.

3.14. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE):

Saf lektinin ve altbirimlerinin molekül ağırlığı Vertical Gel Electrophoresis apparatus (BIO-RAD)'da Laemmli metoduna göre (Laemmli, 1970) % 10-12'lik poliakrilamid jellerde tayin edildi. 20 µg protein içeren örneğe 5:1 oranında örnek yükleme tamponu ilave edildi ve % 12'lik SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 100 Voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Jel % 0,2' lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol: su: asetik asit (45: 45: 10; v/v) karışımındaki çözeltisinde bir gece çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildi. Jel, boyandıktan sonra bir spatül yardımıyla boya içerisinden alınarak metanol: su: asetik asit (25: 65: 10; v/v) karışımından oluşan dekoloran çözeltide, çözelti sık sık değiştirilerek, bekletildi. Buradan alınan jeller asetik asit: metanol: su (10: 5: 85; v/v) karışımı içeren kapta saklandı

3.15. Molekül Ağırlığı Tayini

SDS ortamında poliakrilamid jel elektroforez yönteminde tespit edilen proteinlerin alt birim sayısı ve alt birimlerin moleküler ağırlıkları da belirlenebilir. Jellerin uzunlukları ve protein bantlarının yerleri, dekolorasyondan sonra bromofenol mavisinin göç ettiği mesafeye kadar cm olarak ölçüldü. Buradan protein fraksiyonlarının mobilite (Rf)'leri Denklem 3-3'a göre hesaplandı.

$$\text{Mobilite} = \text{Protein göçme uzaklığı} / \text{Bromfenol mavisi göçme uzaklığı} \quad (3-3)$$

Bu yöntemle molekül ağırlığı tayininde, molekül ağırlıkları belli olan 12 proteinin mobiliteleri ile molekül ağırlıklarının logaritmaları arasında grafik çizildi. Molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin mobilite değeri grafikte yerine konarak tekabül eden molekül ağırlığı bulundu.

3.16. Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi

Lektinlerin sitotoksik aktiviteleri ve anti-inflamatuar etkileri fare makrofaj (RAW 264.7; ATCC TIB-71) hücre hattı kullanılarak belirlendi. Hücre hatları standart hücre kültürü tekniklerine uygun olarak büyütüldü. RAW 264.7 hücreleri %10 FBS ve 100 U/mL penisilin/100µg/mL streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medyumunda çoğaltıldı. Hücreler invert mikroskopta morfolojisi, sayısı ve canlılığı yönünden incelendi. Çoğalan hücrelere 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi ve 3-4dk etüvede beklendi. Tripsinin aktivitesini inhibe etmek için 3 mL fetal sığır serumu içeren büyüme medyum eklendi ve hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler tripan mavisi ile boyanarak hücre sayım cihazda sayıldı. Hücreler 2×10^4 hücre/90µL olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının çalışma kuyucuklarına ekildi. Plakalar 24 saat 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Lektin çözeltisi büyüme medyumunu ile yarı yarıya seyreltilerek son konsantrasyonları 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µg/mL olacak şekilde hücrelere üzerine 10µL hacimde eklendi. Plakalar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 20 µL MTS/PMS karışımı kuyucuklara eklenerek, 2-4 saat inkübe edildi ve 490 nm'de Mikro-plaka Okuyucu cihazda okuma yapıldı.

3.17. Anti-inflamatuar Etkinin İncelenmesi

3.17.1. Hücre kültürü

Çalışmada, sıçan RAW 264.7 makrofajları ve besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kullanıldı. Bu besiyeri üzerine %10 oranında steril fetal sığır serum, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ilave edildi. Hücreler hazırlanan hücre besiyerinde, 37°C ve %5 CO₂'li inkübasyon şartlarında kültüre edildi, haftada 2-3 kez pasajlanarak çoğaltması sağlandı ve düzenli olarak invert mikroskopta morfolojisi, sayısı ve canlılığı yönünden incelendi. Deney için 4.-

10. pasaj sayısı aralığındaki hücreler kullanıldı. Hücrelerin canlılığı tripan mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda kontrol edildi. % 90 oranında canlı oldukları tespit edilen hücrelerin yoğunluğu otomatik hücre sayım cihazında sayıldı. 100 mm'lik petrilere 3×10^6 hücre ekildi. Plakalar 24 saat 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi.

PEFL çözeltisi (1 mg/ml), steril membran filtreden süzülerek steril hale getirildi. Steril lektin çözeltisi son konsantrasyonları 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µg/ml olacak şekilde 100 mm'lik petrilereki hücreler üzerine uyulandı. Ardından ilgili plakalarına 1 µg/ml olacak şekilde LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) ilave edildi. Plakalar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Çalışma grupları:

1. Grup: Sadece makrofaj içeren kuyucuk (M) (Kontrol grubu)
2. Grup: Makrofaj hücreleri ve LPS içeren kuyucuk (M+L)
3. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Lektin (100 µg/ml) içeren kuyucuk (M+L+L-100)
4. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Lektin (50 µg/ml) içeren kuyucuk (M+L+L-50)
5. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Lektin (25 µg/ml) içeren kuyucuk (M+L+L-25)
6. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Lektin (12,5 µg/ml) içeren kuyucuk (M+L+L-12,5)
7. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Lektin (6,25 µg/ml) içeren kuyucuk (M+L+L-6,25)

Hücreler hücre kazıyıcı kullanarak petrilere toplanıp ve santrifüj edildi sonra eppendorf tüpüne alınarak D-PBS ile yıkama yapıldı.

3.17.2. Supernatantların Hazırlanması

3.17.2.1. Kullanılan çözeltiler

- 1X PBS

10 mM Na ₂ HPO ₄	1,42 g
1,8 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g

137 mM NaCl 8 g

2,7 mM KCl 0,2 g

Çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandı ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Hücre Lizis Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 7.4 50 ml

150 mM NaCl 8.76 g

%1 Nonidet P-40 10 ml

% 0.5 Sodyum dezoksikolat 5 g

% 0.1 SDS 1 g

1000 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı.

3.17.2.2. Yapılışı

Hücreler bir eppendorf tüpüne alınarak PBS ilave edildi ve iki gruba ayrıldı. Bir grup 10-15 saniye ara ile sonike edildi, Daha sonra 10.000 x g devirde 5 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve Süpernatant alındı. Diğer gruba 75 µl RİPA tamponu (lisis tamponu) ilave edildi ve 20 dak. 4°C'de inkübe edildi. Örnekler 45 dakika 24,000 g'de 4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve supernatantlar alındı. Süpernatantlar kullanılmak üzere -20°C'de bekletildi.

3.17.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.17.3.1. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 ve INF- γ Miktar Tayini

TNF- α , PGE2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ ve IL-10 seviyelerinin belirlenmesi, "Sandwich ELISA Kiti" kullanılarak, ELISA yöntemi ile yapıldı.

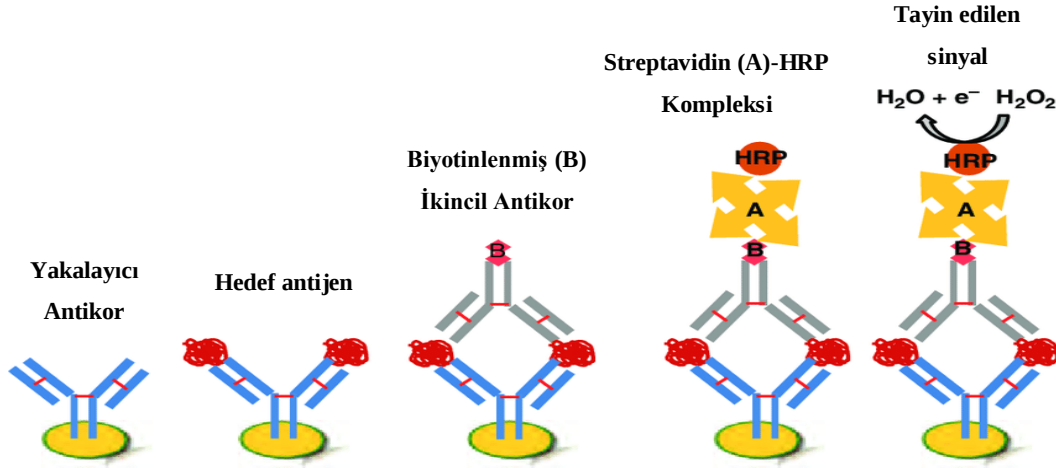
3.17.3.1.1. Kullanılan çözeltiler

- Yıkama tamponu (1x): 50 ml konsantre yıkama tamponuna (20x) 950 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.
- Deney tamponu (1x): 5 ml deney konsantre tamponuna (20x) 95 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.

- Biotin-Konjugat: Konsantre Biotin-Konjugat çözeltinin 100 kez seyreltilmesiyle (60 µl Biotin-Konjugatına 5,94 ml 1x deney tamponunun ilave edilmesiyle) hazırlandı.
- Streptavidin-HRP: Konsantre Streptavidin-HRP çözeltinin 100 kez seyreltilmesiyle (120 µl Streptavidin-HRP'e 11,88 ml 1 x deney tamponunun ilave edilmesiyle) hazırlandı.
- TMB substrat çözeltisi (tetrametil-benzidin)
- Durdurma çözeltisi (1 M Fosforik asit)
- Numune dilüsyon çözeltisi

3.17.3.1.2. Deneyin prensibi

Bu yöntemde, her bir sitokine karşı oluşturulmuş spesifik antikorla kaplanmış mikrolaka kuyuculara uygulanan örnek veya standart içerisindeki sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, INF- γ) bu antikora bağlanır. Bundan sonra ilave edilen biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor birinci antikor tarafından yakalanan sitokine bağlanır, böylece ölçümü yapılması istenen sitokinler, iki antikor ile bağlanmış olur. İlk inkübasyon sonrasında, bağlanmamış biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor yıkama işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra Streptavidin bağlı HRP (Horse Radish Peroxidase) enzimi ilave edilir ve ortamdaki ikinci antikora (biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor) bağlanır. İkinci inkübasyon sonrasında bağlanmamış Streptavidin-HRP enzimi yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır, kuyucuklara substrat ilave edilerek enzimatik reaksiyon sonucunda sitokin miktarı ile orantılı olarak meydana gelen ürünün absorbansı, asit ilavesiyle reaksiyonun durdurulmasından sonra, 450 nm'de mikrolaka okuyucuda ölçülür (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Biotin-Streptavidin ELISA (Sri ve ark., 2019).

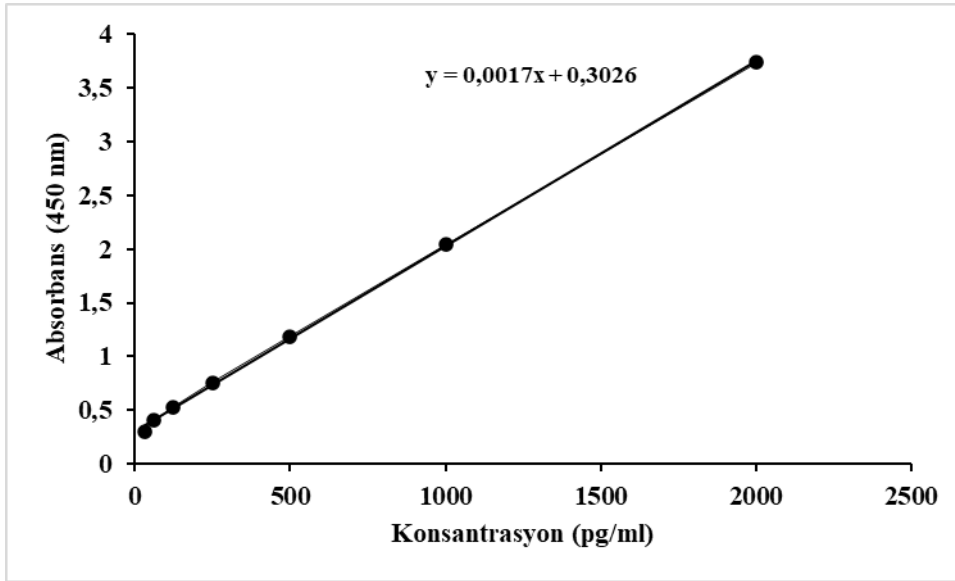
3.17.3.1.3. Deneyin yapılışı

Standart çözeltilerin uygulanacağı kuyucuklara 100 µl standart, numunelerin uygulanacağı kuyucuklara 50 µl numune çözeltisi, boş kontrole ise 100 µl numune çözeltisi eklendi. Tüm kuyucuklara 50 µl biotin ile konjuge ilgili sitokine karşı spesifik antikor (biyotinlenmiş anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10 ve anti-INF- γ) ilave edildikten sonra mikrolağın üstü kapatılarak 2 saat oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve her birine 300 µl yıkama tamponu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin bağlı HRP enzimi ilave edildikten sonra mikrolakanın üstü kapatılarak 1 saat oda ısısında (25°C) mikrolaka çalkalayıcının üzerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve herbirine 300 µl yıkama tamponu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10-30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Herbir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve meydana gelen sarı rengin absorbansı 450 nm’de okundu.

3.17.3.1.4. TNF- α standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

TNF- α ’nın seyreltme çözeltisindeki 2000 pg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 31,3 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler

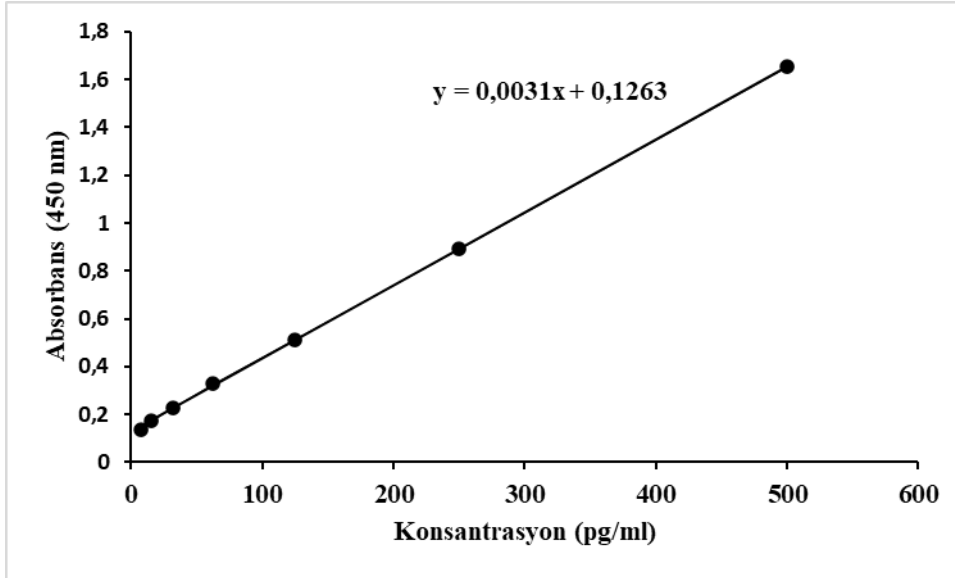
yönteminin uygulanması ile TNF- α standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.17.3.1.5. IL- β standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

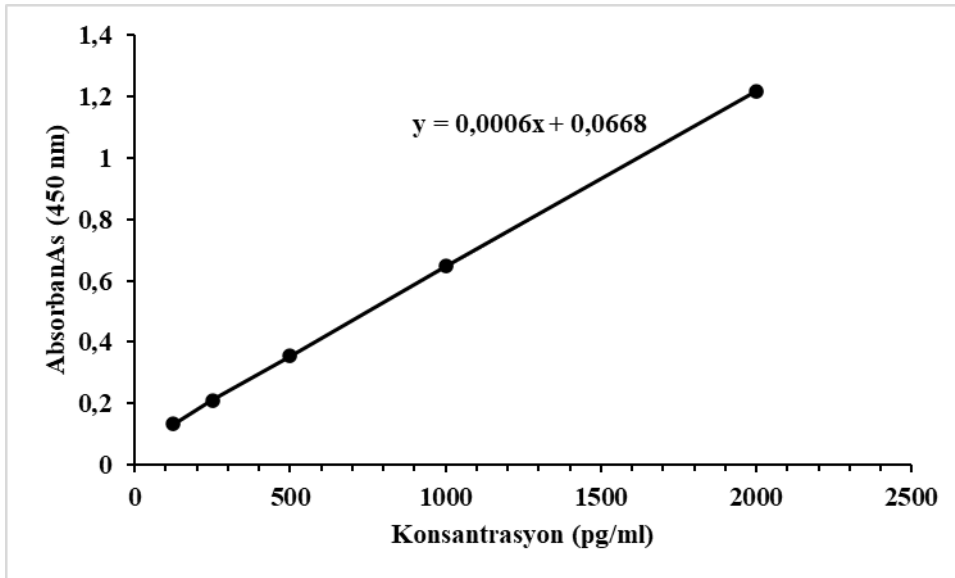
IL-1 β 'nın distile sudaki 1000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 500 pg/ml; 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml ve 7,8 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-1 β 'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-9).



Şekil 3-9 : IL-1β standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.17.3.1.6. IL-6 standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

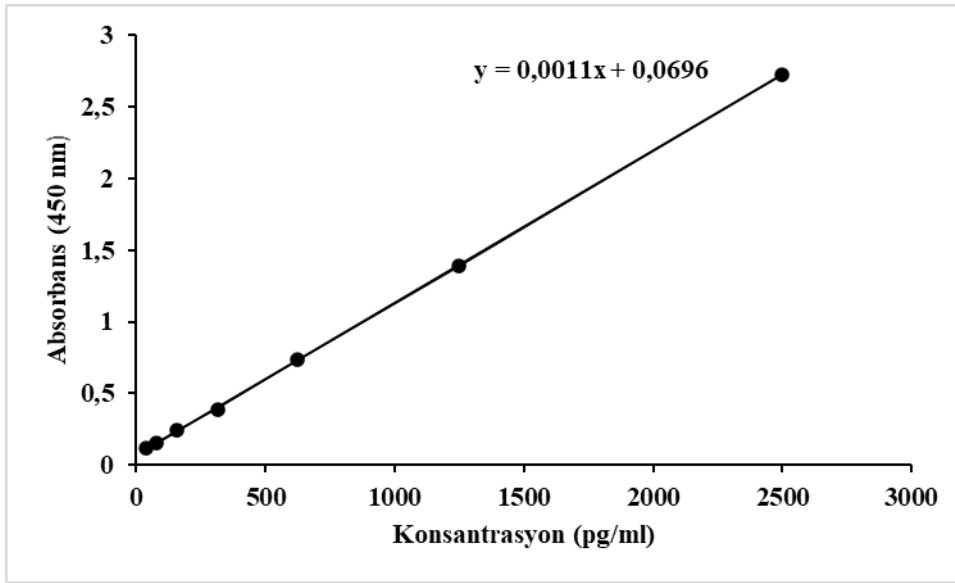
IL-1β'nın distile sudaki 4000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2000 pg/ml; 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 31,3 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-6'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.17.3.1.7. IL-10 standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

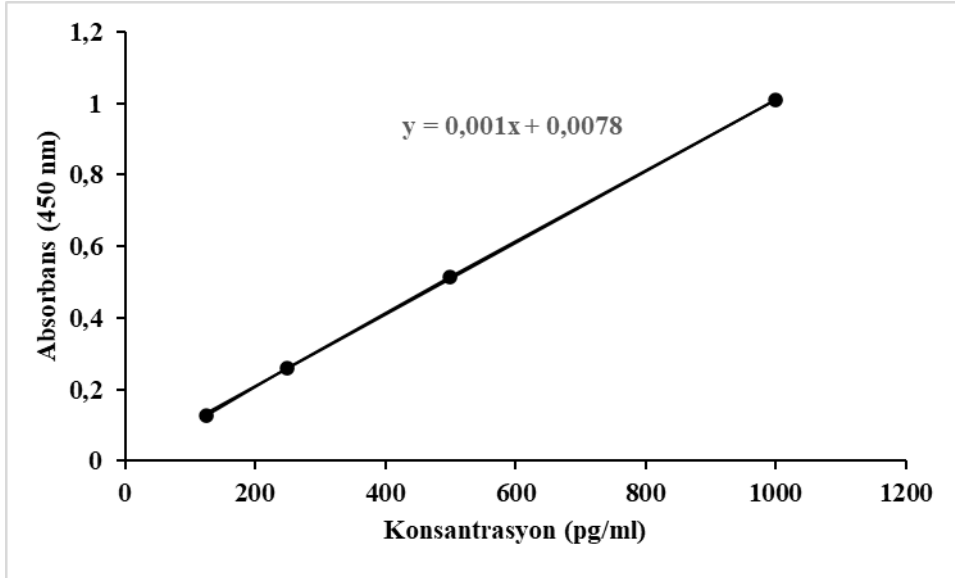
IL-1 β 'nın distile sudaki 5000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2500 pg/ml; 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml ve 39 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-10'nun standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-11).



Şekil 3-11: IL-10 standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.17.3.1.8. IFN-g standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi.

INF- γ 'nın distile sudaki 2000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml ve 15,6 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile INF- γ 'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-12).



Şekil 3-12: INF- γ standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.17.3.2. Prostaglandin Miktar Tayini

3.17.3.1. Kullanılan çözeltiler

- Yıkama tamponu (1x): 30 ml konsantre yıkama çözeltisine (25x) 750 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.
- Biyotinlenmiş ölçüm antikor çalışma çözeltisi (1x): Konsantre biyotinlenmiş ölçüm antikor çözeltinin çözücüsü ile 100 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.
- HRP konjugatı çalışma çözeltisi (1x): Konsantre HRP konjugatı çözeltisinin çözücüsü ile 100 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.
- Substrat çözeltisi
- Durdurma (asit) çözeltisi

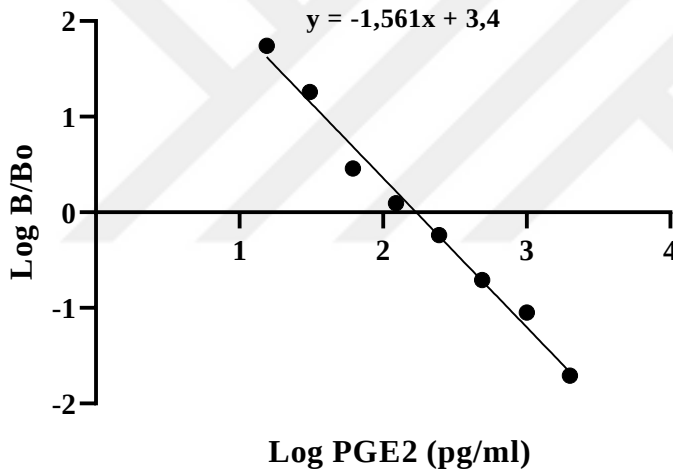
3.17.3.1.2. Deneyin prensibi

Prostaglandin E2 ile kaplı mikrolaka kullanıldı. Standart çözeltilerin veya numunedeki PG'lerin PGE2'ye spesifik biyotinlenmiş ölçüm antikor bağlanma bölgesi için yarışmaları esasına dayanır. Oluşan biyotinlenmiş konjugatın fazlası veya bağlanmamış standart veya numune, yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve HRP ile konjuge olan avidin ilave edilerek inkübe edilir. TMB substratı ilave edildikten sonra, enzim substrat reaksiyonu asit çözeltisinin ilave edilmesi ile durdurulur.

Meydana gelen rengin absorbansı 450 nm’de ölçülmesiyle numulerdeki PG miktarı, PG standardın seri sulandırmaları ile hazırlanan standart eğriden belirlendi.

3.17.3.1.3. Prostaglandin standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

PGE2’nin 2000 pg/ml’lik stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin standart/numune çözeltisi ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile PGE2’nin standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-13).



Şekil 3-13: Prostaglandin standart eğrisi ve regresyon denklemini.

3.17.4. Western Blot Analizi

iNOS ve COX-2 ekspresyonunu belirlemek için indirekt Western Blot analizi gerçekleştirildi.

3.17.4.1. Kullanılan Çözeltiler

- Laemmli” örnek tamponu (6X)
0,375 M Tris-HCl, pH 6.8
%60 (v/v) Gliserol
%12 SDS

0,6 M DTT(ditiyotretiol)

%0,06 Bromfenol mavisi

1:9 oranında β -merkapttoetanol:“Laemmli” örnek tamponu (6X) karıştırıldı.

- **Elektroforez Yürütme Tamponu (Tris/Glisin/SDS)**

25 mM Tris

190 mM Glisin

% 0.1 SDS

pH'sı 8,3'e ayarlandı ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- **TBS-T Tamponu (Tris Buffered Saline with Tween 20, pH 7.5)**

200 ml 20 mM Tris

200 ml 150 mM NaCl

1 ml % 0.1 Tween 20

pH'sı 1 N HCl ile 7.5'e ayarlandı ve 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

- **Transfer Tamponu**

50 ml 5x Transfer Tamponu

50 ml Etanol

150 ml dH₂O

- **Kuvvetli Ayırma (Harsh Stripping) Tamponu**

12,5 mL 0,5 M Tris-HCl

67,5 mL ultra saf dH₂O

20 mL %10'luk SDS

0,8 mL β -merkapttoetanol

- **%5'lik Yağsız Süt Tozu/TBS-T Çözeltisi**

5 gram yağsız süt tozu tartılarak T-BST çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **Kemilüminesans Substrat Çözeltisi:** Luminol/Enhancer ve Peroksit çözeltilerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla çalışma çözeltisi hazırlandı.

3.17.4.2. Deneyin Prensibi

Western Blot, herhangi bir örnekten elde edilen ve birçok protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini saptamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir.

Western blot analizi birbirini takip edecek şekilde beş basamaktan oluşur:

- (1) proteinlerin dikey elektroforez yöntemi ile ayrımı
- (2) proteinlerin membrana aktarımı,
- (3) bloklama,
- (4) birincil antikor uygulanması,
- (5) ikincil antikor uygulanması ve
- (6) görüntüleme

3.17.4.3. Deneyin yapılışı

1. Lipopolisakkarid ile indüklenmiş RAW 264.7 makrofajlar toplanarak RIPA tamponu içinde lizis edilen süpernatantlar örnek olarak kullanıldı.
2. Örneklerin BCA yöntemi ile protein miktar tayinleri yapılarak protein konsantrasyonları belirlendi.
3. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlıklarına göre birbirinden ayrılması sağlandı. 20 µg protein içeren örneğe 5:1 oranında örnek yükleme tamponu ilave edildi ve 5 dk ısıtıcı blok içinde 100 °C’de inkübe edildikten sonra % 12,5’luk SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 100 Voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü.
4. Jelin boyutuna uygun PVDF membranları metanolle 5 dakika muamele edildi.
5. Proteinlerin Jelden Membrana Yarı-Kuru (semi-dry) Yöntem ile Transferi (Blotlama): Molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinleri içeren jel, elektroforez tankından çıkarılarak transfer tamponu emdirilmiş filtre kağıdı ve membrandan oluşan sandviç üzerine dikkatlice konuldu ve üzeri tekrar transfer tamponu emdirilmiş filtre kağıdı ile kapatılarak Trans-Blot Turbo™ transfer sisteminin kaseti içine yerleştirilerek jeldeki proteinlerin membrana aktarımı sağlandı. Mini jel için: 25 V/1,300 mA, 5 dakika süre ile transfer işlemi gerçekleştirildi.

6. Bloklama: Proteinlerin transfer olduğu membran TBS-T (bloklama tamponu) ile hazırlanmış % 5'lik yağsız süt tozu karışımı içinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalandı.
7. Membran, bloklama tamponunun içinde ilgili proteine özgün uygun oranda seyreltilen birincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde (150 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birincil antikor çözeltisi dökülerek üzerine 20 mL TBS-T eklendi ve 5 kez 5'er dakika çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama yapıldı.
8. Membran, bloklama tamponu içinde uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış ikincil antikor ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat çalkalayıcı üzerinde (150 rpm) ile inkübe edildi.
9. İkincil antikor çözeltisi dökülerek üzerine TBS-T eklenerek 5 kez 5'er dk çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama yapıldı.
10. Membran yüzeyine dokunmadan, 2 mL kemüluminisans substrat karışımı (Luminal/Enhancer solution:Peroxide solution, 1:1) tüm yüzeye uygulandı ve 5 dk. oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edildi ve görüntüledi.
11. Görüntüleme: Membran jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fusion FX5) kullanılarak görüntüledi.
12. Ayırma (Stripping): Membrana, 20 ml ayırma tamponundan ilave edildi ve 50°C'da 30 dakika çalkalayıcı üzerinde (150 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ayırma tamponu dökülerek distile su ile 1 saat (her 5 dakika su değiştirilerek) çalkalayıcıda yıkandı. Sonra üzerine 20 mL T-BST eklendi ve 5 kez 5'er dakika aralıkla çalkalayıcıda inkübe edilerek yıkama yapıldı.

3.17.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Graphpad Prism 9'dan ve SPSS 20.0 'dan yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Mantarından Elde Edilen Lektinin Saflaştırılması

Pleurotus eryngii var. *ferulae* mantarının % 80 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek suretiyle elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren 2,4 mg protein içeren 12 ml hacimdeki fraksiyonun DEAE-Sefaroz 4B kolonuna uygulanması ve pH sı 7,4 olan 10 mM PBS'e sırasıyla konsantrasyonları 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM ve 1M olacak şekilde NaCl ilavesiyle hazırlanan elüsyon çözeltilerin geçirilmesiyle gerçekleştirilen elüsyon sonucunda 200 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7,4) ile elüe olan fraksiyonda hemaglutinasyon aktivitesi bulundu (Şekil 4-1). En yüksek aktivite gösteren tüplerin birleştirilmesiyle oluşan ve 1,6 mg protein içeren 3,4 ml'lik fraksiyonun, Sefadeks G-100 kolonuna uygulanması ve pH sı 7,4 olan 10 mM PBS ile gerçekleştirilen elüsyon sonucunda lektin elde edildi (Şekil 4-2). Lektinin elüsyon grafiğini çizebilmek için her bir tüpteki elüatın hemaglutinasyon aktivitesi ve 280 nm'deki absorpsiyonu ölçüldü.

Her kromatografi basamağından sonra elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren fraksiyonlar dializ ve konsantre edildikten sonra saflıkları, poliakrilamid jel elektroforezi ile incelendi.

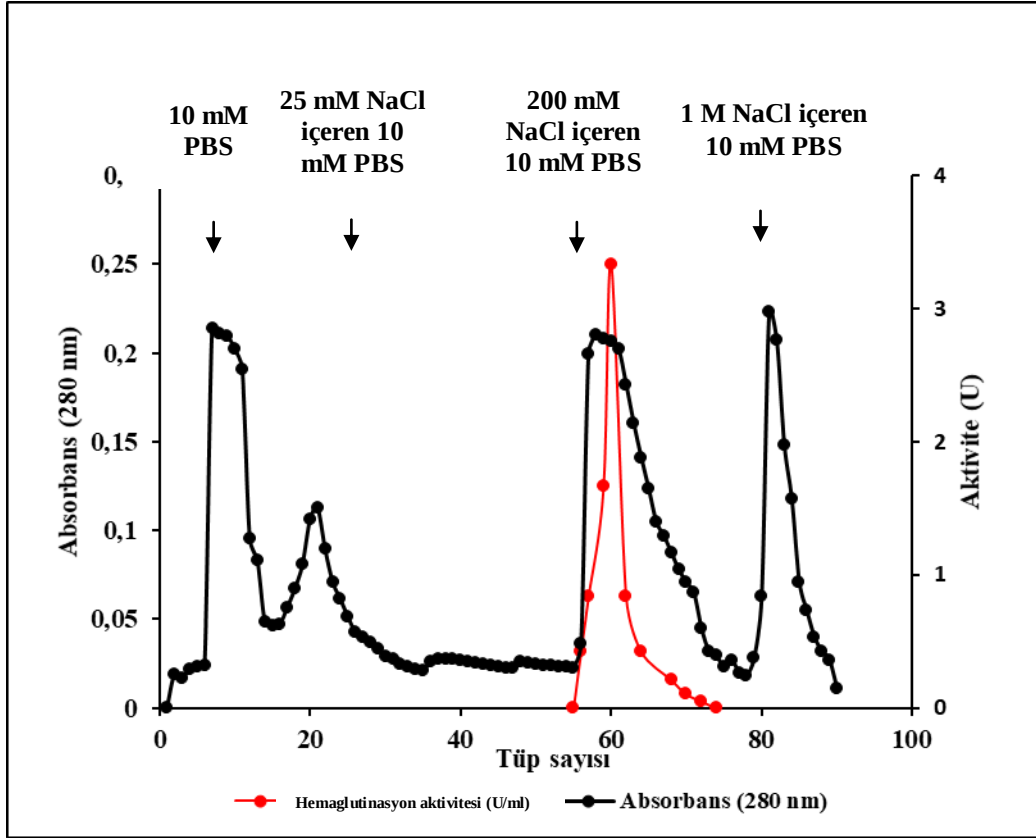
Pleurotus eryngii var. *ferulae* mantarından lektinin saflaştırma evrelerindeki hemaglutinasyon titreleri Tablo 4-1’de, elde edilme sürecindeki işlem basamakları Tablo 4-2’de gösterildi.

Tablo 4-1: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından lektinin saflaştırma evrelerindeki hemaglutinasyon titreleri

Fraksiyon	Hemaglutinasyon titresi								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Ham ekstre	+	+	-	-	-	-	-	-	-
% 80 (NH ₄) ₂ SO ₄	+	+	+	-	-	-	-	-	-
DEAE-Serfaro-4B	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sefadeks G-100	+	+	+	+	+	+	+	+	-

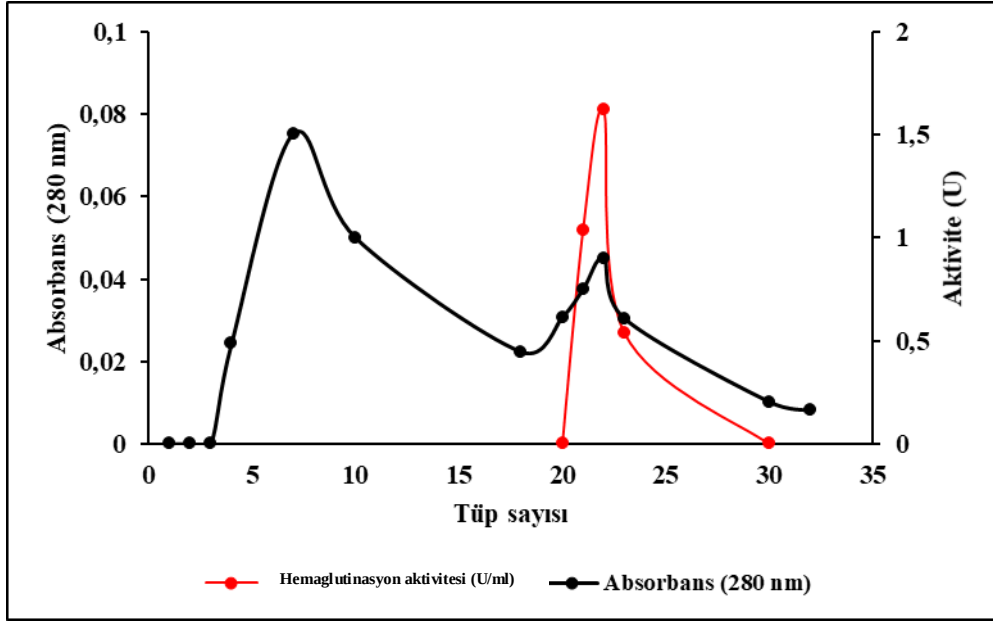
Tablo 4-2: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından (30 g toz) lektinin elde edilme basamakları.

Fraksiyon	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA titresi	Spesifik aktivite (HB/mg)	Saflaştırma oranı
Ham ekstre	400	3,5	1400	2	280	1
% 80 (NH ₄) ₂ SO ₄	12	2,4	28,8	4	384	1,37
DEAE-Serfaro-4B	3,4	1,6	5,4	8	512	1,82
Sefadeks G-100	2	1	2	128	5 120	18,3



Şekil 4-1: *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* ham ekstresi % 80 amonyum sülfat kesitinin DEAE-Sefaroz-4B kolonundaki elusion grafiği

Kolon boyutları: 15 x 1 cm, örnek hacmi 12 ml (28,8 mg protein), akış hızı: 0,5 ml/dak., tamponlar: 10 mM PBS, 25 mM, 200 mM, ve 1M NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7,4).

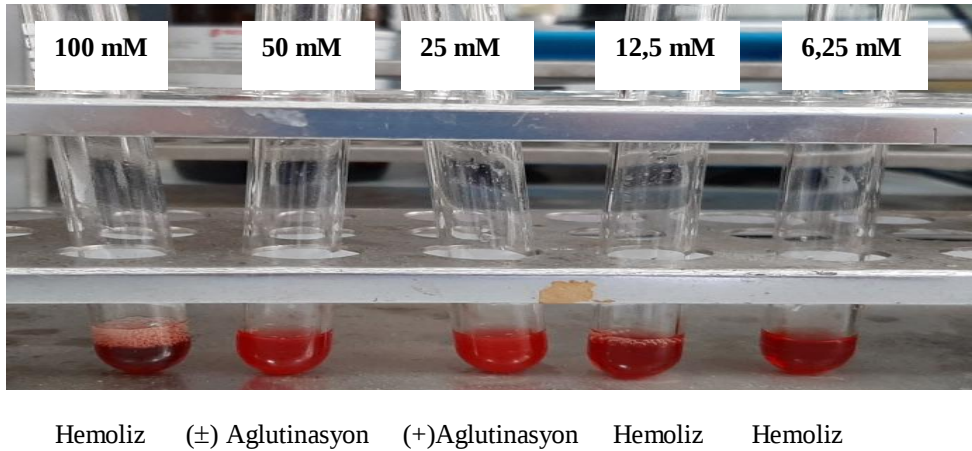


Şekil 4-2: DEAD Sefaroz-4B kromatografisi ile elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren elüatın Sefadeks G-100 kolonundaki elüsyon grafiği.

Kolon boyutları: 10 x 1 cm, örnek hacmi 1,6 ml (5,4 mg protein), akış hızı: 0,5 ml/dak. Kullanılan tampon: 10 mM PBS.

4.2. Eringiolizin Hemaglutinasyon Aktivitesinin Temperatür Ve Bazı Bileşikler Tarafından İnhibisyonun İncelenmesi.

Ham ekstrenin 30 dakika 30° ve 50°C’de ısıtılmasıyla eringiolizinin hemolitik aktivitesinin inhibe olmadığı gözlemlendi. İncelenen tuzlardan sadece Na₃PO₄’ın 25 mM konsantrasyonunda hemolitik aktiviteyi inhibe ettiği, fakat 30 dakika sonra hemolitik aktivitenin geri kazanıldığı görüldü (Resim 4-1).



Resim 4-1: 25 mM Na₃PO₄ ile eringiolizinin hemolitik aktivitesinin inhibe edilmesi.

4.3. Lektinin Özgül Karbohidrat Biriminin Belirlenmesi

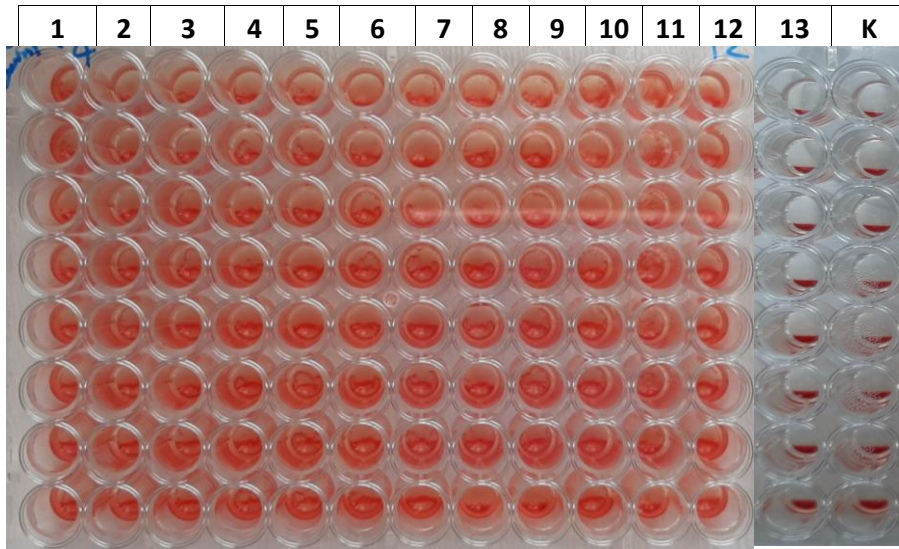
Tablo 4-3'te ve Resim 4-2'de gösterilen sadece bir glikoprotein olan ovalbumin ve karbohidratlardan sadece galaktozun *Pleurotus eryngii* var *ferulae* mantar lektininin hemaglutinasyon aktivitesini inhibe ettiği görüldü.

Tablo 4-3: PEFL'in özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları.

	Karbohidrat/glikoprotein	Karbohidrat/glikoprotein konsantrasyonu (mM)							
		100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
1	D-Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
2	D-glukozamin hidroklorür	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Metil- α -D-mannopiranosit	+	+	+	+	+	+	+	+
4	D-Fukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
5	D-Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+
6	N-asetil-D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+
7	N-asetil-D-galaktozamin	+	+	+	+	+	+	+	+
8	4-nitrofenil- β -D-glukopiranozit	+	+	+	+	+	+	+	+
9	4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit	+	+	+	+	+	+	+	+
10	D-Rafinoz	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Ovalbumin	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-

Başlangıç hemaglutinasyon aktivitesi: 4 HA

+: hemaglutinasyon aktivitesi; -: hemaglutinasyon aktivitesi yok.

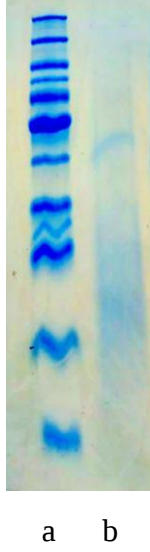


Resim 4-2: PEFL'in özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları.

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1. D-Laktoz | 8. 4-Nitrofenil- β -D-glukopiranozid |
| 2. D-glukozamin hidroklorür | 9. 4-Nitrofenil- α -D-glukopiranozid |
| 3. D-Metil- α -D-mannopiranoz | 10. D-Rafinoz |
| 4. D-Fukoz | 11. Ovalbumin (mg/ml) |
| 5. D-Mannoz | 12. Maltoz |
| 6. N-asetil-D-glukozamin | 13. D-Galaktoz |
| 7. N-asetil-D-galaktozamin | K. Negatif kontrol |

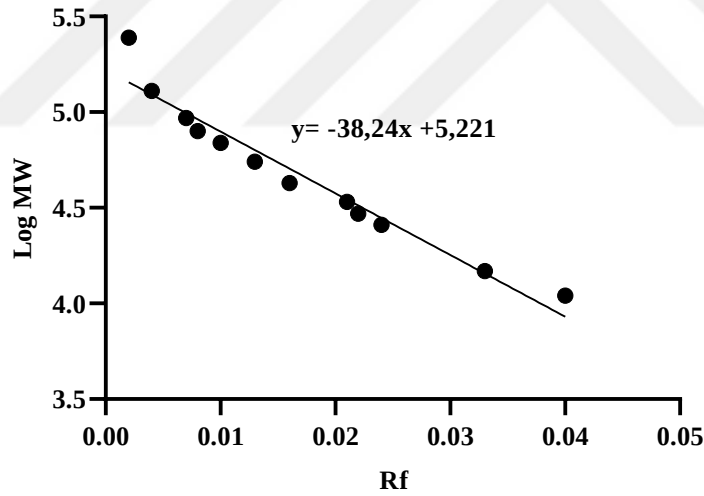
4.4. Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Sefadeks G-100 jel filtrasyonu kromatografisi ile elde edilen elüatının saf olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan SDS-poliakrilamid jel elektrofrezindeki tek protein bantı Şekil (4-3)'de görülmektedir. Lektinin molekül ağırlığı 43 kDa olarak belirlendi (Şekil 4-4).



Şekil 4-3: SDS-PAGE’de görülen protein bandları.

- a) Marker
- b) Sefadeks G-100 kromatografi çıktısı



Şekil 4-4: Standart proteinlerin (MW: 11-250 kDa) SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemi.

4.5. Antiinflamatur aktivitesinin incelenmesi

4.5.1. Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi

Uygulamadan 24 saat sonraki MTS testi sonuçları Tablo 4-4’de gösterildi. PEFL’in 100, 50, 25, 12,5 ve 6,25 µg/ml dozlarında düşük sitotoksik aktivite gösterdiği görüldü.

Tablo 4-4: RAW 264,7 hücrelerinde PEFL'in hücre ölümü üzerine etkisi.

Dozlar (µg/mL)	Hücre ölümü (% inhibisyon)
200	80,56 ± 0,88
100	38,80 ± 1,35
50	23,40 ± 0,92
25	12,49 ± 2,35
12,5	0,11 ± 1,05
6,25	-9,97 ± 3,91
3,125	-11,28 ± 3,91
1,5625	-6,88 ± 2,01

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). Değerler, PEFL ile 24 saatlik inkübasyona ait hücre ölümü (% inhibisyon) sonuçlarını ifade etmektedir.

4.5.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sonuçları

LPS grubundaki PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ değerleri kontrol grubuna oranla önemli bir artış gösterdi (p<0,05). Lektin uygulaması yapılan LPS grubuna ait hücre süpernatantların PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ düzeyinde ise, LPS grubuna oranla, anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (p<0,05). Ayrıca, PEFL uygulaması yapılan LPS grubuna ait hücre süpernatantların IL-10 düzeyinde ise, LPS grubuna oranla, anlamlı bir artış olduğu tespit edildi (p<0,05) (Tablo 4-5; Şekil 4-5). 12,5 ve 6,25 µg/ml konsantrasyonlardaki lektin çözeltilerin inhibe edici etkileri tespit edilmedi.

Tablo 4-5: PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ ve IL-10 parametrelerinin değerlendirilmesi.

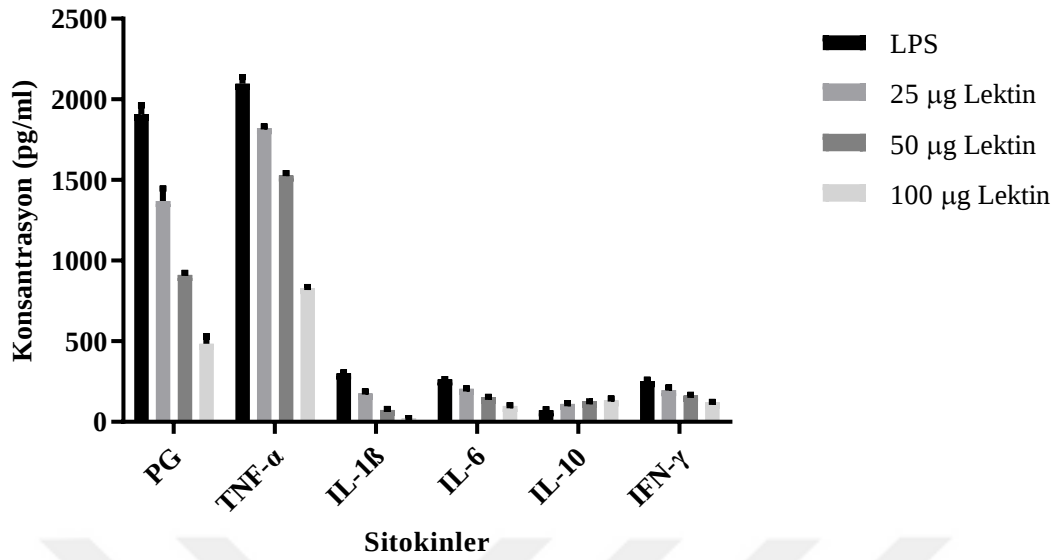
	Lektin			LP		%	EC ₅₀
	100 pg/ml	50 pg/ml	25 pg/ml	1 µg/mg	Kontrol	İnhibisyon	(pg/ml)
PGE2	527,2	911,2	1453,2	1958,8	356,0	73,1 ± 1,8	32,3
	436,1	924,5	1352,6	1846,1	382,1	49,3 ± 3,5	33,9
	492,2	899,9	1302,1	1914,4	390,6	24,4 ± 2,1	29,4
	Ortalama	485,1 ± 45,9 ^a	911,8 ± 12,3 ^b	1369,3 ± 76,9 ^c	1906,4 ± 56,7 ^d	376,3 ± 18,0 ^e	-
TNF-α	836,7	1519,1	1812,3	2130,2	228,1	60,4 ± 0,4	45,6
	831,4	1529,0	1832,0	2110,0	245,3	27,0 ± 2,1	47,7
	822,0	1545,3	1824,4	2052,1	239,2	13,1 ± 1,9	51,5
Ortalama	830,0 ± 7,1 ^a	1529,2 ± 14,0 ^b	1824,4 ± 10,1 ^c	2,097,2 ± 40,5 ^c	237 ± 8,6 ^d	-	48,26 ± 2,9
IL-1β	23,6	76,5	171,4	306,9	11,4	92,6 ± 0,4	26,1
	20,4	66,9	164,9	298,5	6,2	75,3 ± 2,1	25,9
	20,7	79,8	190,7	299,	8,8	41,7 ± 4,6	29,8
Ortalama	21,6 ± 1,7 ^a	74,4 ± 6,7 ^b	175,7 ± 13,4 ^c	301,7 ± 4,5 ^d	8,8 ± 2,5 ^e	-	27,26 ± 2,1
IL-6	104,0	154,0	207,2	260,6	114,0	62,1 ± 1,7	33,8
	97,2	152,2	204,0	264,0	104,0	41,0 ± 0,5	34,2
	98,6	155,2	203,8	266,0	100,2	22,2 ± 1,5	33,1
Ortalama	99,9 ± 3,5 ^a	153,8 ± 1,5 ^b	205,0 ± 1,9 ^c	263,5 ± 2,7 ^d	106,1 ± 7,1 ^a	-	33,7 ± 0,5
IFN-γ	122,4	160,2	216,1	244,2	101,2	51,6 ± 1,4	27,5
	121,2	168,2	186,2	254,2	110,3	35,6 ± 2,7	26,5
	123,8	159,23	190,1	260,1	98,2	25,1 ± 3,1	25,1
Ortalama	122,4 ± 1,20 ^a	162,5 ± 4,9 ^b	197,4 ± 16,1 ^b	252,8 ± 8,0 ^c	103,0 ± 6,3 ^d	-	26,3 ± 1,2
IL-10	136,7	126,7	114,9	69,3	64,9	-	-
	142,1	127,6	106,7	78,5	62,1	-	-
	122,1	128,0	110,3	70,3	66,7	-	-
Ortalama	133,69 ± 10,3 ^a	127,4 ± 0,7 ^b	110,6 ± 4,1 ^c	72,7 ± 5,0 ^d	64,6 ± 2,2 ^d	-	-

Değerler aritmetik ortalama standart sapma olarak ifade edildi, n=3.

Anlamlık sınırı olarak p < 0,05 kabul edildi.

^aLPS grubundan farklı (p<0,05).

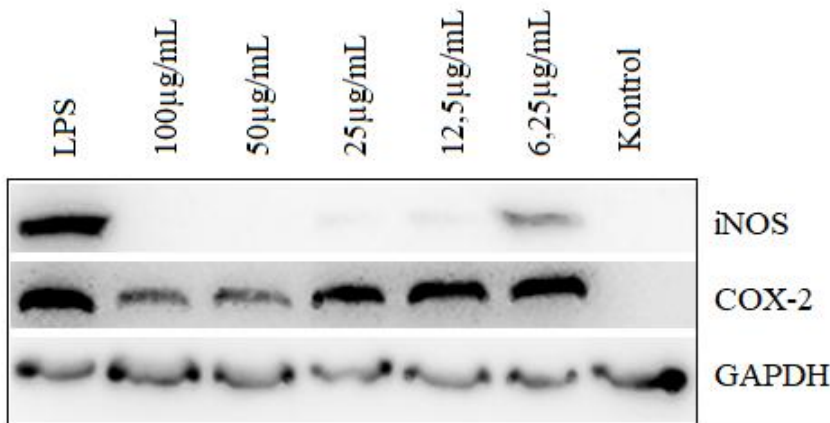
^bKontrol grubundan farklı (p<0,05).



Şekil 4-5: Gruplara göre hücre süpernatantlarında sitokin seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

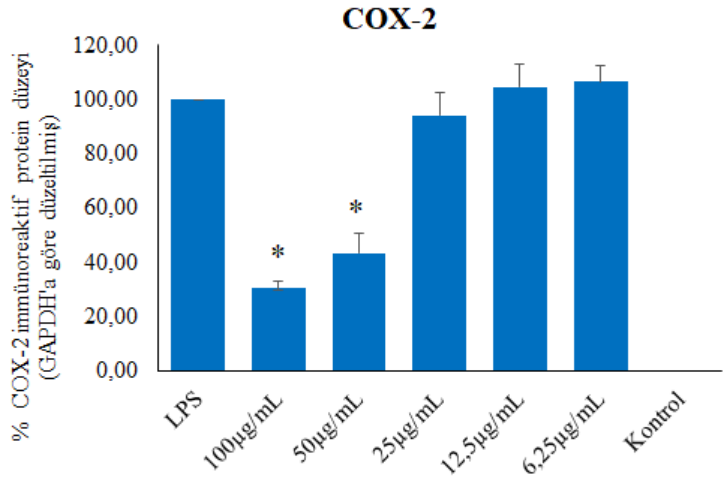
4.5.3. Western Blot Analiz Sonuçları

LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 hücre hatlarına PEFL'in, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/mL olmak üzere beş farklı dozda uygulandı. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre lizatları toplanarak Western Blot analizi yapıldı. Bu sonuçlara göre, PEFL'in doz artışına bağlı olarak immünoreaktif COX-2 ve iNOS protein düzeylerinde azalma gözlemlendi (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 hücrelerinde farklı dozlardaki PEFL'in iNOS ve COX-2 proteinleri üzerine etkileri.

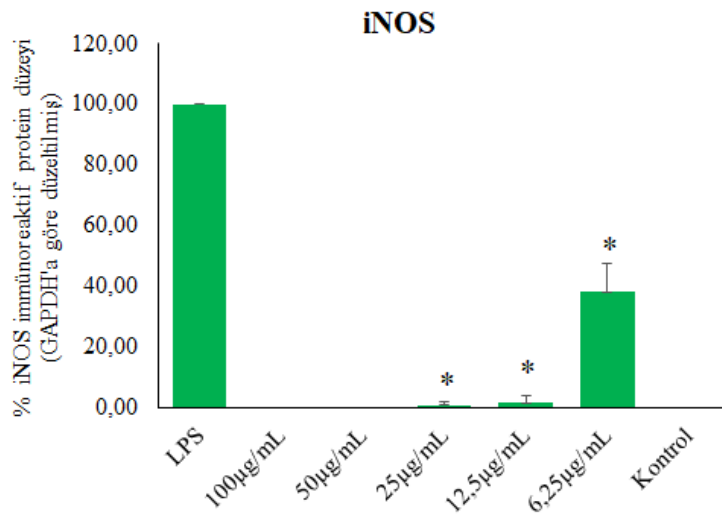
COX-2 protein düzeyine bakıldığında, LPS ile indüklendiği ve PEFL'in uygulaması ile 100 µg/mL konsantrasyonda % 69,4 azaldığı saptanmış olup 25 µg/mL'de ~ % 5,04'lük bir azalma gözlemlendi (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: PEFL'in LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde COX-2 protein düzeyleri üzerine etkisi (LPS 1 µg/ml).

* p>0,05

Bulgularımıza göre, iNOS'un, LPS ile indüklendiği ve protein ekspresyonunun 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda PEFL'in uygulaması ile %100 inhibe olduğu belirlendi. Ayrıca, uygulanan en düşük doz olan 6,25 µg/mL'de dahi ~ % 61,81'lik bir inhibisyon gözlemlendi (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: PEFL'in LPS ile indüklenen inflamasyon modelinde iNOS protein düzeyleri üzerine etkisi (LPS 1 µg/ml).

* p>0,05

5. TARTIŞMA

Lektinler, tıpta kanser tedavisinde ve teşhisinde, glikokonjugatların yapılarının aydınlatılması gibi bilimsel araştırmalarda kullanmak amacıyla memeli dokuları, virüsler, bakteriler, bitkiler ve mantarlar gibi birçok değişik kaynaklardan elde edilmiştir (Dan ve ark., 2016). Mantar lektinlerin elde edilmesinde amonyum sülfat ile çöktürme, iyon değiştirici, jel filtrasyonu ve affinite kolon kromatografisi gibi ayırma yöntemleri kullanılmıştır (Guillot ve Konska, 1977; Singh ve ark., 2015). Adsorban olarak DEAE sellüloz, CNBr ile aktive edilmiş veya epoxy Sepharose dolgu maddeleri kullanılmaktadır.

Pleurotus türlerinden güçlü anti-tümör, mitojenik ve HIV-ters transkriptaz inhibe edici aktivitesi gösteren lektinler izole edilmiştir (Li ve ark., 2008; Xu ve ark., 2014).

Yuan ve ark. (2017a) *Pleurotus eryngii* mantarından DEAE-sefaroze kromatografisi uygulanmasıyla, sırasıyla DE1, DE2, DE3 ve DE4 olarak adlandırılan dört fraksiyon elde etmişler ve sadece D3 fraksiyonunun (PEP proteini) molekül ağırlığını, amino asit yapısını, anti-inflammatuar ve anti-kanser etkilerini incelemişlerdir. Muhtemelen bu dört fraksiyondan bir tanesi lektine ait'tir.

Xu ve ark. (2014) *Pleurotus ferulae* mantar ekstresinden % 75 amonyum sülfatla çöktürme, DEAE-selülöz iyon değişim ve Sepharoz-6B affinite kromatografilerinin uygulanmasıyla saf olarak fare splenositlerine karşı oldukça güçlü proliferatif ve hemaglutinasyon aktivite gösteren D-galaktoz spesifik lektini izole etmişlerdir (Xu ve ark., 2014).

Yukarıdaki literatür bulguları gözönünde bulundurularak bu çalışmada, kurutulmuş istiridye mantarından hazırlanan ham ekstreten amonyum sülfatla çöktürme ve DEAE-Sefaroz-4B anyon değiştirici ve Sefadeks G-100 jel filtrasyonu kromatografi yöntemlerin uygulanması ile lektin 18 kez saflaştırılarak elde edilmiştir.

Pleurotus ostreatus mantarında pleurotolizin adı verilen hemolizin yüksek miktarda tespit edilmiştir (Bernheimer ve Avigad, 1979). *Pleurotus eryngii* mantarından eringeolizin adlı hemolizin izole edilmiştir (Ngai ve ark., 2006). Shibata

ve ark. (2010), pleurotolizine, molekül ağırlığı ve N-terminal amino asid kalıntıları bakımından benzerlik gösteren erilizin adlı hemolizini izole etmişlerdir.

Bu çalışmada da % 80 amonyum sülfat kesiti 37° ve 50°C’de 30 dakika ısıtılması ile ısıya dayanıklı olmayan hemolizinin uzaklaştırılması denenmiştir, fakat olumlu sonuç alınamamıştır. Hemolizin aktivitesi Na₃PO₄ uygulanması ile inaktive edilmiştir, fakat 30 dakika sonra tekrar aktivite kazandığı gözlenmiştir.

Genel olarak, lektinler hidrofilik olan birçok yüzeysel bağlama cebine/kasetine sahiptir, bu nedenle karbonhidratlar ve lektinler arasındaki etkileşim zayıftır. Birçok lektin her biri aynı tip karbonhidrata bağlanan birkaç benzer veya aynı monomerden oluşan oligomerler olarak mevcuttur. Bu şekilde, lektinler çok değerlikli bağlanmaya veya bireysel etkileşimlerin toplamından daha büyük bir görünür bağlanma afinitesi (fonksiyonel afinite) sağlayan birkaç eşzamanlı bağlanma olayının oluşumuna katılabilir. Birçok mantar lektinleri birden fazla şeker ve/veya şeker türevi tarafından aglütinasyonun inhibisyonuna duyarlı oldukları rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2015).

Pleurotus citrinopileatus’ten izole edilen lektinin inulin, maltoz, orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranosid ile orto/para-nitrofenil-β-D-glukopiranozide karşı yüksek affinite gösterdiği (Li ve ark., 2008) ve bu nedenle son yıllarda affinite kromatografik uygulamalarda kullanılmasına yönelik çalışmaların önem kazanan lektin immobilize polimerlerin hazırlanmasında (Dan ve ark., 2016) kullanılabileceği, *Pleurotus tuber-regium* mantarından izole edilen lektinin hemaglutinasyon aktivitesinin N-asetilglukozamin tarafından, *Pleurotus ostreatus* mantarından izole edilen lektinin melibioz, laktoz, D-galaktoz, α-metil-D-galaktopiranozid, N-asetilnöraminik asid, rafinoz ve inulin (Wang ve Ng, 2003) tarafından, *Pleurotus ferulae* mantarından izole edilen lektinin D-glukoz, laktoz, D-galaktoz ve galaktozamin tarafından inhibe edildiği (Xu ve ark., 2014) bildirilmiştir. Bu çalışmada saf olarak elde edilen lektinin hemaglutinasyon aktivitesinin tek şeker (D-galaktoz) ile inhibe edilmesi literatür bulguları ile ileri derecede benzerlik göstermektedir (Hernandez ve ark., 1993; Wang ve ark., 1996; Han ve ark., 2005).

Mantar lektinlerin molekül ağırlıklarının 12-68 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Singh ve ark., 2015). Xu ve ark., (2014) *Pleurotus ferulae* lektinin molekül ağırlığının 35 kDa olduğu ve her birimin molekül ağırlığı 17,5 kDa olan iki

alt biriminden (homodimerik) oluştuğu saptamışlardır. Wang ve ark. (2000), *Pleurotus ostreatus* mantarının taze meyve gövdesinden izole ettikleri lektinin, molekül ağırlıkları 40 kDa ve 41 kDa olan iki farklı alt biriminden oluşan bir heterodimer yapısında olduğunu tespit etmişlerdir. Li ve ark. (2008) tarafından *Pleurotus citrinopileatus* mantarından izole edilen lektinin molekül ağırlığı 32 kDa olan iki özdeş altbirimlerinden (homodimer) oluştuğu rapor edilmiştir.

Tarafımızdan saflaştırılan lektinin molekül ağırlığı, hem doğal, hem de SDS-PAGE’de 43 kDa olarak tespit edilmiştir ve daha önceki çalışmalarda Wang ve Ng (2003) tarafından *Pleurotus tuber-regium*’ten saflaştırılan lektinin molekül ağırlığına yakın bulunmuştur.

Yapılan literatür taramaları sonucunda, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından lektinin antiinflamatuvar etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* mantarından saf olarak elde edilen lektinin, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 sıçan makrofajlarda, TNF- α , PGE2, interlökinler, COX-2 ve iNOS gibi pro-inflamatuvar sitokin ve enzimlerin üretimi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Gram negatif bakterilerin duvarındaki LPS, makrofajlardan TNF- α , IL-1 β , IL-6 proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimini uyatarak çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (Chen ve ark., 2018).

COX veya prostaglandin endoperoksit H sentaz (PGHS) enzimleri, potansiyel terapötik ürünlerin antiinflamatuvar etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Araşidonik asidin prostaglandine dönüştürülmesinde anahtar bir izozim olan COX-2, büyüme faktörleri ve tümör promotörleri gibi çeşitli ajanlar tarafından indüklenebildiği ve çeşitli tümörlerde sıklıkla aşırı eksprese edildiği birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu nedenle, COX-2 inhibitörlerinin radyasyon veya kanser önleyici ilaçlarla kombinasyonunun kanser önleme ve tedavisinde faydalı olduğu görülmüştür (Zhang ve ark., 2002).

LPS veya DAMPs ile TLR4’in etkileşimi, MyD88/IL-1R-ilişkili kinaz (IRAK) fosforilasyonuna ve TNF-reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) aktivasyonuna neden olur. TRAF6 aktivasyonu, ERK, JNK, p38, protein kinaz C ve NF- κ B ilişkili kinazın aktivasyonuna ve COX-2 gibi genlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (Kang ve ark., 2006).

İnflamatuvar hastalıklarda artmış iNOS ekspresyonu sonucunda meydana gelen NO üretiminin artışı, transkripsiyon faktör NF- κ B ekspresyonunu arttırarak inflamatuvar sinyal yollarını uyarabilir ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikleyerek hücre hasarına neden olur. NO'nun süperoksit anyonları ile birleşerek, doku hasarını arttıran oldukça yıkıcı bir radikal olan peroksinitritlere dönüşüp DNA'daki kırıkları arttırarak hücre ölümüne neden olabilir (Trinchieri, 2012).

Mantar lektinlerinin immunomodülatör etkileri ile ilişkilendirilen antitümör etkileri hakkında araştırmalar mevcuttur. Kim ve ark. (2003) *Cordyceps pruinosa*, Jedinak ve ark. (2011) ise *Pleurotus ostreatus* mantar ekstresinin LPS ile uyarılmış RAW264.7 fare makrofaj hücrelerinde TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-12 salgılanmasını ve NO ile PG'in üretimini inhibe ederek inflamatuvar etkisini gösterdiği bildirmişlerdir. Ekstrenin bu etkisi, AP-1 ve NF- κ B proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek ve iNOS ile COX-2 ekspresyonunun aşağı akış regülasyonunu modüle ederek meydana geldiği ileri sürülmüştür.

Agaricus bisporus lektininin (ABL), LPS ile uyarılmış fare peritoneal makrofajları tarafından NO üretimini azalttığı ve mononükleer hücre proliferasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Wistar farelere ağızdan verilen ABL'nin tümör büyümesini baskıladığı ve deneysel otoimmün ensefalomyelitin semptomlarını iyileştirdiğini görülmüştür. ABL-makrofajların etkileşimi, makrofajlara maruz kalan münasip O-glikanlarda T antijeni ve siyalil-T antijeninin terminal kalıntıları yoluyla gerçekleştiği ve bu etkileşim, Akt sinyal yolunu değiştirebileceği ileri sürülmüştür. ABL bağlanması, Akt fosforilasyonunu bloke ederek NO üretiminin ve makrofajlar tarafından sitokin üretiminin inhibisyonuna neden olduğunu sonucuna varılmıştır (Ditamo ve ark., 2016).

Ayrıca NO, proinflamatuvar olduğu bilinen araşidonik asit kaskadını aktive eden COX-2'i aktive ederek enflamatuvar süreçlere de katılır. Non-steroid antienflamatuvar (NSAI) ilaçların ortak özellikleri COX-1 ve COX-2 enzimlerini bloke ederek araşidonik asidin inflamatuvar mediatörlere dönüşmesini engellemeleridir. COX-1 fizyolojik süreçlerde rol alarak sürekli şekilde eksprese edilirken, COX-2 ekspresyonunun pek çok premalign dokuda ve malign tümörlerde sıklıkla arttığı gösterilmiştir ve COX-2 inhibitörleri ilgili kanser tedavi protokollerine alınmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, PEFL'in, COX-2 inhibisyonu yoluyla proinflamatuvar

PG'lerin üretimini düşürüp anti-inflamatuar etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini azaltarak ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 arttırarak inflamasyondan koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir.

Mantarlar, yüzyıllar boyunca yiyecek olarak tüketildiği gibi birçok hastalığın tedavisi amacıyla ilaç olarak da kullanılmıştır. Mantarlar, bağışıklığı arttıran, kanser riskini azaltan, tümör hücrelerin çoğalmasını engelleyen, sinir sistemini koruyan polisakkaritler, proteinler ve birçok biyoaktiviteye sahip diğer fonksiyonel bileşenler bakımından zengin ve tüm yaş grupları tarafından tüketilebilen sağlıklı gıda olarak kabul edilebilir. Genel olarak, mantarların yararlı etkilerinin yelpazesi heterojen olduğu ve nutrigenomik ve moleküler beslenmedeki mevcut bilgiler ve ileri araştırmalar göz önünde bulundurularak mantarların günlük olarak kabul edilebilir en iyi nutrasötik gıdalardan biri olarak tüketilebileceği ileri sürülmektedir (Ma ve ark. 2018).

Sonuç

Bu çalışma, *PEFL*'in anti-inflamatuar etkilerini inceleyen ilk deneysel çalışma olma niteliğindedir.

PEFL'in, COX-2 ve iNOS supresyonu ile proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasını azaltarak inflamatuvar sürecinin regülasyonunda rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca, anti-inflamatuar ve immünmodülatör etkileri nedeniyle, çeşitli kanser ve inflamatuvar hastalıklar için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde potansiyel bir tedavi edici ajan olarak düşünülebilmektedir.

KAYNAKLAR

Akev, N. ve Can, A. (1999). Separation and some properties of *Aloe vera* L. leaf pulp lectins. *Phytotherapy Research*, 13, 489-493.

Akev, N., Candoken, E., Kuruca, S.E. (2020a). Evaluation of *Aloe evra* leaf extracts and Aloe emodin on several cancer lines. *Farmacia*, 68 (6), 1155-1165.

Akev, N., Candoken, E., Kuruca, S.E. (2020b). Comparative study on the anticancer drug potential of a lectin purified from *Aloe vera* and Aloe emodin. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 21, 99-106.

Akev, N., Malkoç, S., Can, A. (2002-2003). Further characterization of *Aloe vera* leaf pulp lectins. *Istanbul Journal Faculty of Pharmacy*, 35-36 (1), 1-11

Akev, N., Turkay, G., Can, A., Gurel, A., Yildiz, F., Yardibi, H., Ekiz, E.E. Uzun, H. (2007). Tumour preventive effect of *Aloe vera* leaf pulp lectin (Aloctin I) on *Ehrlich ascites* tumours in mice. *Phytotherapy Research*, 21, 1070-1075.

Akyüz, M. ve Kırbağ, S. Ülkemizde sebze ve meyvelerin yanısıra alternatif besin kaynağı: yabani mantar (*Pleurotus eryngii* var. *ferulae*). *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 8 (1), 26-36 (2007).

Alam, N., Yoon, K.N., Lee, J.S., Cho, H.L., Lee, T.S. (2012). Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 111-118.

Anjana, S. ve Savita, J. (2017). Oyster mushroom: answer to human ailments. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10 (4), 24-27

Anonymous (2006). The use of mushroom preparations in malignancies. *Thomas Jefferson University Hospital*.

Bayuk, B.G., Gezer, K., Kaygusuz, O. (2016). Mushrooms exported from Denizli province and nutrient content. *International Journal of Secondary Metabolite*, 3 (1), 27-38.

Bernheimer, A.W. ve Avigad, L.S. (1979). A cytolytic protein from the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 585, 451-461.

Bies, C., Lehr, C. M., & Woodley, J. F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (4), 425-435.

Cabadak, H. (2008). Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 51-61.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9 (6), 7204.

Cheung, N.K., Modak, S., Vickers, A., Knuckles, B. (2002). Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 51(10), 557-564.

Cheung, W.M., Hui, W.S., Chu, P.W., Chiu, S.W., Ip, N.Y. (2000). Ganoderma extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *FEBS Letters*, 486, 291-296.

Choi, D. B., Cha, W. S., Kang, S. H. & Lee, B. R. (2004). Effect of *Pleurotus ferulae* extracts on viability of human lung cancer and cervical cancer cell lines. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 356-361.

Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, S., & Kim, S. J. (2017). In vitro antioxidant and in vivo hypolipidemic effects of the king oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* DDL01 (Agaricomycetes), in rats with high-fat diet-induced fatty liver and hyperlipidemia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(2), 107-119.

Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. (2000). p53-Independent induction of p21waf1/cip1, reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91, 164-173.

Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S. (2017). Lectins, interconnecting proteins with

biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1594074, 1-22.

Corte-Real, S., Fonseca, L., Goncalves, J. (2008). KSHV latency in transformed B-cells: The role of LANA1 as a therapeutic target. *Virology: Research and Treatment*, 1, 43-48.

Dan, X., Liu, W., Ng, T.B. (2016). Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. *Medicinal Research Reviews*, 36 (2), 221-247.

Ditamo, Y., Rupil, L.L., Sendra, V.G., Nores, G.A., Roth, G.A., Irazoqui, F.J. (2016). In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Food and Function*, 7, 262-269.

Duque, G.A. ve Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokins: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 491,1-12.

Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113, 236-247.

Goldstein, I.J. ve Winter, H.C. (2007). Mushroom lectins. In: Kamerling J, Boons G-J, Lee Y, Suzuki A, Taniguchi N, Voragen AGJ, eds., *Comprehensive Glycoscience* (Vol. 3). UK: Elsevier.

Guillot, J. ve Konska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 203-230.

Hagel, L. (2001). Gel-filtration chromatography. *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit-10. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1009s44>

Han, C. H., Liu, Q. H., Ng, T. B., & Wang, H. X. (2005). A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336 (1), 252-257.

Han, E. H., Hwang, Y. P., Kim, H. G., Choi, J. H., Im, J. H., Yang, J. H., Lee, H.-U., Chun, S.-S., Chung, Y.C., Jeong, H. G. (2011). Inhibitory effect of *Pleurotus*

eryngii extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (6), 1416-1425.

Hasan, M.A.A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T.W., Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: Specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 7802-7838.

Hernandez, E., Ortiz, R., Lopez, F., Masso, F., Montano, L.F., Martinage, A., Zenteno, E. (1993). Purification and characterization of galactose-specific lectin from *Psilocybe barrerae*. *Phytochemistry*, 32 (5), 1209-1211.

Ho, J. C., Sze, S. C., Shen, W., & Liu, W. (2004). Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1671 (1-3), 9-17.

Hong, K. H., Kim, B. Y. & Kim, H. K. (2004). Studies on the biological activity of *Pleurotus ferulea*. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 33, 791-796.

Hsu, H.C., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L., Lin, J.Y. (1997). Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochemical Journal*, 323, 557-565.

Hu, S. H., Lien, J. L., Hsieh, S. L., Wang, J. C., & Chang, S. J. (2009). Antioxidant and antigenotoxicity activities of extracts from liquid submerged culture of culinary-medicinal ferula oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* (DC.) Quel. var. *ferulae* (Lanzi) Sacc.(Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(4), 395-408.

Iwalokun, B.A., Usen, U.A., Otunba, A.A., Olukoya, D.K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 16, 1732-1739.

Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008). *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interaction*, 176, 108-120.

Jedinak, A. ve Sliva, D. (2008). *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *International Journal of Oncology*, 33, 307-313.

Jedinak, A., Dudhgaonkar, S., Wu, Q-L., Simon, J. Sliva, D. (2011). Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-kB and AP-1 signaling. *Nutrition Journal*, 10: 52-62.

Jo, K.-J., Ghim, J., Kim, J., Lee, H., Lee, T. G., Kim, J.-I., Kim, Y., Byun, J.W., Min, B.S., Son, J.S., Shim, S.G., Cheon, W.J., Ryu, S.H. (2019). Water extract of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* prevents high-fat diet-induced obesity by inhibiting pancreatic lipase. *Journal of Medicinal Food*, 22 (2), 178-185.

Jose, N., Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. (2004). Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytotherapy Research*, 18 (1), 43-46.

Jung, E. C., Kim, K. D., Bae, C. H., Kim, J. C., Kim, D. K., & Kim, H. H. (2007). A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770 (5), 833-838.

Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in Enzymology*, 463, 349-371.

Justiz Vaillant AA, Qurie A. Interleukin. 2020 Aug 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 29763015.

Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (2), 209-218.

Kang, Y.-J., Wingerd, B.A., Arakawa, T. Smith, W.L. (2006). Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *The Journal of Immunology*, 177, 8111-8122.

Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A. and Chiba, S. (1990). Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034, 247-252.

Khan, M.A. ve Tania, M. (2012). Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus* mushroom: An overview. *Food Reviews International*, 28 (3), 313-329.

Kim, K.M., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Yun, Y.G., Pae, H.O., Han, J.A., Ha, K.S., Kim, T.W., Kim, Y.M. (2003). Methanol extract of *Cordyceps purinse* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF-kappa B activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190, 1-8.

Kim, M., Rao, M. V., Tweardy, D. J., Prakash, M., Galili, U., and Gorelik, E. (1993). Lectin-induced apoptosis of tumour cells. *Glycobiology*, 3, 447-453.

Ko, J.L., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L., Lin, J.Y. (1995). A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *European Journal of Biochemistry*, 228, 244-249.

Kobayashi, Y., Tateno, H., Dohra, H., Moriwaki, K., Miyoshi, E., Hirabayashi, J., Kawagishi, H. (2012). A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 33973-33982.

Koyama, Y., Katsuno, Y., Miyoshi, N., Hayakawa, S., Mita, T., Muto, H., Isemura, S., Aoyagi, Y., Isemura, M. (2002). Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 784-789.

Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., Aggarwal B.B. (2004). Nuclear factor-kappa B: its role in health and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 82, 434-448.

Kundakçı, A ve Pirat, A. (2012). Toll-Like Receptors. *Journal of the Turkish Society of Intensive Care*, 10, 63-73.

Kuruca, S.E., Çandöken, E., Akev, N. (2019). Investigation of aloe-emodin and Aloe vera gel extract on apoptosis dependent pathways in leukemia and lymphoma cell lines. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 50 (1), 42-48.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (Londra)*, 227, 680-685.

Lee, I. S., Ryoo, I. J., Kwon, K. Y., Ahn, J. S., & Yoo, I. D. (2011). Pleurone, a novel human neutrophil elastase inhibitor from the fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*. *The Journal of Antibiotics*, 64 (8), 587-589.

Li, Y. R., Liu, Q. H., Wang, H. X. and Ng, T. B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780 (1), 51-57.

Li, Y., Zhang, G., Ng, T. B., & Wang, H. (2010). A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010 (6), 716515.

Liener, I. E. ve Hill, E.G. (1952). The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *Journal of Nutrition*, 49, 609-620.

Lin, J. Y. ve Chou, T. B. (1984). Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *Journal of Biochemistry* (Tokyo), 96, 35-40.

Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W-D. (2005). *The Pharmacological Potential of Mushrooms*. *eCAM*, 2 (3), 285-299.

Lis, H. ve Sharon, N. (1972). Soybean (*Glycine max*) agglutinin. *Methods Enzymology, Part B*, 28, 366-368.

Lis, H. ve Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *The Annual Review of Biochemistry*, 55, 35-67.

Liu, Y. K. ve Shen, W. (2003). Inhibitive effect of *Cordyceps sinensis* on experimental Hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World Journal of Gastroenterology*, 9, (3), 529-533.

Lull, C., Wichers, H.J., Savelkoul, H.F.J. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 63-80.

Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D., Hu, Q. (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7: 125-133.

Mariga, A. M., Pei, F., Yang, W. J., Zhao, L. Y., Shao, Y. N., Mugambi, D. K., & Hu, Q. H. (2014). Immunopotential of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *Journal of Ethnopharmacology*, 153 (3), 604-614.

Matricon, J., Barnich, N., Ardid, D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonsense*, 1 (4), 299-309.

Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11, 7-21.

Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S., Ikeda, M. (2008). Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutrition Research*, 28, 35-342.

Motta, F., Gershwin, M. E., & Selmi, C. (2021). Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*, 117, 102576.

Mustafa, N.W., Al-Saeedi, S.S., Idham AA. (2015). Antimicrobial activity of mycelia of Oyster mushroom species (*Pleurotus spp.*) and their liquid filterates (*In vitro*). *Journal of Medical and Bioengineering*, 4 (5), 376-380.

Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., Gdula-Argasińska, J. (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 243, 373-381.

Nanba, H. ve K. Kubo (1997). Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention. *Annals of New York Academic Sciences*, 833, 204-207.

Ngai, P. H. K. ve Ng, T. B. (2004). A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314 (4), 988-993.

Ngai, P. H. ve Ng, T. B. (2006). A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 72 (6), 1185-1191.

Nozaki, H., Itonori, S., Sugita, M., Nakamura, K., Ohba, K., Suzuki, A., Kushi, Y. (2008). Mushroom acidic glycosphingolipid induction of cytokine secretion from murine T cells and proliferation of NK1.1 alpha/beta TCR-double positive. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373 (3), 435-439.

Okuda, K. L. (2007). Nature's powerful immune support from the Brazilian rainforests. *Nutrition Professional's Journal Volume*, 7, 14-17.

Özsoy, N., Candoken, E., Akev, N. Purification and antioxidant activity of *Aloe vera* leaf lectin. *Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 42, 1-11 (2012).

Öztürk, A. ve Çopur, Ö.U. (2009). Mantar bileşenlerinin terapötik etkileri. *Bahçe*, 38 (1), 19-24.

Patel, Y., Naraian, R., & Singh, V. K. (2012). Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): A review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3 (1), 1-12.

Perduca, M., Destefanis, L., Bovi, M., Galliano, M., Munari, F., Assfalg, M., Ferrari, F., Monako, H.L., Capaldi, S. (2020). Structure and properties of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) lectin (POL). *Glycobiology*, 30 (8), 550-562.

Pohleven, J., Obermajer, N., Sabotič, J., Anžlovar, S., Sepčić, K., Kos, J., Kralj, B., Štrukelj, B., Brzin, J. (2009). Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (3), 173-181.

Prescott, J.A., Mitchell, J.P., Cook, S.J. (2021). Inhibitory feedback control of NF-κB signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 478, 2619-2664.

Rouf, R., Stephens, A.S., Spaan, L., Arndt, N.X., Day, C.J., May, T.W., Tiralongo, E., Tiralongo, J. (2014). G(2)/M cell cycle arrest by an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from *Psathyrella asperospora*. *Glycoconjugate Journal*, 31, 61-70.

Santos, A.F.S., da Silva, M.D.C., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Correia, S., Coelho, L.C.B.B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 15, 41-62.

Seo, D.J. ve Choi, C. (2021). Antiviral bioactive compounds of mushrooms and their antiviral mechanisms: A review. *Viruses*, 13 (2), 350-362.

Seyrek, K. ve Bildik, A. (2001). Lektinler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12 (1-2), 96-100.

Sharon, N. (2007). Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (5), 2753-2764.

Sharon, N. ve Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.

She, Q.-B., Ng, T.-B. and Liu, W.-K. (1998). A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247 (1), 106-111.

Shibata, T., Kudou, M., Hoshi, Y., Kudo, A., Nanashima, N., Miyairi, K. (2010). Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylsin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon*, 56 (8), 1436-1442.

Singh, R. S., Bhari, R., & Kaur, H. P. (2010). Mushroom lectins: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (2), 99-126.

Singh, S.S., Wang, H., Chan, Y.S., Pan, W., Dan, X., Yin, C.M., Akkouch, O., Ng, T.B. (2015). Lectins from edible mushrooms. *Molecules*, 20, 446-469.

Sliva, D., Labarrere, C., Slivova, V., Sedlak, M., Lloyd, F.P. Jr, Ho, N.W. (2002). *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 298 (4), 603-612.

Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Carbonero, E.R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Santos, A.R.S., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. (2008). Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked beta-glucan

isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, 597, 86-91.

Sri, S., Dhand, C., Rathee, J., Ramakrishna, S., & Solanki, P. R. (2019). Microfluidic based biosensors as point of care devices for infectious diseases management. *Sensor Letters*, 17 (1), 4-16.

Sun, Y., Hu, X., & Li, W. (2017). Antioxidant, antitumor and immunostimulatory activities of the polypeptide from *Pleurotus eryngii* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 323-330.

Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annual review of immunology*, 30, 677-706.

Tsaneva, M. ve Van Damme, E.J.M. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate Journal*, 37, 533-551.

Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 376387.

Wang, H, ve Ng, T.B. (2004). Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25 (1), 1-5.

Wang, H. ve Ng, T.B. (2000). Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immune deficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 587-593.

Wang, H. Ve Ng, T.B. (2003). Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Protein Expression and Purification*, 29, 156-160.

Wang, H. X., Liu, W. K., Ng, T. B., Ooi, V.E.C. and Chang, S.T. (1996). The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*, *Immunopharmacology*, 31, (2-3), 205-211.

Wang, H. X., Ng, T. B., Ooi, V. E. C., Liu, W. K. and Chang, S. T. (1997). Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages,

splenocytes and life-span in sarcoma-bearing mice. *Anticancer Research*, 17, 419-424.

Wang, H., Ng, T.B. and Ooi, V.E.C. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102 (8), 897-906.

Wolff, E.R., Wisbeck, E., Silveira, M.L., Gern, R.M., Pinho, M.S., Furlan, S.A. (2008). Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151 (2-3), 402-412.

Xi M, Gerriets V. Prostaglandin E2 (Dinoprostone). 2020 Jun 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 31424863.

Xu, C.-J., Wang, Y.-X., Niu, B.-N., Liu, B., Li, Y.-B., Wang, X.-M., Lu, S.-L. (2014). Isolation and characterization of a novel lectin with mitogenic activity from *Pleurotus ferulae*, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27 (4), 983-989.

Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. (2000). Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Research*, 14 (8) 647-649.

Yu, L. G., Fernig, D. G., White, M. R., Spiller, D. G., Appleton, P., Evans, R. C., Grierson, I., Smith, J. A., Davies, H., Gerasimenko, O. V., Petersersen, O.H., Milton, J.D., Rhodes, J.M. (1999) Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 4890-4899.

Yu, L. G., Fernig, D. J., Smith, J. A., Milton, J. D. and Rhodes, J. M. (1993). Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Research*, 53, 4627-4632.

Yuan, B., Ma, Ning, Zhao, L., Zhao, E., Gao, Z., Wang, W., Song, M., Zhang, G., Hu, Q., Xiao, H. (2017b). In vitro and in vivo inhibitory effects of a *Pleurotus eryngii* protein on colon cancer cells. *Food and Function*, 8, 3553-3562.

Yuan, B., Zhao, L., Rakariyatham, K., Han, Y., Gao, Z., Kimatu, B.M., Hu, Q., Xiao, H. (2017a). Isolation of a novel bioactive protein from an edible mushroom *Pleurotus eryngii* and its inflammatory potential. *Food and Function*, 8, 2175-2183.

Zaidman, Ben-Zion, Majed Yassin. Jamal Mahajna. Solomon P. Wasser. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 453-468.

Zhang, G. Q., Sun, J., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2009). A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(3).

Zhang, G.-Q., Chen, Q.-J., Hua, J., Liu, Z.-L., Sun, Y., Xu, X., Han, P., Wang, H.-X. (2019). An inulin-specific lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antiproliferative, and mitogenic activities from the edible mushroom *Agaricus bitorquis*. *BioMed Research International*, 1341370, 1-9.

Zhang, Y., Mills, G.L., Nair, M.G. (2002). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7581-7585.

Zhao, C., Sun, H., Tong, X., Qi, Y. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*, 374 (2), 321-327.

Zheng SY, Li CX, Ng TB and Wang HX (2007). A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochemistry*, 42(12): 1620-1624.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PLEUROTUS ERYNGİİ VAR. FERULAE MANTARINDAN LEKTİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 15	% 8	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	www.jceionline.org İnternet Kaynağı	% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

www.ncbi.nlm.nih.gov

ÖZGEÇMİŞ

