



Geliş(Received) :03/02/2018
Kabul(Accepted) :30/03/2018

Araştırma Makalesi
DOI:10.30708/mantar.390809

CCl₄ İle Oksidatif Stres Oluşturulan Sıçanlarda *Pholiota aurivella* Liyofilize Ekstrenin Bazı Biyokimyasal ve Hematolojik Parametrelere Etkisi

Abdulahad DOĞAN^{1*}

* Sorumlu yazar:abdulahadogan@yyu.edu.tr

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Eczacılık Temel Bilimler Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, Türkiye

Öz: Mantarlar, organizmaları bazı zararlı bileşiklerin toksik etkilerinden korumak için önemli işlev görürler. Bu çalışmada, karbon tetraklorür (CCl₄) ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *P.aurivella* liyofilize ekstrenin kan parametreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ratlar, toksisite testi sonrası dört deney grubuna ayrıldı; Kontrol, CCl₄, CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg ekstre) ve CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg ekstre) grupları. 4 haftalık muamele sonunda, CCl₄'ün oksidatif stresine karşı *P.aurivella* ekstraktının oral alımının hematolojik parametrelere, eritrosit fragilitesine ve sıçanların eritrositlerinde antioksidan savunma unsurlarından redukte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) içeriği tespit edilerek değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, CCl₄ ve CCl₄+*P.aurivella* ekstresi uygulanan gruplarda GSH düzeyi Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterdi. Diğer yandan, CCl₄ grubundaki GPx aktivitesi Kontrol ve CCl₄+*P.aurivella* gruplarına göre önemli düşüş gösterdi. Ayrıca, CCl₄ ve CCl₄+*P.aurivella* gruplarında eritrosit fragilitesi (özellikle % 0.6 NaCl konsantrasyonunda) Kontrol grubuna göre önemli artış gözlemlendi. CCl₄ grubunda RBC, HGB, HCT, WBC, PLT and PCT gibi bazı hematolojik parametrelerde önemli azalma gösterirken RDWs de ise önemli artma belirlendi. Bakılan parametreler üzerinde CCl₄'ün zararlı etkileri olmasına rağmen bunu *P.aurivella* için söylemek zordur. Fakat, *P.aurivella* eritrosit hemolizine katkı sunduğu için zararlı olabilir. Bu yüzden insanların bu mantarı tüketiminde dikkatli davranması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: CCl₄, *Pholiota aurivella*, antioksidan enzimler, hematolojik parametreler, eritrosit fragilite, sıçan.

Effect of *Pholiota aurivella* Lyophilized Extract On Some Biochemical and Hematological Parameters Against CCl₄-Induced Oxidative Stress In Rats

Abstract: Mushrooms play an important function to protect organisms from the toxic effects of some harmful compounds. In this study, it was aimed to evaluate the effects of *Pholiota aurivella* lyophilized extract on blood parameters against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced oxidative stress in rats. After the toxicity test, rats were divided into four experimental groups: Control, CCl₄, CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg, extract) and CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg, extract) groups. At the end of 4 weeks experiment, the roles of the orally administrated *P.aurivella* extract oral administration against CCl₄-induced oxidative stress were evaluated by measuring hematological parameters, erythrocyte fragility, antioxidant defence system such as reducte glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) activities and malondialdehyde



(MDA) content in erythrocyte of rats. According to the results, CCl_4 and $CCl_4+P.aurivella$ groups caused significantly decrease in GSH level according to Control group. On the other hand, in CCl_4 group GPx enzyme activity significantly decreased according to Control and $CCl_4+P.aurivella$ groups. Also, erythrocyte fragility (especially 0.6 % NaCl concentration) significantly increased in the CCl_4 and $CCl_4+P.aurivella$ groups according to Control group. Significant decrease in some hematological parameters (RBC, HGB, HCT, WBC, PLT and PCT) and markedly increase in RDWs were observed in CCl_4 group. Although CCl_4 had clear harmful effects on the parameters examined, it was difficult to say this for *P.aurivella*. However, *P.aurivella* might be harmful because of its contribution to the hemolysis of erythrocytes. Therefore, people should be careful consumption of this mushroom.

Key words: CCl_4 , *Pholiota aurivella*, antioxidant enzymes, hematological parameters, erythrocyte fragility, rat.

Giriş

Dünyada hızla artan nüfus insanları yeni besin kaynaklarına yönlendirmiştir. Ancak bu besin kaynakların varlığı kadar kalitesi ve insan sağlığı üzerindeki etkileri de bir o kadar önemlidir. Günümüzde koruyucu tıp ve gıda endüstrileri başta olmak üzere, yiyeceklerde kısıtlı oranda bulunan sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanlara yoğun bir ilgi oluşmuştur (Sanchez, 2017). Bu doğal kaynaklardan biri olan mantarlar içermiş oldukları riboflavin, B vitaminleri, selenyum, bakır, potasyum, diyet lifi, kitin, b-glukanlar, steroller, alkaloidler, laktonlar, terpeneler, seramitler, D2 vitamini, fenolik bileşikler ve kükürt içeren amino asit (ergotiyonin) yapıları sayesinde güçlü antioksidan etkiye sahip gıdalardır (Regula ve Siwulski, 2007; Kalaras ve ark., 2012; Roupas ve ark., 2012; Feeney ve ark., 2014). Antioksidan etkileri nedeniyle, serbest radikallerden hidroksil radikali (OH \cdot) ve süperoksit radikali (O $_2^{\cdot-}$) veya süperoksit kaynaklarından hidrojen peroksit'i (H $_2$ O $_2$) ortadan kaldırma ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek hücre membranlarını koruma potansiyeline sahiptirler. Mantarların antiinflamatuvar, anti-tümör, antibakteriyel, antioksidan, antiviral, antialerjik, antiaterojenik, hipoglisemik, immünomodülatör ve çeşitli hematolojik parametreler üzerinde olumlu etkileri vardır (Chen ve ark., 2009; Guillamón ve ark., 2010). Ancak genel anlamda koruyucu etkileri bilinen mantarların istenmeyen ve ölümlü sonuçlanabilen ciddi toksik etkileride bulunmaktadır. *Agrocybe cylindracea* veya *Agrocybe aegerita* olarak bilinen ve halk arasında yenilebilir olarak geçen mantarın deney hayvanlarında ciddi karaciğer toksisitesine sebep olduğu bildirilmiştir (Jin ve ark., 2014). Araştırmacılar aynı çalışmada,

Volvariella volvacea, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus* and *Lyophyllum shimeji* mantarları veya bunlardan elde edilen bazı maddelerin nörotoksik, kardiyovasküler hastalıklar, embriyo gelişiminin durması, hiperkalemi ve miyokardiyal iskemi gibi hastalıklara sebep olduğunu bildirmiştir.

Pholiota aurivella (Batsch) P. Kumm. mantarı yaz sonu ve sonbahar aylarında *Fagus*, *Fraxinus*, *Salix* ve *Alnus* sp. gibi canlı ağaçların gövdeleri üzerinde ve genellikle kümeler halinde yetişen bir mantar türüdür. Baharatımsı bir kokusu ve sütümsü bir tadı olan bu mantar hem yenilebilir hem de yenilmez olarak rapor edilmiştir (Solak ve Gücin, 1992; Breitenbach ve ark., 1995). Türkiye'de Yukarı Sakarya Bölümü; Erzurum-Kars Bölümü, Yukarı Murat-Van Bölümü; Adana Bölümü; Orta Fırat Bölümü olmak üzere; Çin, Japonya, Uzak Doğu, Rusya, Avrupa, Kuzey Amerika, Fas gibi dünyanın pek çok ülkesinde bulunan bir mantar türüdür (Imazeki ve Hongo, 1987).

Bu çalışmada, CCl_4 ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *P.aurivella* mantarından elde edilen liyofilize ekstrenin 100 ve 500 mg/kg dozlarında oral yolla verilerek eritrositlerde çeşitli antioksidan savunma sistemi enzim düzeylerine, lipid peroksidasyona, eritrosit frajilitesine ve çeşitli hematolojik parametrelere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Sıçan (rat)

Çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 2-6 aylık, 200-350 gr ağırlığındaki 24 adet erkek sıçan (*Wistar albino*) kullanıldı. Sıçanlar 25 ± 1 °C oda sıcaklığında 12 saat



aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda standart plastik kaplarda *ad libitum* olarak beslenmeleri sağlandı. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı.

Mantar

Çalışmamda kullanılan *Pholiota aurivella* (Batsch) P. Kumm mantarı Salix ağacı üzerinden Van'nın Gürpınar ilçe merkezinde, Ekim 2016'da Cemil Sadullahoğlu ve Prof. Dr. Yusuf Uzun tarafından 38° 19'534"K, 43°23'867"D, koordinatlarından toplanmıştır. Prof. Dr. Kenan Demirel tarafından teşhis edilen mantar örnekleri (Numune no: 7488) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikoloji Araştırma Laboratuvarında (VANF) saklanmaktadır.

Kimyasallar

Karbon Tetraklorür (CCl₄), Süperoksit dismutaz (SOD) enzim kiti (Ransod, SD125), Glutasyon peroksidad (GSH-Px) enzim kiti (Ransel, RS504), Redükte glutasyon (GSH), Okside glutasyon (GSSG), Bütilenmiş hidroksitolüen (BHT), Tiyobarbitürik asit (TBA), 1.1.3.3.tetraethoksiopropan (MDA), 5-5'-Ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), Hidroksi metil amino metan (Tris), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum sülfat (Na₂SO₄), Beta Nikotinamid Adeninükleotit fosfat (NADPH), Metafosforik asit (HPO₃), Triklor asetik asit (TCA), Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇), Sulfosalisilik asit (SSA), disodyum karbonat (Na₂CO₃), Etanol, Ketamin (% 10 luk).

Ekstraksiyonun hazırlanması

Öğütülmüş mantar numunesinden 100 gr tartılarak, bir cam behere konuldu ve 1 lt (% 80 etanol + % 20 saf su) ile ekstre edilerek, beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı. +22 °C'de, 2 saat süreyle çalkalayıcıda homojenize edilen karışım, daha sonra santrifüj cihazına yerleştirildi. Homojenize karışım 20 dk. boyunca (15320 g) +4 °C'de (Sorvall RC-5B; DuPont, Wilmington, DE, USA; rotor Beckman JA14 (137 mm) seri No. 02U8152, USA) santrifüj edildi. Supernatanttan arta kalan çökelti etanol kullanılarak aynı ekstraksiyon işlemleri tekrarlandı. Elde edilen supernatant +40 °C'de

evaporatör yardımıyla çözücülerden arındırıldı. Elde edilen yoğunlaştırılmış fraksiyonlar, -85 °C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında kuruyana kadar bekletildi. Elde edilen *Pholiota aurivella* liyofilize ekstraktları -20 °C'de saklandı.

Toksisite testi ve deney uygulaması

Deneye başlamadan önce kullanılan mantarların olası toksik etkilerinin belirlenmesi için *P.aurivella* mantar türü için 3 adet sıçan toksisite testinde kullanıldı. 3 adet hayvana *P.aurivella* mantar ekstresi düşük dozdan yüksek doza doğru (20, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 mg/kg) gavaj ile verilerek (OECD, 2001) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48 ve 72 saat sonra ki muhtemel klinik ve toksikolojik semptomları gözlemlendi. Toksisite testi sonrası uygulanacak dozlar belirlendi. 24 adet sıçan aşağıdaki gibi her grupta 6 sıçan olacak şekilde gruplandırıldı.

Kontrol grubu (n=6): Normal sıçan yemi ve musluk suyu,

CCl₄ grubu (n=6): [0.5 mL CCl₄+0.5 mL zetin yağı= 1 mL/kg/haftada 2 kez (intraperitoneal, *i.p*) (Suzek ve ark., 2016).

CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg, ekstre) grubu (n=6): 100 mg/kg *P.aurivella* ekstresi gavaj ile günde birkez 4 hafta boyunca verildi ve ayrıca (0.5 mL CCl₄+0.5 mL zetin yağı=1 mL/kg/haftada 2 kez, *i.p* uygulaması yapıldı.

CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg, ekstre) grubu (n=6): 500 mg/kg *P.aurivella* ekstresi gavaj ile günde bir kez 4 hafta boyunca verildi ve ayrıca (0.5 mL CCl₄+0.5 mL zetin yağı=1 mL/kg/haftada 2 kez, *i.p* uygulaması yapıldı. Ayrıca tüm gruplarda yem ve su tüketimi *ad libitum* olarak sağlandı.

Kan örneklerinin alınması ve eritrosit paketinin hazırlanması

Deney sonunda sıçanlar % 10'luk ketamin ile anesteziye tabi tutularak enjektörler yardımıyla kalplerinden kan alındı. Kanlar EDTA'lı tüplere alındı. Bu kandan eritrosit paketi, eritrosit frajilitesi ve hematolojik parametreler çalışıldı. EDTA'lı cam tüplere alınan kandan 1mL alınarak 3000 rpm'de +4 °C'de soğutmalı santrifüjde 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan plazma atıldı. Altta kalan hacme eşit oranda soğuk serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin yıkanma işlemi gerçekleştirildi. Serum fizyolojik eklenen tüpler 2000 rpm'de +4 °C'de 8 dakika santrifüj edildi. Her



seferinde yukardaki işlem tekrarlanarak eritrosit yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. En sonunda elde edilen eritrosit paketi (-80°C) difirize konularak muhafaza edildi. Eritrositteki malondialdehit (MDA) içerikleri ve redükte glutasyon (GSH) seviyeleri tayinleri aynı gün gerçekleştirilirken, süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GST), glutasyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri hazırlanan eritrosit paketinde çalışıldı.

Biyokimyasal analizler

Eritrositteki lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) içeriği, indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyesi, glutasyon s-transferaz (GST), glutasyon redüktaz (GR), glutasyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerine bakıldı (Dogan ve ark., 2015).

Eritrosit fragilitesi

EDTA'lı kan numuneleri oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildi. pH 7.4'te fosfat tamponu ile % 0.9 NaCl stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra stok solüsyondan % 0.9 NaCl'dan % 0.1'den % 0.9'e değişen farklı konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan farklı konsantrasyondan 5 mL alınarak ayrı tüplere konuldu devamında inkübasyona bırakılan kandan 30 uL alınarak bu tüplere boşaltıldı. Tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, 3000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Tüplerdeki süpernatantlar 540 nm'de spektrofotometrik olarak okundu (Singh ve ark., 2016).

Hematolojik parametrelerin okunması

Deney sonunda EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri hematolojik analizatör cihazında (Coulter LH 780 Analyzer, ABD) okunmak üzere Eritrosit (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HCT), Ortalama eritrosit hacmi (MCV), Eritrositteki ortalama hemoglobin miktarı (MCH), Eritrositteki ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), Eritrosit dağılım genişliği (RDW), Beyaz kan hücresi=Lokosit (WBC), Trombosit sayısı (PLT), Trombositcrit (PCT) ve Trombosit dağılım genişliği (PDW) parametrelerine bakıldı.

İstatistik analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizinde Minitab 14 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi

(ANOVA) kullanıldı. Gruplar birbiriyle karşılaştırıldıktan sonra, gruplar arasındaki farklılıklar Tukey ikili karşılaştırma testinden yararlanılarak yapılmıştır.

Bulgular

P. aurivella liyofilize ekstrenin MDA ve GSH düzeylerine etkisi

Şekil 1'de görüldüğü gibi, MDA içeriği gruplar arası kıyaslamada istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmazken, GSH düzeyi ise CCl₄, CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg) ve CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg) gruplarda Kontrol grubuna göre önemli azalma gösterdi.

P.aurivella liyofilize ekstrenin antioksidan enzim aktivitelerine etkisi

Tablo 1'de görüldüğü gibi GST, GR, GPX, CAT ve SOD enzim aktivitelerine bakıldı. Bu parametrelerden GPx aktivitesi CCl₄ grubunda hem Kontrol hem de CCl₄+*P.aurivella* (100 ve 500 mg/kg) gruplarına göre önemli azalma gösterdi. Diğer antioksidan enzim aktivitelerinde ise belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi.

P.aurivella liyofilize ekstrenin eritrosit fragilitesine etkisi

Şekil 2'de görüldüğü gibi eritrosit membranının NaCl'un farklı konsantrasyonlardaki hemoliz olma durumunu göstermektedir. Hemoliz olayının % 0.6 NaCl konsantrasyonundan başlayarak % 0.1 NaCl ise hemoliz olayının % 100'e yakın gerçekleştiğini göstermektedir. Özellikle % 0.6 konsantrasyonundaki hemoliz olayında CCl₄ ve CCl₄+*P.aurivella* (100 ve 500 mg/kg) gruplarının Kontrol grubuna göre önemli artış gösterdiği görülmektedir.

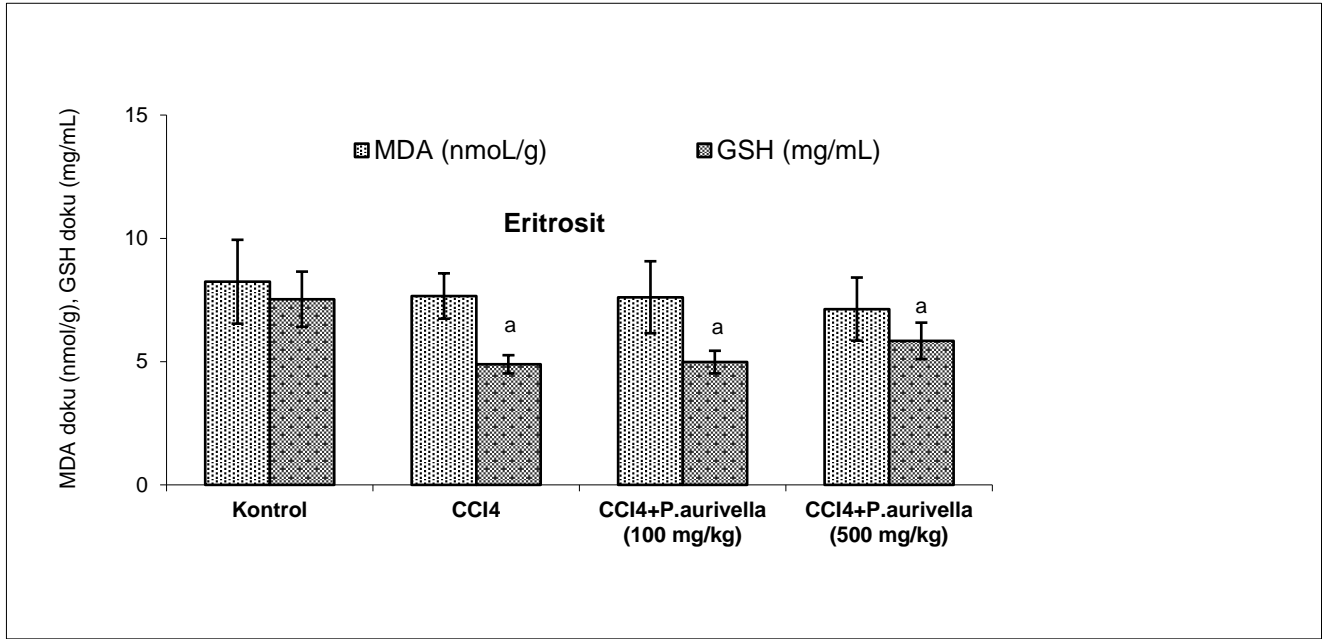
P.aurivella liyofilize ekstrenin hematolojik parametrelere etkisi

Tablo 2'de görüldüğü gibi, CCl₄ grubunda hematolojik parametrelerden RBC, HGB ve HCT düzeyleri Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterdi. Ayrıca, HCT parametre %'si CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg) grubu Kontrol grubuna ve CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg) grubuna göre önemli düşüş gösterdi. MCV parametresi ise CCl₄ grubunda hem Kontrol hem de CCl₄+*P.aurivella* (100 ve 500 mg/kg) gruplarına göre önemli artış gösterdi. Diğer yandan, Kontrol grubu RDW (%) ve RDW-SD (fL), değerleri tüm gruplara göre önemli



düşüş gösterirken, Kontrol grubu WBC ve PLT değerleri tüm gruplara göre önemli artış gösterdi. Trombosit parametrelerinden PCT hem CCl₄ hem de CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg) grubunda Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterdi. Diğer yandan PDW değeri

ise CCl₄+*P.aurivella* (100 ve 500 mg/kg) gruplarda Kontrol grubuna göre önemli artış gösterdi.



Şekil 1. CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *P.aurivella* mantar ekstresinin eritrosit MDA ve GSH düzeyine etkisi. Önem derecesi bütün testler için (p < 0.05) olarak kabul edildi.

^a:Kontrol grubuna göre farklı (p < 0.05).

CCl₄:karbon tetraklorür, *P.aurivella*: *Pholiota aurivella*, GSH: redükte glutatyon, MDA: malondialdehit

Tablo 1. CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan Rat'larda *P.aurivella* liyofilize ekstrenin eritrosit antioksidan enzim aktivitetlerine etkisi

Enzimler	Kontrol	CCl ₄	CCl ₄ + <i>P. aurivella</i> (100 mg/kg)	CCl ₄ + <i>P. aurivella</i> (500 mg/kg)
GST U/ml	0.85±0.19	0.69±0.21	0.88±0.17	0.88±0.05
GR U/ml	0.75±0.20	0.52±0.14	0.70±0.16	0.73±0.17
CAT U/ml	992.74±249.62	801.94±190.58	843.61±209.00	854.17±73.25
GPx U/ml	753.79±95.85	286.21±74.00 ^a	505.60±116.31 ^{ab}	508.53±104.91 ^{ab}
SOD U/ml	2024.06±115.09	2042.85±95.41	1998.68±109.39	2100.24±83.05

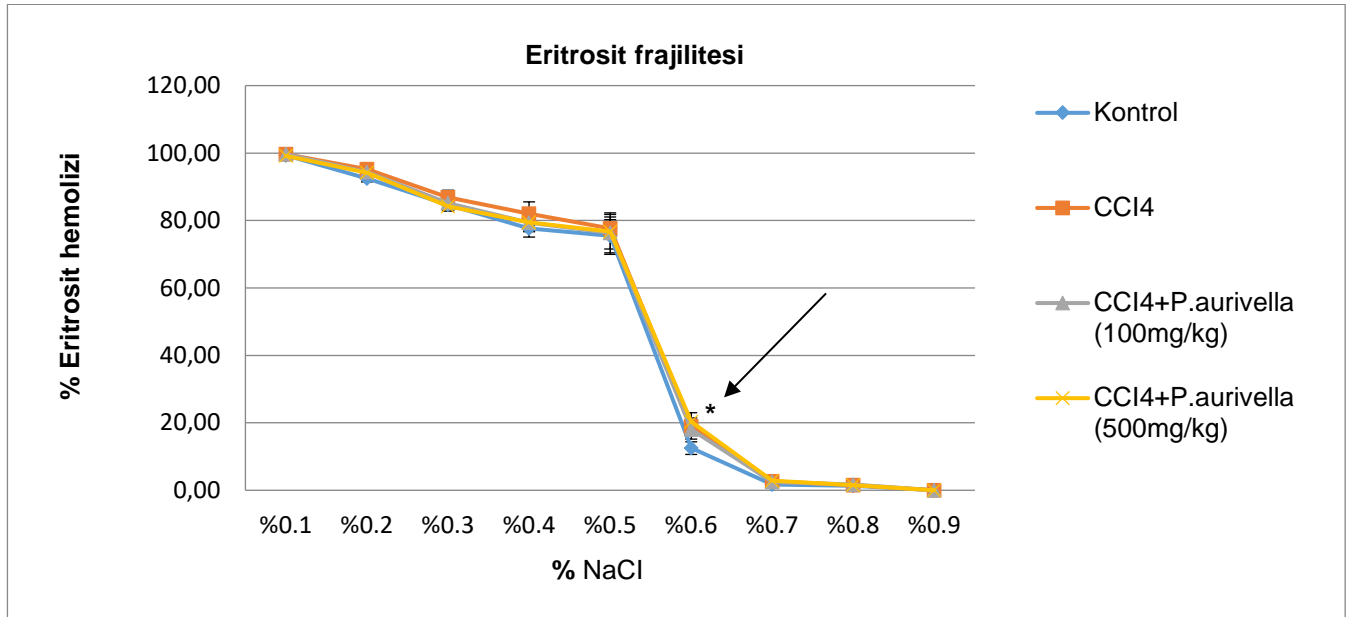
Önem derecesi bütün testler için (p < 0.05) olarak kabul edildi.

^aKontrol grubuna göre farklı (p < 0.05)

^bCCl₄ grubuna göre farklı (p < 0.05)

^cCCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg, ekstre) grubu CCl₄+ *P.aurivella* (500 mg/kg, ekstre) grubuna göre farklı (p < 0.05)

CCl₄:karbon tetraklorür, *P.aurivella*: *Pholiota aurivella*, GST: glutatyon S-transferaz, GR: glutatyon redüktaz, CAT: katalaz, GPx: glutatyon peroksidaz, SOD: süperoksid dismutaz



Şekil 2. CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *P.aurivella* mantar ekstresinin eritrosit frajilitesine etkisi. Önem derecesi bütün testler için (p < 0.05) olarak kabul edildi.

*: Aynı konsantrasyon noktadaki ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p < 0.05).

CCl₄: karbon tetraklorür, *P.aurivella*: *Pholiota aurivella*, % NaCl: yüzde sodyum klorür

Tablo 2. CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan Rat'larda *P.aurivella* liyofilize ekstrenin hematolojik parametrelere etkisi

Hematolojik parametreler	Kontrol	CCl ₄	CCl ₄ + <i>P.aurivella</i> (100 mg/kg)	CCl ₄ + <i>P.aurivella</i> (500 mg/kg)
RBC (×10 ⁶ /uL)	8.13±0.43	7.16±0.65 ^a	7.83±0.70	7.75±0.27
HGB (g/dL)	14.78±0.52	12.94±1.76 ^a	13.78±0.94	14.88±0.39
HCT (%)	45.72±1.56	40.80±3.48 ^a	41.48±1.89 ^a	44.88±1.62 ^c
MCV (fL)	55.14±3.01	63.40±7.61 ^a	53.06±2.54 ^b	52.05±0.79 ^b
MCH (pg)	18.20±0.82	19.20±1.71	17.06±0.66	17.73±0.85
MCHC (g/dL)	32.82±0.91	30.98±2.08	33.18±0.96	33.08±0.60
RDW (%)	12.36±0.69	18.06±3.63 ^a	17.50±3.65 ^a	15.98±0.22 ^a
RDW-SD (fL)	26.96±1.69	40.18±6.25 ^a	35.36±7.02 ^a	32.38±0.37 ^{ab}
WBC (×10 ³ /uL)	4.44±0.89	2.92±0.32 ^a	2.18±0.72 ^a	2.28±0.83 ^a
PLT (×10 ³ /uL)	975.20±63.08	758.40±68.65 ^a	768.60±44.83 ^a	825.50±52.14 ^a
PCT(%)	0.59±0.06	0.48±0.04 ^a	0.47±0.03 ^a	0.53±0.06
PDW (fL)	16.08±0.26	16.86±0.87	16.84±0.44 ^a	16.50±0.22 ^a

Önem derecesi bütün testler için (p < 0.05) olarak kabul edildi.

^a: Kontrol grubuna göre farklı (p < 0.05).

^b: CCl₄ grubuna göre farklı (p < 0.05).

^c: CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg, ekstre) grubu CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg, ekstre) grubuna göre farklı (p < 0.05).

CCl₄: karbon tetraklorür, *P.aurivella*: *Pholiota aurivella*, RBC: eritrosit, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: ortalama eritrosit hacmi, MCH: eritrositteki ortalama hemoglobin miktarı, MCHC: eritrositteki ortalama hemoglobin konsantrasyonu, RDW: eritrosit dağılım genişliği, WBC: beyaz kan hücresi, PLT: trombosit sayısı, PCT: trombositcrit, PDW: trombosit dağılım genişliği.



Tartışma

Oksidatif stres, pek çok hastalığın gelişimine öncülük eden, kronik hastalık riskini artıran, yaşlanma süreçlerinde önemli rol oynayan, ölümcül sonuçları olan endojen ve eksojen kaynaklı olarak meydana gelebilen karmaşık olaylar dizisidir. Oksidatif stres yapıcı olumsuzluklardan kaçınmak için vücudun antioksidan savunma sisteminin güçlü olması gerekmektedir. Mantarlar tiamin, riboflavin, askorbik asit, ergosterol ve niasin gibi vitaminler, esansiyel amino asitler, çeşitli proteinler, yağlar, glikozitler, uçucu yağlar, tokoferoller, fenolik bileşikler, flavonoidler, karotenoidler, folatlar, organik asitler bakımından etkili antioksidan bileşikler içerirler (Patel ve Goyal, 2012). Mantarlar antioksidan zengin besinler olmalarının yanı sıra *Lentinula*, *Ganoderma*, *Lactarius*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Ramaria*, *Agrocybe*, *Volvopluteus*, *Bovista*, *Tricholoma* ve *Hericium* gibi mantar cinslerinin önemli biyolojik aktiviteye sahip oldukları ve tıp alanında kanser tedavilerinde yararlanıldığı rapor edilmiştir (Alkan ve ark., 2017).

Bu çalışmada, kayıtlara hem yenilebilir hem de yenilmez olarak geçen *P.aurivella* mantarından elde edilen liyofilize ekstrenin CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlara verilerek çeşitli kan parametrelerine etkisi araştırılmıştır. *P.aurivella* ekstresinin *in vivo* olarak eritrositlerdeki çeşitli antioksidatif parametrelere, lipid peroksidasyonuna, eritrosit fragilitesine ve çeşitli hematolojik parametrelerine etkisi ilk defa bu çalışmada incelenmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi kullanılan *P.aurivella* ekstraktının lipid peroksidasyonunu engellemediği tam aksine CCl₄'un olumsuz etkileri gibi GSH düzeyinde önemli düşüşe neden olduğu görülmektedir. Bu bulgular bize *P.aurivella* ekstresinin rat modelinde eritrosit hücre membranını koruma potansiyelinin olmadığını ve vücutta önemli savunma görevi gören antioksidan enzimlerden GSH düzeyinde düşüşe neden olması sebebiyle toksik etkili olabilme ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Bu mantar ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmaların bulgularına rastlanılmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Lactarius necator*, *Agaricus bisporus*, *Lyophyllum shimeji*, *Pleurocybella porrigens* ve *A. aegerita* gibi çeşitli mantarların *in vivo* çalışmalarındaki bulgular bu mantarların çeşitli toksik etkilere sahip olmaları ile bizim çalışmamıza benzerlik

göstermektedir (Jin ve ark., 2014). Yapılan bir diğer çalışmada, CCl₄ ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda CCl₄ grubunda MDA içeriğinin önemli artış, GSH düzeyinin ise önemli düşüş gösterdiği ve tedavi amaçlı kullanılan CCl₄+silymarin ve CCl₄+*Macrocybe gigantea* etanolik ekstraktının uygulandığı rat gruplarında ise bu parametrelerde tam tersi etki görüldüğü, bu nedenle silymarin ve mantarın koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Acharya ve ark., 2012). Tablo 1' de görüldüğü gibi çalışmada GST, GR, CAT, GPx ve SOD gibi antioksidan enzim aktivitelerine bakıldı. CCl₄ toksisitesine karşı mantarın kullanılan gruplarda GPx enzim aktivitesinde artışa neden olduğu görüldü. GPx, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) oksitlenmesini ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesini sağladığı için GPx aktivitesindeki bu artışa sebep olmuş olabilir. Ayrıca, mantarlarla ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda CCl₄'un çeşitli karaciğer harabiyet parametrelerinde (AST ve ALT gibi) ve lipid peroksidasyon düzeyinde artışa neden olduğu ancak koruyucu amaçlı kullanılan mantarların antioksidan savunma enzim seviyelerindeki artışla beraber bu oluşan hasarı baskıladığı rapor edilmiştir (Anand ve ark., 1996; Jayakumar ve ark., 2006). Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *P.aurivella* liyofilize ekstresi ise eritrosit MDA içeriğini CCl₄ grubuna göre düşüremediği ve GPx enzimi dışında çeşitli antioksidan savunma sistemi enzimlerinde aktivite artışı görülemediğinden bu mantarın lipid peroksidasyonunu engelleme ve antioksidan doku koruyucu etkisinin zayıf veya olmadığını göstermektedir.

Çalışmada bakılan bir diğer önemli parametre eritrositlerin parçalanmaksızın su alabilme yeteneği anlamındaki eritrosit fragilitesidir. Eritrositlerin membran esnekliği hücre agregasyonunun belirlenmesinde önemlidir. Eritrosit fragilitesi genellikle herediter sferositoz, immun hemolitik anemiler, herediter stomasitoz, hipokromik mikrositik anemiler ve karaciğer hastalıklarının tanısında kullanılan önemli bir testtir. Şekil 2'de görüldüğü gibi, % 0.6 NaCl konsantrasyonuna bırakılan eritrositlerin CCl₄, CCl₄+*P.aurivella* (100 mg/kg) ve CCl₄+*P.aurivella* (500 mg/kg) gruplarındaki hemoliz durumu Kontrol grubuna göre önemli artış gösterdiği ve eritrositlerdeki hemoliz olayının en fazla % 0.6 ve % 0.5 civarındaki NaCl konsantrasyonlarında olduğu tespit edilmiştir. Bu



sonuçlar antioksidan savunma sistemindeki parametrelerle uyum gösteren bir durumdur. Oksidatif stres plazma membranını dengesiz hale getirerek geçirgenliğini arttırması, akışkanlığını azaltabilmesi ve membran stabilitesindeki azalma ile ilişkili önemli bir faktör olması (Paraiso ve ark., 2014) nedeniyle, eritrosit farjilite testi endirekt antioksidan statünün değerlendirilmesi olarak ta tanımlanabilir. CCl_4 'ün karaciğer toksisite etkisi ile bilinen zehirli bir madde olması, sitokrom P450 elektron taşıma zincirindeki NADPH ile genellikle triklorometil radikali ($\bullet CCl_3$) ve triklorometil peroksit radikalleri ($CCl_3O_2\bullet$) olarak düşünülen maddelere karaciğerde metabolize olması ve bu maddelerin O_2 ile hızlı tepkimesi sonucu serbest radikal üretimini ve eritrosit osmotik frajilitesini arttırdığı belirlenmiştir (Fujita, 1990; Ganie ve ark., 2011). Bu veriler *P.aurivella* ekstresinin CCl_4 kaynaklı eritrositlerin hemolizini engellemediği görülmüştür.

Eritrosit ve hemoglobin içeriği, memelilerin oksijen alımındaki rolleri ve hayatta kalmasının korunmasında önemli rol oynamaktadır. Tablo 2'de görüldüğü gibi CCl_4 grubunda RBC, HGB, HCT, WBC, PLT ve PCT düzeyleri Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterirken MCV ve RDWs değerleri ise artış gösterdi. Daha önce sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, CCl_4 'ün RBC ve HGB düzeyinde düşmeye neden olduğu bildirilmiştir (Elshater ve ark., 2013). Bir başka çalışmada, CCl_4 'ün WBC, RBC, HGB ve PLT düzeyinde Kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Rahmouni ve ark., 2017). Bulgularımız bu çalışma verileriyle uyumludur. Çalışmamızın başka parametrelerinde de bazı önemli değişikliklerin bulunmuş olması çalışmadaki deney süresi ile ilişkili olabilir. CCl_4 'ün karaciğer hasarı ile beraber oluşan serbest radikaller kemik iliğindeki eritropoetik ve trombopoietik aktiviteleri engellenmesi sonucu RBC, PLT ve diğer hücre üretiminin baskılanmasına sebep olabileceği bildirilmiştir (Moritz ve

Pankow, 1988). CCl_4 ile beraber kullanılan farklı dozdaki *P.aurivella* ekstresinin MCV, RDW-SD ve HCT parametrelerinde önemli etki gösterdiği bulunmuştur. Bu etkiler kesin olmamakla beraber anemi, B12 vitamin eksikliği, eritrosit frajilitesindeki hassaslık ve hematopoetik sürecindeki kötü eritrositlerin oluşumuna bağlı olabilir. Kullanılan mantar ekstresinin CCl_4 hasarına karşı çeşitli hematolojik parametreler üzerinde gözle görülür değişikliklere sebep olması, ileriki çalışmalarda *P.aurivella* mantarının hematolojik parametrelerle olan mekanizmasının ayrıntılı çalışılması klinik anlamda önemli katkılar sunabilir.

Sonuç olarak, CCl_4 ile oksidatif stres oluşturulan sıçanlarda *P.aurivella* mantar ekstresinin antioksidan savunma sistemi enzimlerinden GSH düzeyinde düşüşe, GPx aktivitesinde artmaya neden olduğu görülmüştür. Bu iki parametre döngü içinde birbiriyle ilişkili olan parametreler olduğundan bir parametredeki aksaklık diğer bir parametre düzeyini etkileyebilmenin sonucu olabilir. Ayrıca, kullanılan mantar ekstresinin her iki dozunun CCl_4 gibi eritrosit hemolizini arttırdığı ve hematolojik parametreler üzerinde ise çeşitli dalgalanmalara neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanılarak *P.aurivella* mantarının toksik etkilerinin olabileceği, insanların bu mantarı tüketiminden kaçınması gerektiği; ancak çeşitli hematolojik hastalıklar ve kanser çalışmalarında bu mantarın etkilerinin ortaya konulmasının önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Mantarın toplanması ve teşhisinde katkısı olan Prof. Dr. Yusuf UZUN'a, Prof. Dr. Kenan DEMİREL'e, Cemil SADULLAHOĞLU'na ve bu çalışmayı destekleyen Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na (TAP-2017-6448) teşekkürü bir borç bilirim.

Kaynaklar

- Acharya K., Chatterjee S., Iswas G., Hatterjee A., Saha G.K., *Hepatoprotective effect of a wild edible mushroom on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice*. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 4(3): 285-288 (2012).
- Alkan S., Özparlak, H., Zengin, G., Kaşık G., *Antioxidant and In Vitro Some Enzyme Inhibitory Activities of Methanolic Extract of Cultivated Lentinula edodes*. Mantar dergisi/The journal of fungus, 8(2): 90-98 (2017).
- Anand C.V., Anand V., Agarwal R., *Antioxidant enzymes, gammaglutamyl transpeptidase and lipid peroxidation in kidney of rats exposed to cigarette smoke*. Ind. J. Exp. Biol., 34 (5): 486– 488 (1996).
- Breitenbach J., Kränzlin F., *Fungi of Switzerland*. Vol.4, Verlag Mykologia Lucerne, Switzerland 1995. p. 368.
- Chen J.N., Wang Y.T., Wu J.S.B., *A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom pleurotus citrinopileatus exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(15): 6706–6711 (2009).



- Dogan A., Celik I., Kaya M.S., *Antidiabetic properties of lyophilized extract of acorn (Quercus brantii Lindl.) on experimentally STZ-induced diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 176(1): 243–251 (2015).
- Elshater A.A., Salman M.M., Mohamed S.A., *The hepatoameliorating effect of Solanum nigrum against CCl₄ induced liver toxicity in Albino rats*. Egypt Acad. J. Biol. Sci., 5 (1): 59–66 (2013).
- Feeney M.J., Dwyer J., Hasler-Lewis C.M., Milner J., Noakes M., Rowe S., et al., *Mushrooms and health summit proceedings*. The Journal of Nutrition, 144(1): 1128-1136 (2014).
- Fujita K., *A study on erythrocyte-membrane osmotic resistance and periodontal changes in rats treated with carbon tetrachloride*. Shikwa Gakuho, 90(5): 727-743 (1990).
- Ganie S.A., Haq E., Hamid A., Qurishi Y., Mahmood Z., Zargar B.A., et al., *Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of Podophyllumhexandrum*. BMC Complement Alternative Medicine, 11: 17. doi.org/10.1186/1472-6882-11-17 (2011).
- Guillamón E., García-Lafuente A., Lozano, M., D'Arrigo M., Rostagno M.A., Villares A., et al., *Edible mushroom: Their roles in the prevention of cardiovascular diseases*. Fitoterapia, 81(7): 715–723 (2010).
- Imazeki R., Hongo T., *Colored illustrations of mushrooms of Japan*, vol I (in Japanese). Hoikusha, Osaka. 1987. p. 207.
- Jayakumar T., Ramesh E., Geraldine P., *Antioxidant activity of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus, on CCl₄-induced liver injury in rats*. Food and Chemical Toxicology, 44 (12): 1989-1996 (2006).
- Jin Y., Che T., Yin Y., Yu G., Yang Q., Liu W., et al., *Lethal protein in mass consumption edible mushroom Agrocybe aegerita linked to strong hepatic toxicity*. Toxicol, 90 (1): 273-285 (2014).
- Kalaras M.D., Beelman R.B., Holick M.F., Elias R.J., *Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (Agaricus bisporus)*. Food Chemistry, 135(2): 396–401 (2012).
- Moritz R.P., Pankow D., *Effect of carbon tetrachloride and chloroform on hematologic parameters in rats*. Folia Haematol., 116 (2): 283–287 (1988).
- OECD Guideline for Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity. Acute Toxic Class Method 17th December (2001), No 423.
- Paraiso L.F., de Freitas M.V., Goncalves E.O.A.F., de Almeida Neto O.P., Pereira E.A., Mascarenhas Netto R.C., et al., *Influence of acute exercise on the osmotic stability of the human erythrocyte membrane*. Int. J. Sports. Med., 35(13): 1072-7 (2014).
- Patel S., Goyal A., *Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review*. Biotech, 2(1): 1-15 (2012).
- Rahmouni F., Hamdaoui L., Badraoui R., Rebai T., *Protective effects of Teucrium polium aqueous extract and ascorbic acid on hematological and some biochemical parameters against carbon tetrachloride (CCl₄) induced toxicity in rats*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 91(1): 43–48 (2017).
- Regula J., Siwulski M., *Dried Shiitake (Lentinula edodes) and oyster (Pleurotus ostreatus) mushroom as a good source of nutrient*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 6(4): 135–142 (2007).
- Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C., Taylor P., *The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence*. Journal of Functional Foods, 4 (4): 687–709 (2012).
- Sanchez C., *Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms*. Synthetic and Systems Biotechnology, 1(2):13-22 (2017).
- Singh A.K., Singh S., Garg G., Rizvi S.I., *Rapamycin alleviates oxidative stress-induced damage in rat erythrocytes*. Biochemistry and Cell Biology, 94(5): 471-479 (2016).
- Solak M.H., Gücin F., *New records of macrofungi for Turkey from Bursa District and other macrofungi found in the district*. Turkish Journal of Botany, 16 (1): 335-346 (1992).
- Suzek H., Celik I., Dogan A., Yildirim S., *Protective effect and antioxidant role of sweetgum (Liquidambar orientalis) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats*. Pharmaceutical Biology, 54 (3): 451–457 (2016).