

**Atf İçin:** Erdoğan MK, Ağca CA, Geçibesler İH, 2021. Agaricus campestris Metanol Ekstraktının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Terapötik Potansiyelinin Araştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 869-879.

**To Cite:** Erdogan MK, Agca CA, Gecibesler IH, 2021. Investigation of Fatty Acid Composition and Therapeutic Potential of Methanol Extract of *Agaricus campestris*. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 869-879.

### **Agaricus campestris Metanol Ekstraktının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Terapötik Potansiyelinin Araştırılması**

Mehmet Kadir ERDOĞAN<sup>1\*</sup>, Can Ali AĞCA<sup>2</sup>, İbrahim Halil GEÇİBESLER<sup>3</sup>

**ÖZET:** Yapılan bilimsel araştırmalar mantarların çok umut verici farmakolojik potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir. *Agaricus campestris*, önemli biyoaktiviteye sahip yenilebilir bir mantar türüdür. Bu çalışmada, *A. campestris* metanol ekstraktının (AC) antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri ile yağ asidi kompozisyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. AC içeriğindeki yağ asitlerinin kantitatif analizi GC-MS spektrometresi ile değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ise DPPH serbest radikali giderme testi, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi, ferrik iyonlarını indirgeme testi ve Ferröz iyonlarını şelatlama testleri kullanılmıştır. AC ekstraktının antiproliferatif etkisi ise insan kolon (HT-29), meme (MCF-7) ve beyin (U373) kanseri hücre hatlarında zaman ve doz bağımlı olarak WST-1 hücre canlılığı analizi ile belirlenmiştir. AC içeriğinde baskın bileşenler olarak doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18:2, ω-6) %56.45 oranında ve doymuş yağ asidi olan palmitik asit (16:0) %28.74 oranında analiz edilmiştir. Antioksidan aktivite parametreleri geniş konsantrasyon aralıklarında değerlendirildiğinde, artan konsantrasyon ile lineer bir antioksidan aktivite artışı gözlemlendi. AC 24 saatlik tedavide HT-29 hücrelerinde 52.62 µg mL<sup>-1</sup> IC<sub>50</sub> değeri ile en yüksek antiproliferatif etkiyi göstermiştir. Bu bulgular, *A. campestris* hakkında daha fazla araştırma yapmak için ilginç veriler ortaya koymaktadır, ve özellikle kanser hücreleri üzerindeki güçlü antiproliferatif potansiyel mantarın daha fazla araştırılmaya değer olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Agaricus campestris*, Antioksidan, Antiproliferatif, Yağ asidi kompozisyonu

#### **Investigation of Fatty Acid Composition and Therapeutic Potential of Methanol Extract of *Agaricus campestris***

**ABSTRACT:** Recent reports indicate that mushrooms have very promising pharmacological potential. *Agaricus campestris* is an edible fungus species with bio-activity. This study aimed to screen the anti-oxidant, anti-proliferative activities, and fatty acid composition of methanol extract of *A. campestris* (AC). The quantitative analysis of fatty acids of AC was evaluated by GC-MS spectrometer. For the determination of antioxidant activity, DPPH free radical scavenging test, ABTS radical scavenging activity, Ferric ions reduction assay and Ferrous ions chelation assays were used. The antiproliferative effect of AC was determined by the time and dose dependent with WST-1 cell viability analysis in human colon (HT-29), breast (MCF-7) and brain (U373) cancer cell lines. Linoleic acid (18: 2, ω-6), which is the unsaturated fatty acid, was analyzed at 56.45% and the saturated fatty acid palmitic acid (16: 0) was analyzed at 28.74% as the major components in AC. It was observed that AC, whose antioxidant activity parameters were evaluated in wide concentration ranges, displayed a linear increase in antioxidant activity with increasing concentration. AC showed the highest antiproliferative effect in HT-29 cells with an IC<sub>50</sub> value of 52.62 µg mL<sup>-1</sup> for 24 h treatment. These results provide interesting data for further research on *A. campestris*, and its strong antiproliferative potential particularly on cancer cells, indicates that the mushroom is worth further investigation.

**Keywords:** *Agaricus campestris*, Antioxidant, Antiproliferative, Fatty acid composition

<sup>1</sup> Mehmet Kadir ERDOĞAN ([Orcid ID: 0000-0002-1579-5737](https://orcid.org/0000-0002-1579-5737)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bingöl, Türkiye

<sup>2</sup> Can Ali AĞCA ([Orcid ID: 0000-0002-0244-3767](https://orcid.org/0000-0002-0244-3767)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bingöl, Türkiye

<sup>3</sup> İbrahim Halil GEÇİBESLER ([Orcid ID: 0000-0002-4473-2671](https://orcid.org/0000-0002-4473-2671)), Bingöl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Doğal Ürün Araştırma Laboratuvarı, Bingöl, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Kadir ERDOĞAN, e-mail: mkerdogan@bingol.edu.tr

## GİRİŞ

Son dönemlerde yapılan çalışmalar, bazı gıda ürünlerinin zayıf yan etki gösteren ve yüksek anti-kanser potansiyeline sahip doğal biyoaktif maddeler içerdiğini göstermiştir. Bu bağlamda, birçok tıbbi ve yenilebilir mantar türü, sahip oldukları biyoaktif bileşik kompozisyonları ve yüksek besin içerikleri bakımından ön plana çıkmaktadırlar (Lindequis, 2013). Tıbbi mantarlar, farmasötik uygulamalarda kullanılan ancak doğrudan yenilemeyen mantarlardır. Yenilebilir mantarlar; fenolik bileşikler, flavonoidler ve yağ asidi içerikleri bakımından zengin olmaları nedeniyle fonksiyonel ve sağlıklı gıda kaynağı olarak değerlendirilmekte ve sahip oldukları tıbbi özelliklerinden dolayı bilim insanlarının dikkatini çekmektedirler. Ayrıca bu mantarların ve bunlardan elde edilen farklı ekstraktların birçok hastalığın muhtemel tedavisi için geçmişten günümüze yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yenilebilir mantarların biyoaktif bileşiklerinin potansiyel farmakolojik etkilerine bağlı olarak, anti-oksidan, anti-biyotik (Liu ve ark., 2013), anti-mikrobiyal (Alves ve ark., 2013), hepatoprotektif (Liu ve ark., 2017), anti-diyabetik (Dubey ve ark., 2019) ve anti-kanser etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Önemli yenilebilir mantarlar Agaricus cinsine aittirler. *A. bisporus* kültüre edilen bir mantar türü olmasına karşın, *A. campestris* doğada yabani olarak yetişen yenilebilir bir mantardır. *A. campestris* türünün düşük kalori ve şeker içeriğine sahip olduğu, ve fenolik asitler bakımından diğer Agaricus türlerine oranla en yüksek konsantrasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Glamočlija ve ark., 2015).

Antioksidanlar, hücre biyomoleküllerinin (lipitlerin, DNA veya proteinlerin) oksidasyonunu inhibe edip, hücrelere verilen zararı en aza indirerek, serbest radikal saldırısına karşı savunmada önemli bir rol oynarlar (Liu ve ark., 2013; Harris ve DeNicola., 2020). Tıbbi değeri olan ve yenilebilir antioksidan özellik, sentetik antioksidanların aksine, toksik ve mutajenik etkiler olmaksızın, serbest radikalın nötralizasyonu sağlayabilir (Glumac ve ark., 2017; Karaman ve ark., 2019). Bununla birlikte, terapötik potansiyelleri nedeniyle mantarların antioksidan ve antitümör değerleri, mantarlardan ekstrakte edilebilen çok çeşitli bileşiklere bağlıdır.

Mantarlarda, yağ asidi kompozisyonu besinsel faktörler, oksijen ve çevresel sıcaklık gibi farklı etmenler tarafından etkilenmekle birlikte, tipik olarak ortaya çıkan başlıca yağ asitleri, membran fosfolipidleri ve depolama triasilgliseroller, palmitik ve stearik asitlerdir. Ayrıca, palmitik ve stearik asitlerin doymamış türevleri palmitoleik, oleik, linoleik ve linolenik asitler de mantarların içeriğinde yer almaktadır (Suutari, 1995). Yapılan çalışmalarla, mantarların yağ asidi kompozisyonunda bulunan, linolenik asitin (LA) meme (Chajès ve ark., 1995), mesane (Brinkman ve ark., 2011) ve kolon kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu down-regüle ettiği, ayrıca LA pre-inkübasyonun sitotoksik ajanlara karşı hücre hassasiyetini arttırdığı gösterilmiştir (Chamberland ve Moon, 2015).

Yukarıda geçen bilgilerin ışığında bu çalışmada, *A. campestris* metanol ekstraktının (AC), yağ asidi kompozisyonu ve anti-oksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, yenilebilir mantarların kanser önleyici maddeler barındırdığı son yıllarda doğrulandığı için, kanser tedavisinde doğal ajanlar olarak kullanılabileceği göz önüne alındığında, AC ile tedavi edilen U373 beyin tümör hücreleri, MCF-7 meme kanseri hücreleri ve HT-29 kolon kanseri hücre hattındaki anti-proliferatif etki araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Bitkisel Ekstraktın Hazırlanması

*A. campestris* Bingöl İli Çan (Göztepe) köyü 38°57'47.7"N 40°35'31.0"E koordinatlarında 780 m yükseklikteki çayırılık alanlardaki doğal habitatlarından toplanmıştır. Toplanan mantar örnekleri laboratuvara getirildikten sonra liyofilize edilmek için -80 C'de dondurulmuştur. Liyofilizasyon işlemi

ile kurutulan mantar örneği (300 gr) ve metanol çözücüsü (2000 mLx3) kullanılarak 20°C'de ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktın çözücüsü evaporatör yardımı ile uzaklaştırılarak kuru ekstrakt (12.4 g) elde edilmiştir. Elde edilen kuru ekstrakt biyolojik aktivite testleri ve kimyasal analizler için +4°C de muhafaza edilmiştir.

### Yağ Asidi İçeriğinin Belirlenmesi

AC içerisindeki apolar karakterli yağ asitlerinin kantitatif analizi için GC-MS spektrometresi kullanılmıştır. Metanol ekstraktı içerisindeki lipofilik bileşenlerin analizi için ekstraktlara esterleştirme işlemi uygulandı. Esterifikasyon işlemi için metanol içerisinde 1 M'lık KOH çözeltisi hazırlandı. Deney tüpü içerisine ekstraktan 50 mg alındı ve 5 mL hekzan içerisinde çözüldü. Oluşan çözelti üzerine hazırlanan alkali çözeltiden 3 mL konularak vorteksledi. Şiddetli karıştırma işlemi sonrasında üst fazlar alınarak 0.45 µm gözenekli filtreden süzülerek viallere alındı (Gecibesler vd. 2018). AC bileşenlerinin GC-MS spektrometresi ile analizi için Agilent 5975 C MSD-7890-GC marka cihaz kullanıldı. Kolon olarak HP-5MS %5 PMS (Phenyl Methyl Silican) 30mx250µmx0,25µm ebatlarında kolon kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Numunelerin enjeksiyon hacmi 1µL; split oranı 25:1; sıcaklık 250°C; FID dedektör voltajı 1.176471kV ve analiz süresi 61 dakika olarak ayarlandı. Sıcaklık programı ise 0. dakikada başlangıç sıcaklığı 120°C'de ayarlanarak bu sıcaklıkta 4 dk sabit tutuldu. 27 dakika boyunca dakikada 3°C'lik artış ile 200°C'ye getirildi. 10 dakika boyunca 200°C'de sabit tutuldu. 5 dakika boyunca dakikada 15°C'lik sıcaklık artışı ile sıcaklık 280°C'ye getirildi. Son olarak 15 dakika boyunca bu sıcaklıkta sabit tutularak program sonlandırıldı.

### Antioksidan Aktivite Testleri

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde; DPPH serbest radikali giderme testi, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS), ferrik (Fe<sup>3+</sup>) iyonlarını indirgeme testi (FRAP) ve Ferröz (Fe<sup>2+</sup>) iyonlarını şelatlama (FCAP) testi kullanılmıştır.

### Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali giderme aktivitesi için Blois tarafından kullanılan metod uygulanmıştır (Blois, 1958). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AC ekstraktlarından (0.5 mL) alınarak içerisinde litrede 6x10<sup>-5</sup> mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali solusyonu (2.5 mL) karıştırıldı. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlık bölgede bekletildi ve 517 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir ekstrakt örneği ve antioksidan standart için ayrı ayrı metanol içeren numune körleri ve DPPH içeren kontrol grupları oluşturuldu. Her bir ekstrakt örneği ve standartlar ile tek tek çalışıldı, kontrolün absorbansı günlük olarak her ölçümde tekrar tekrar okundu ve üç paralel çalışıldı.

DPPH radikali giderme aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\text{DPPH radikali giderme aktivitesi (\%)} = \frac{C_A - N_A}{C_A} \times 100$$

Denklemden C<sub>A</sub> kontrolün absorbans değerini, N<sub>A</sub> ise numunenin absorbans değerini göstermektedir.

### İndirgeyici Güç Özelliğinin Ölçülmesi (FRAP)

Ferrik (Fe<sup>3+</sup>) iyonlarını indirgeme gücü kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe<sup>3+</sup> iyonlarını Fe<sup>2+</sup> iyonlarına indirger ve FeCl<sub>3</sub> ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AC ekstraktlarının 1 mL'sine, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.6) ve 2.5 mL %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> eklendi. Karışımlar 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10'luk TCA eklendi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüj sonrası süpernatantlardan 2.5 mL alınarak eşit hacimde destile su ve 0.5 mL %0.1'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisi ile karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okutuldu.

### Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi (FCAP)

Metal şelatlama aktivitesine, Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre demir (II) iyonlarını şelatlama özelliği üzerinden bakılmıştır (Dinis ve ark., 1994). Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin her birisinden 0.5 mL deney tüpü içerisine alınarak üzerine 1.6 mL deiyonize su ve 0.05 mL 2 mM FeCl<sub>2</sub> bileşiğinden eklendi. Her bir deney tüpü homojen bir biçimde karıştırıldı ve 30 saniye sonrasında 5 mM ferrozin bileşiğinden 0.1 mL eklendi. Ferrozin bileşiği iki değerlikli demir ile reaksiyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale gelecektir. Bu işlemi takiben 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan reaksiyon karışımının Fe<sup>+2</sup>-Ferozin kompleksinin absorbansı 562 nm'de ölçülmüştür. Böylelikle örneklerin ferröz iyonlarını şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Metal Şelatlama Aktivitesi (\%)} = \frac{C_A - N_A}{C_A} \times 100$$

Denklemden C<sub>A</sub> kontrolün absorbans değerini, N<sub>A</sub> ise numunenin absorbans değerini göstermektedir.

### ABTS Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS)

ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat)) radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlenmiştir. ABTS radikali oluşturulması, ABTS'nin potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) oksidasyonu ile üretildi. Bu işlem için 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikali elde edildi. Elde edilen çözelti kullanılmadan önce 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.700±0.025 nm'ye ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki AC stok çözeltisine (100 µL) ABTS radikali çözeltisi (2.4 mL) ilave edildikten sonra 8 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi (Re ve ark., 1999).

### Antiproliferatif Aktivitenin Belirlenmesi

Anti-proliferatif etkiyi belirlemek amacıyla; MCF-7 insan meme, HT-29 insan kolon ve U373 insan beyin tümörü hücre hatları farklı doz ve sürelerde AC ile tedavi edilerek hücre canlılıkları belirlenmiştir.

### Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada, American Type Culture Collection (ATCC) den temin edilmiş olan, MCF-7 insan meme kanseri, HT-29 insan kolon kanseri ve U373 insan glioblastoma multiform hücre hatları kullanılmıştır. Tüm kanser hücre hatları, aksi belirtilmedikçe, içerisinde %10 fetal sıgır serumu (FBS) (56 °C inaktive edilmiş), 3 mM of L-glutamine ve antibiyotik (100 µg mL<sup>-1</sup> streptomisin 100 IU mL<sup>-1</sup> penisilin) içeren DMEM besiyerinde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli koşullara altında kültüre edilmiştir. Hücre geç-logaritmik fazda, yoğunlukları %80-90'a ulaştığında, canlılık testlerinde kullanılmışlardır.

### Hücre Canlılık Testi

AC ekstaktının hücre canlılığı üzerine etkisi doz ve zaman bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Kanser hücreleri, AC ekstraktının dört farklı dozuna (25, 50, 100, 250 µg mL<sup>-1</sup>) 24 ve 48 saatlik sürelerle maruz bırakılmış ve sonuçlar WST-1 (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea) proliferasyon deney kiti kullanılarak elde edilmiştir (Erdogan ve ark., 2020a). Bu amaçla; hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 1x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiştir. Ardından adherent hücrelerin plaka yüzeye tutunması için hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründe gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, 24 ve 48 saat süre ile 25, 50, 100 ve 250 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda AC ile tedavi edilmiştir. Tedavi

sonrasında, aspire edilerek besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca, 10 µL WST-1 solüsyonu taze besiyeri içerisinde çözünerek ilgili kuyucuklara eklenmiştir. 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 120 dk'lık inkübasyonun ardından mikropate okuyucu (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, USA) ile 450 nm'de absorban değerleri kaydedilmiştir.

### İstatistiksel Analizler

Verilerin analizi, GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama ± standart hata olarak belirlenmiş ve  $P < 0.05$  olanlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

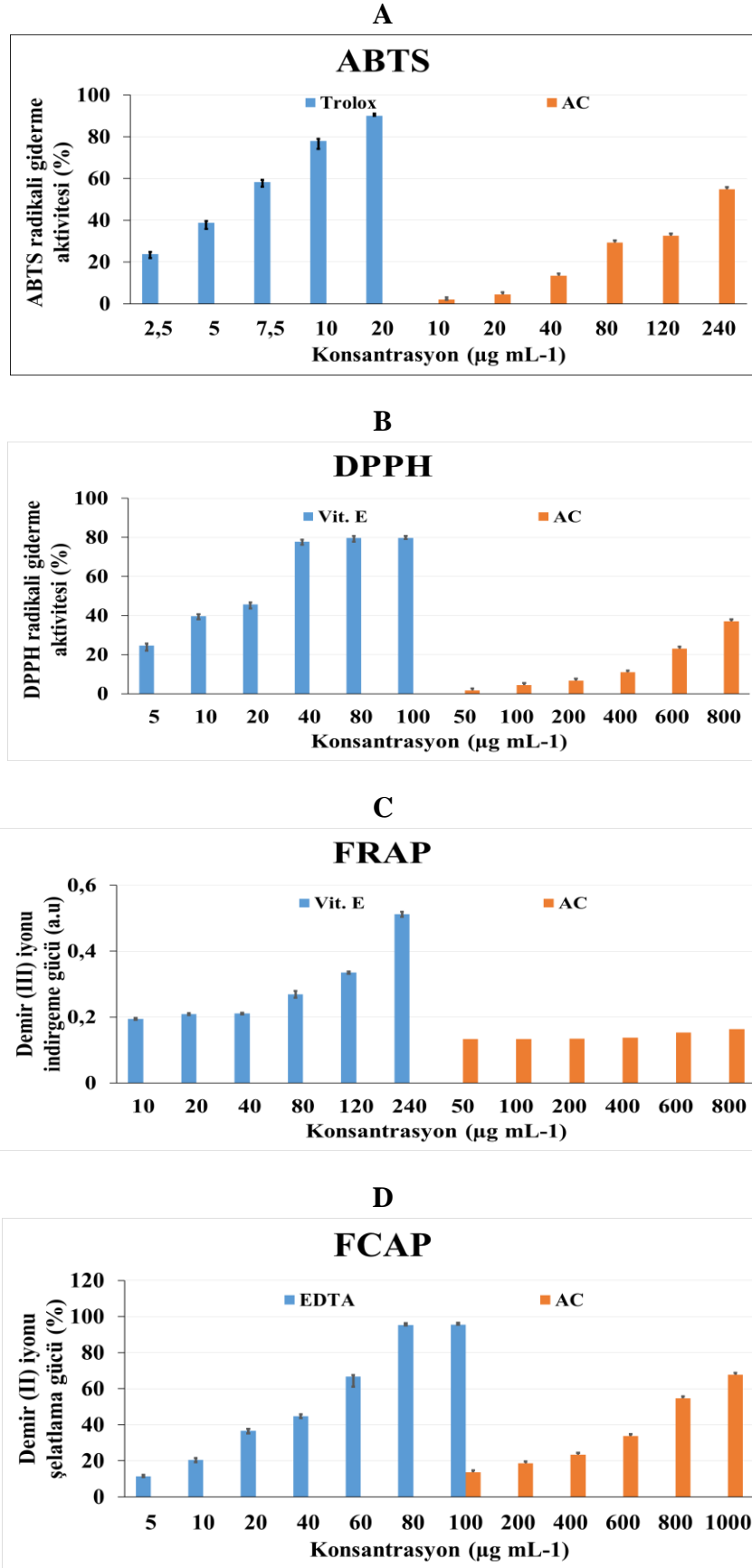
## BULGULAR VE TARTIŞMA

### A. campestris'in Yağ Asidi Kompozisyonu

Mantarlar, oldukça besleyici olmasının yanı sıra, onlara antioksidan özellikler dahil olmak üzere yüksek terapötik değer sağlayan çok çeşitli sekonder metabolitler içerirler (Akata ve ark., 2012; Kosanić ve ark., 2012; Kozarski ve ark., 2015). *A. campestris* türünün de aralarında bulunduğu yenilebilir mantarlar üzerine yapılan lipofilik bileşen analiz sonuçları *A. campestris* içeriğinin palmitik asit ve linoleik asit seviyesi, oleik, stearik ve araşidik asitlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2006). Bu çalışmamız ile AC içeriğindeki yağ asidi kompozisyonu gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilerek 12 tane bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden üç tanesi doymamış yağ asitlerinden (%57.3), dokuz tanesi doymuş yağ asitlerinden (%42.7) oluşmaktadır. Literatür verileriyle uyumlu olarak bizim bulgularımız da AC içeriğinin insan diyetinde önemli bir yere sahip olan doymamış yağ asiti bakımından zengin olduğu ortaya çıkmıştır. AC içeriğinde doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18:2, ω-6) %56.45 oranında ve doymuş yağ asidi olan palmitik asit (16:0) %28.74 oranında baskın bileşenler olarak analiz edilmiştir (Çizelge 1). Günlük diyetinde önemli olan diğer doymamış yağ asitleri olarak α-linoleik asit (%0.80) ve 8,11-eikosadienoik asit (%0.58) minör bileşenler olarak analiz edilmiştir.

**Çizelge 1.** *A. campestris* metanol ekstraktının yağ asidi kompozisyonu

No	Alıkonma zamanı (dk.)	Bileşik ismi	Bağıl Bolluk (%)
1	16.41	Miristik asit (14:0)	1.06
2	17.65	Pentadakanoik asit (15:0)	0.87
3	19.23	Palmitik asit (16:0)	28.74
4	20.92	Heptadekanoik asit (17:0)	0.96
5	22.39	Stearik asit (18:0)	6.71
6	23.52	Linoleik asit (18:2, ω-6)	56.45
7	24.09	Araşidik asit (20:0)	2.08
8	24.50	α-Linoleik asit (18:3, ω-3)	0.80
9	25.33	8,11-Eikosadienoik asit (20:2)	0.58
10	26.34	Behenik asit (22:0)	0.99
11	27.43	Trikosanoik asit (23:0)	0.17
12	28.60	Lignoserik asit (24:0)	0.59



**Şekil 1.** *A. campestris* metanol ekstraktının ABTS (A), DPPH (B), FRAP (C) ve FCAP (D) testleri açısından antioksidan aktiviteleri

### Antioksidan aktivite test sonuçları

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ABTS, DPPH, FRAP ve FCAP testlerini içeren dört farklı antioksidan aktivite test parametresi kullanılmıştır. Kullanılan testler özellikle *A. campestris* gibi gıda temelli doğal ürünlerin antioksidan aktivitelerini belirlemede oldukça yoğun kullanılan testlerdir (Erdogan ve ark., 2020a). ABTS katyon radikali giderme aktivitesini değerlendirmek için 10-240  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aralığındaki AC konsantrasyonu ve troloks antioksidan standardı kullanılmıştır. AC artan konsantrasyonları ile ABTS katyon radikallerini ortamdaki temizlediği görülmüştür (Şekil 1.A). AC 240  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda  $54.90 \pm 0.23$  değerinde bir aktivite göstermiştir. DPPH radikali giderme aktivitesi 50-800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AC konsantrasyon aralığında E vitamini ile mukayese edilerek değerlendirilmiştir. DPPH testinde, Şekil 1.B'de görüleceği gibi, artan AC konsantrasyonu ile birlikte ortamdaki DPPH radikallerinin inhibe edildiği görülmüştür. AC 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonda DPPH'ı  $37.03 \pm 3.17$  oranında inhibe etmiştir. Demir (III) iyonlarını indirgeme potansiyelleri de 50-800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir. Şekil 1.C'de verildiği gibi artan konsantrasyonlarda kaydedilen artan absorban değerleri numunenin bir indirgeme potansiyelinin olduğunu göstermektedir (Gecibesler ve ark., 2017). AC ekstraktının demir (III) iyonlarını artan konsantrasyon ile bir dereceye kadar indirgeyebildiği gösterilmiştir. Bu durumun nedeni, sekonder metabolitlerin bir araya gelmesi ile moleküllerin birbirlerini baskılaması sonucunda aktivitede sınırlamalara neden olması olabilir (Olcott ve Einset, 1958; Yin ve ark., 2012). Son olarak AC şelatlama kapasitesi demir (II) iyonları üzerinden değerlendirilerek antioksidan aktivitesi ortaya konulmuştur. Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri 100-1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AC konsantrasyon aralığında EDTA şelatlama ajanı ile mukayese edilmiştir. Test sonucunda artan AC konsantrasyonu ile birlikte EDTA şelatörüne göre daha ılımlı bir şelatlama aktivitesi görülmüştür (Şekil 1.D).

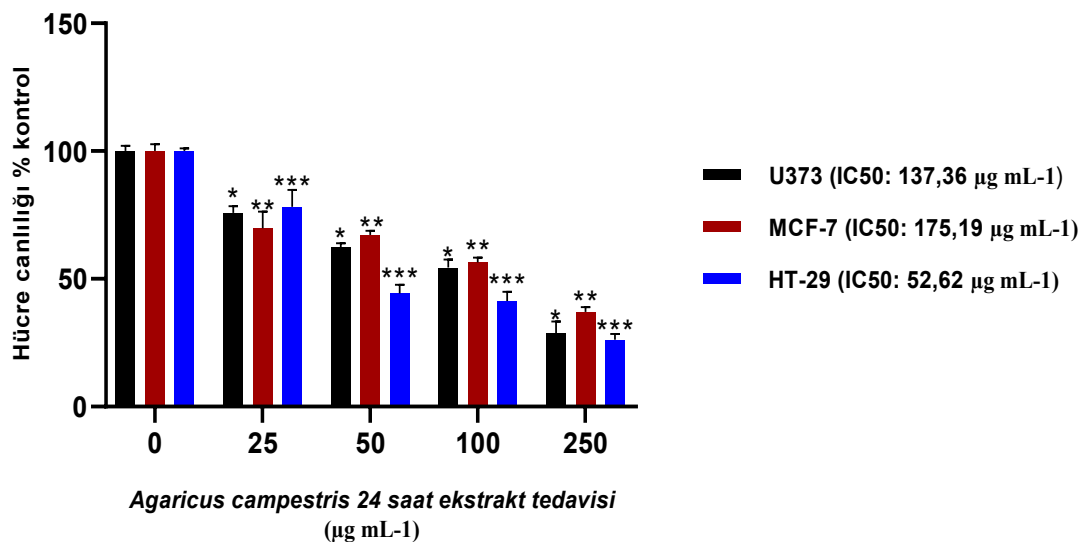
Halk arasında yaygın olarak tüketilen mantar türlerinin antioksidan aktivite ve toplam sekonder metabolit içeriği üzerine yapılan bir çalışmada, *A. campestris* türünün en yüksek fenolik içeriğe (15.63 mg GAE  $\text{g}^{-1}$  ekstre) ve DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC gibi antioksidan aktivite testlerine karşı maksimum antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Akata ve ark., 2019). Bizim bulgularımız da bu çalışmayla uyumlu olarak AC ekstraktının önemli antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

### *A. campestris* Metanol Ekstraktının U373, MCF-7 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Kanser, dünya çapında ölümlerin ana nedenlerinden biridir. Geleneksel kanser tedavisinde kullanılan ajanların neden olduğu toksisite ve yan etkileri en aza indirmek için, doğal kaynaklı yeni moleküllerin keşfine karşı küresel bir eğilimin olduğu bilinmektedir (Erdogan ve ark., 2020b). Mantarlar, büyük ve henüz geniş ölçüde kullanılmamış güçlü farmasötik bileşikler içermektedir (Liu ve ark., 2013). Yapılan güncel bir çalışmada, yabancı yenilebilir mantar olan *A. lanipes* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra *in vitro* koşullarda A549 akciğer kanseri hücre hattına karşı sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *A. lanipes* metanolik özütünün, güçlü antimikrobiyal aktiviteye ve yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, *A. lanipes* metanol ekstraktının pro-apoptotik Bax ve kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeylerinde artışla beraber Bcl-2 ekspresyonunda kayda değer düzeyde azalmaya neden olduğu ve apoptozisi indüklediği bildirmiştir (Kaygusuz ve ark., 2017). *A. blazei* türünün insan pankreatik kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *A. blazei* sıcak su özütünün, G0/G1 hücre döngüsü tutuklaması ve kaspaz-bağımlı apoptozun indüksiyonu yoluyla kültürlenmiş pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. *A. blazei* sıcak su özütü,

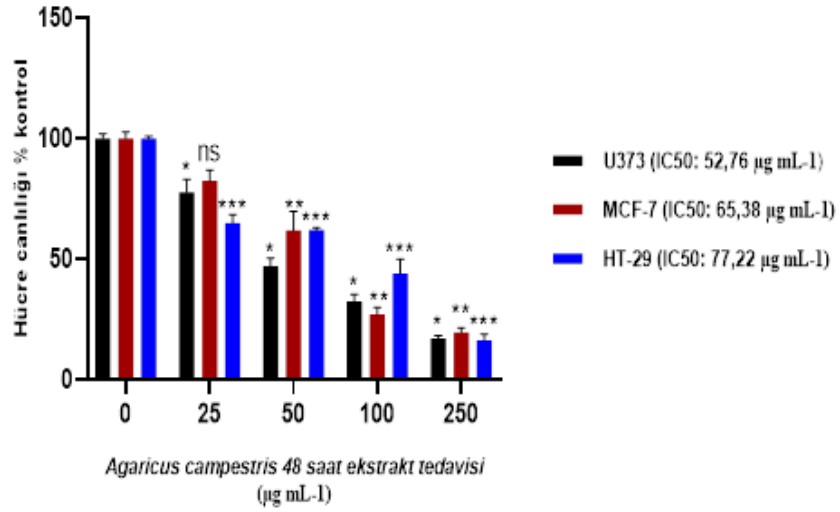
pankreas kanserinin tedavisi için yararlı olabilecek aktif bileşiklerin izolasyonu için potansiyel bir aday olduğu bildirilmiştir (Matsushita ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar, *A. brasiliensis* ve *A. blazei* türlerinden elde edilen mantar ekstraktlarının oral kanser, hepatoselüler karsinom ve osteosarkom hücre tiplerine karşı çeşitli konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermiştir (Fan ve ark., 2011; Su ve ark., 2011). Diğer *Agaricus* cinsi mantarların antiproliferatif etkilerini ortaya koyan birçok çalışma olmasına rağmen, *A. campestris* türünün antiproliferatif etkisi hala belirsizliğini korumaktadır. Bu amaçla, *A. campestris* metanol ekstraktının doz ve zaman bağımlı olarak ( $0-250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) insan glioma, meme ve kolon kanseri hücre hatları (U373, MCF-7 ve HT-29) üzerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiş ve bulgular Şekil 2’de gösterilmiştir. Artan AC konsantrasyonlara bağlı olarak, 24 ve 48 saatlik tedaviden sonra, WST-1 hücre proliferasyon deneyi ile hücrelerin kontrol grubuna göre canlılık yüzdesi belirlendi.  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik AC tedavisinin, 24 saatlik tedavide U373 ve MCF-7 hatlarında hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalttığı, ancak U373 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığındaki azalmanın aynı konsantrasyonda 48 saatlik tedavide daha zayıf olduğu belirlenmiştir. AC tedavisinin, U373, MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarındaki  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için WST-1 hücre canlılığı sonuçları GraphPad Prism 8 programı kullanılarak analiz edildi. AC için  $IC_{50}$  değerleri 24 saatlik tedavide U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde sırasıyla 137.36, 175.19 ve  $52.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır. Öte yandan aynı dozlarda 48 saatlik tedavi sonucunda  $IC_{50}$  değerleri U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde sırasıyla 52.76, 65.38 ve  $77.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, AC ile 48 saatlik tedavinin  $IC_{50}$  değerlerini 24 saatlik tedaviye kıyasla U373 ve MCF-7 hücrelerinde yarıdan daha fazla azalttığını göstermektedir. Ancak 24 saatlik tedavide en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip olan HT-29 hücre hattında bu durumun tam aksi olarak arttığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız, *A. campestris* metanol ekstraktının, U373, MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarına karşı doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 2).

## A





## B



**Şekil 2.** *A. campestris* metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 24 (A) ve 48 (B) saatlik inkübasyon süresinde U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerin canlılığı üzerine etkisi (kontrol grubuna göre; \* $p < 0.05$  U373 hücre hattı için, \*\* $p < 0.05$  MCF-7 hücre hattı için, \*\*\* $p < 0.05$  HT-29 hücre hattı için, ns; fark istatistiksel olarak anlamlı değil).

## SONUÇ

Bu çalışmada, *A. campestris* türünün yağ asidi kompozisyonu, antioksidan ve antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Toplam yağ asidi içeriğinin, insan diyetinde önemli bir yere sahip olan doymamış yağ asidi bakımından zengin olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca, *A. campestris* metanol ekstraktının önemli bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve U373, MCF-7 ve HT-29 kanser hücre hatlarına karşı doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Mevcut sonuçlar, yenilebilir bir mantar olan *A. campestris* türünün yağ asitleri bakımından zengin olmasının yanı sıra, antioksidan ve antiproliferatif özellikler sergilediğini de göstermektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Akata I, Ergonul B, Kalyoncu F, 2012. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8(2): 134-138.
- Akata I, Zengin G, Picot CMN, Mahomoodally MF, 2019. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. *South African Journal of Botany*, 120: 95-99.
- Alves M, CFR Ferreira I, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M, 2013. A Review on Antifungal Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21): 2648-2659.
- Blois MS, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617): 1199-1200.
- Brinkman MT, Karagas MR, Zens MS, Schned AR, Reulen RC, Zeegers MP, 2011. Intake of  $\alpha$ -linolenic acid and other fatty acids in relation to the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire case-control study. *British journal of nutrition*, 106(7): 1070-1077.

- Chajès V, Sattler W, Stranzl A, Kostner GM, 1995. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: Relationship to peroxides and Vitamin-E. *Breast Cancer Res Treat*, 34:199–212.
- Chamberland JP, Moon HS, 2015. Down-regulation of malignant potential by alpha linolenic acid in human and mouse colon cancer cells. *Familial Cancer*, 14(1): 25-30.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM, 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315(161):69-77.
- Dubey SK, Chaturvedi VK, Mishra D, Bajpey A, Tiwari A, Singh M P, 2019. Role of edible mushroom as a potent therapeutics for the diabetes and obesity. *3 Biotech*, 9(12): 450.
- Erdogan MK, Gecibesler IH, Behcet L, 2020a. Chemical constituents, antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of a new endemic Boraginaceae species: *Paracaryum bingoelianum*. *Results in Chemistry*, 2: 247-256.
- Erdogan MK, Agca CA, Gecibesler IH, 2020b. The antiproliferative potential of isolated emodin and aloe-emodin from *Rheum ribes* on different cancer cell lines. *Biological Diversity and Conservation*, 13(2): 159-167.
- Fan MJ, Lin YC, Shih HD, Yang JS, Liu KC, Yang ST, Chung JG, 2011. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway. *In vivo*, 25(3), 355-366.
- Gecibesler IH, Behcet L, Erdogan MK, Askin H, 2017. Antioxidant potencies and chemical compositions of essential oils of two endemic species grow in Turkey: *Astragalus ocephalus* subsp. *stachyophorus* and *Astragalus sericans*. *Progress in Nutrition*, 19: 60-67.
- Gecibesler IH, Demirtas I, Behcet L, 2018. Influence of Altitude on Chemical Variability of Volatile Profile for Endemic *Diplotaenia bingolensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(3): 579-580.
- Glamočlija J, Stojković D, Nikolić M, Ćirić A, Reis FS, Barros L, Soković M, 2015. A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. *Food & function*, 6(6): 1900-1910.
- Glumac M, Pejin B, Karaman M, Mojović M, Matavulj M, 2017. Lignicolous fungi hydrodistilled extracts may represent a promising source of natural phenolics. *Natural product research*, 31(1): 104-107.
- Harris IS, DeNicola GM, 2020. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol*. 30:440-451.
- Karaman M, Tesanovic K, Gorjanovic S, Pastor FT, Simonovic M, Glumac M, Pejin B, 2019. Polarography as a technique of choice for the evaluation of total antioxidant activity: The case study of selected *Coprinus Comatus* extracts and quinic acid, their antidiabetic ingredient. *Natural Product Research*, 55:1-6.
- Kaygusuz O, Kaygusuz M, Dodurga Y, 2017. Assessment of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the wild edible mushroom *Agaricus lanipes* (F.H. Møller & Jul. Schäff.) Hlaváček. *Cytotechnology* 69: 135-144.
- Kosanić M, Ranković B, Dašić M, 2012. Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 11(4): 1095.
- Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, Van Griensven L, 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10): 19489-19525.
- Lindequist U, 2013. The merit of medicinal mushrooms from a pharmaceutical point of view. *International journal of medicinal mushrooms*, 15:517–523.
- Liu K, Wang J, Zhao L, Wang Q, 2013. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. *Food and chemical toxicology*, 58: 375-380.
- Liu Q, Zhu M, Geng X, Wang H, Ng TB, 2017. Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the edible mushroom *Oudemansiella radicata*. *Molecules*, 22(2): 234.
- Matsushita Y, Furutani Y, Matsuoka R, Furukawa T, 2018. Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.*, 18(1):319.
- Olcott HS, Einset E, 1958. An antagonistic effect with antioxidants for unsaturated fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 35(4): 159-160.

- Oyaizu M, 1986. Studies on products of browning reaction. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 44(6): 307-315.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, 26(9-10): 1231-1237.
- Su ZY, Tung YC, Hwang LS, Sheen LY, 2011. Blazeispirol A from Agaricus blazei fermentation product induces cell death in human hepatoma Hep 3B cells through caspase-dependent and caspase-independent pathways. Journal of agricultural and food chemistry, 59(9): 5109-5116.
- Suutari M 1995. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (Aspergillus niger, Neurospora crassa, Penicillium chrysogenum, and Trichoderma reesei). Archives of microbiology, 164(3): 212-216.
- Yılmaz N, Solmaz M, Türkekul İ, Elmastaş M, 2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. Food Chemistry, 99(1): 168-174.
- Yin JIE, Becker EM, Andersen ML, Skibsted LH, 2012. Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with  $\alpha$ -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. Food chemistry, 135(4): 2195-2202.