

Determination of anti-cancer and apoptotic effects of *Tricholoma terreum*, *Tricholoma arvernense* and *Tricholoma imbricatum* species

Ali Ozmen
Adnan Menderes University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology
Central Campus, 09010 Efeler Aydın, Turkey
E-mail: aozmen@adu.edu.tr

Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (FEF-12006)

Abstract

Macrofungi has been used for food and therapeutic purposes for centuries. In terms of their medicinal properties, the fungi contain a variety of polysaccharides, polysaccharide-protein complexes and secondary metabolites. The antimicrobial, antioxidant and anticancer effects are associated with these ingredients. As a cancer-associated fungus, *Ganoderma lucidum* is the best known in the world. On the other hand, anticancer activity and contents of many mushrooms were investigated. In the genus *Tricholoma*, *T. matsutake* is well known in Japan. The medicinal properties of this mushroom have been demonstrated. In this study *Tricholoma terreum*, *Tricholoma arvernense* and *Tricholoma imbricatum* from Turkey have been investigated for anticancer activity and apoptotic effects. Derived extracts from collected fungi were tested against HL 60 and MCF-7 human cancer cell lines. Antiproliferative effect were determined by using MTT method and determination of apoptotic cells was performed using Hoechst/Propidium iodide (HO/PI) double staining method. Different extracts from *T.terreum*, *T. arvernense* and *T.imbricatum* species inhibited 50% of the cells in the concentration range of 15-20 mg / ml, especially in the HL-60 leukemia cell line and in apoptosis research with these extracts *T. imbricatum* methanol extract caused about %60 apoptotic cell death at the 40 mg/ml concentration.

Keywords: Apoptosis, *Tricholoma*, Cell culture

DOI: 10.7176/JSTR/5-2-03

Tricholoma terreum, *Tricholoma arvernense* ve *Tricholoma imbricatum* türlerinin antikanser ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi

Özet

Makrofunguslar yüzyıllardan beri besin ve tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar. Tıbbi özellikleri bakımından mantarlar çeşitli polisakkaritler, polisakkarit-protein kompleksleri ve sekonder metabolitler içermektedirler. Antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkileri bu içerikler ile bağdaştırılmıştır. Kanser ile ilişkili mantar olarak Dünya’da en iyi bilinen *Ganoderma lucidum*’dur. Diğer taraftan birçok şapkalı mantarın antikanser aktivitesi ve içerikleri araştırılmıştır. *Tricholoma* cinsinden ise *T. matsutake* Japonya’da çok iyi bilinmektedir. Bu mantarın tıbbi özellikleri ortaya konmuştur. Bu çalışma kapsamında Türkiye’deki bulunan *Tricholoma terreum*, *Tricholoma arvernense* ve *Tricholoma imbricatum* türleri antikanser aktivite ve apoptotik etki bakımından araştırılmıştır. Toplanan mantarlardan elde edilen özütler HL 60 ve MCF-7 insan kanser hücre hatlarına karşı denenmiştir. Bölünmeyi inhibe edici etki MTT yöntemi ve apoptotik hücrelerin belirlenmesi Hoechst/Propidium iodide (HO/PI) ikili boyama yöntemi kullanılarak yapılmıştır. *T.terreum*, *T. arvernense* ve *T.imbricatum* türlerinden elde edilen farklı özütler özellikle HL-60 lösemi hücre hattında 15-20 mg/ml konsantrasyon aralığında hücrelerin %50’sini inhibe etmiştir. Bu özütler ile yapılan apoptozis araştırmalarında ise *T. imbricatum* metanol özütü 40 mg/ml konsantrasyonda %60’ın üzerinde apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır.

Anahtar kelimeler: Apoptosis, *Tricholoma*, Hücre Kültürü

1. Giriş

Makrofunguslar yüzyıllardan beri besin ve tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar. Günümüzde makrofunguslar ile birçok bilim dalı değişik araştırmalar yapmaktadır. Başta ziraat olmak üzere biyoloji, gıda, eczacılık, çevre ve tıp bilim dallarında makrofunguslar ile çalışmalar yapılmakta ve yeni çalışmalar planlanmaktadır. En iyi bilinen tıbbi özelliklere sahip mantar olan *Ganoderma lucidum* (Reishi, Ling Zhi) Orta Asya'da 2000 yıldan daha uzun zamandır bilinmekte ve Çin'de ölümsüzlük mantarı olarak anılmaktadır. Uzak Doğu kültüründe yemek ve ilaç olarak kullanılan makrofunguslar üzerine yapılan çalışmalar günümüzde artarak devam etmektedir. Makrofungusların taşıdığı oldukları tıbbi özellikler üzerine yapılan çalışmalar bazı genel başlıklar altında toplanabilir. Bunlar kan basıncı kontrolü, anti-tümör özellik, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, antimikrobiyal etki, antibiyotik etki, antioksidan özellik, anti-diabetik etki, anti-HIV aktivite, anti-obesitik aktivite, anti-viral etki ve anti-aging etki şeklinde sayılabilir.

Mantarlar besin değerleri ve tıbbi özelliklerinden dolayı insanlar tarafından yaygın olarak tüketilmektedir. Bu mantarlar antioksidan ve antimikrobiyal özellik göstermektedirler. Ayrıca antikanser ve vücut savunma sistemi açısından zengin kaynaklar teşkil etmektedirler (Ganeshpurkar vd., 2010). Bu bakımdan mantarlardan elde edilen yeni kimyasallar çok daha önemli olacaklardır.

Antioksidan aktiviteye sahip doğal ürünler Reaktif Oksijen Türlerine karşı savunma mekanizmasını arttırmalar. Bu açıdan beslenmede antioksidanların tüketilmesi oksidatif hasarı azaltmaktadır. Birçok mantar türü araştırmacılar tarafından antioksidan içerik bakımından ele alınmıştır ve antioksidan bileşikler tanımlanmıştır. Bunlar fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidlerdir (Ferreira vd., 2009). Doğada yetişen mantarlar insan sağlığını desteklemek açısından beslenmede kullanılmalıdır.

Breene (1990) birkaç mantar türünün ya da ekstraktlarının antitümör aktivitesinin olduğunu bildirmiştir. Bu türler: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Collybia confluens*, *Coriolus versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Tremella fuciformis*, *Tricholoma matsutake* ve *Volvariella volvacea*.

Bu çalışma kapsamında araştırılmış olan *Tricholoma* mantarları ile ilgili ilk yazılı bilgilere çok eski çağlardan beri bu mantar grubuna önem veren Japonya'da rastlanılmaktadır. Milattan sonra 759 yıllarında yazılmış bir şiirde *Tricholoma* mantarlarının (Japonya'daki ismi "Matsutake") önemli ve insan sağlığı açısından faydalı bir gıda maddesi olduğundan övülerek bahsedilmektedir (Hosford vd., 1997).

Literatür incelendiğinde *Tricholoma* türlerinin etkinliğini ortaya koyabilecek çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar özellikle antioksidan ve antitümör kapsamında yer almaktadır. Mantarların genel anlamda antioksidan bileşikler içerdikleri günümüzde artık bilinmekle beraber bu konuda yeni ve daha etkili bileşikler veya antioksidan kapasitesi daha yüksek mantarlar belirlemek için çalışmalar sürdürülmektedir. Literatüre bakıldığında; *T. mongolicum*'dan elde edilen polisakkaritlerin iyi düzeyde antioksidan kapasitelerinin olduğu bildirilmiştir (You vd., 2014). Bir başka tür olan *T. crassum* türünün sıcak su özütünden izole edilen bir glukanın yapısı aydınlatılmış ve hücrelerde biyolojik olarak oksidatif strese neden olan lipid peroksidasyonunu iyi düzeyde inhibe ettiği bulunmuştur (Samanta vd., 2013). *T. lobayense* mantarından elde edilen polisakkaritlerin güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur (Wang vd., 2012). *T. matsutake* çeşitli fenolikler, flavonoidler, alkaloidler, steroidler ve steroller içermektedir. Antioksidan kapasite ve fenolik-flavonoid içeriği bakımından mantarların etkinliği ortaya konulmuştur (Lim vd., 2007).

Diğer taraftan *Tricholoma* türlerinden bazı polisakkarit peptid kompleksleri elde edilmiştir ve bunların özellikle fare tümörlerindeki etkinlikleri çalışılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesinde elde edilen bu tip bir kompleksin immün sisteme ait T-hücrelerini uyarak tümöre karşı bir immün düzenleme sağladığı ve yine farelerde Sarkoma 180 hücrelerini inhibe ettiği bulunmuştur (Wang vd., 1995). *T. giganteum* mantarı yenilebilir büyük bir mantardır. Bu mantarın meyvesinden 4 farklı polisakkarit izole edilmiş ve farelere aktarılan Sarkoma 180 tümörüne karşı denenmiştir. Burada çeşitli fraksiyonların farelerde oluşan tümörlerde gerileme sağladığı gösterilmiştir (Mizuno vd., 1995). *T. mongolicum*'un misel kültürlerinden yeni bir polisakkarit-peptid kompleksi izole edilmiştir. Bu kompleks farelere implante edilen Sarkoma 180 hücrelerinin bölünmelerini inhibe etmiştir (Wang vd., 1996). *T. lobayense* mantarından elde edilen bir polisakkarit-protein kompleksi farelerde antitümör aktivite göstermiştir. Bunun dışında HL-60, PU 5-1.8 ve H3B tümör hücrelerine karşı 30-60 µg/ml aralığında sitotoksik bulunmuştur (Liu vd., 1996). *T. mongolicum*'dan elde edilen 2 adet lektin çeşitli fare tümör hücre hatlarında antitümöral aktivite göstermiştir (Wang vd., 1995, Li vd., 2008). Başka çalışmalar elde edilen bu lektinlerin aynı zamanda farelerde oluşan tümörleri inhibe ettiğini göstererek antiproliferatif aktivitelerini desteklemektedir (Pena vd., 2009). Yapılan çalışmalar mantar özütlerinin ras aracılığıyla yürütülen sinyalizasyon yolunu etkiledikleri ve antikanser etkilerini bu şekilde gösterdikleri sonucuna varılmıştır (Hsiao vd., 2004). Yenilebilir bir mantar olan *T. mongolicum* mantarından yeni bir lakkaz izole edilip kanser hücrelerine karşı etkinliği çalışılmıştır. Karaciğer (HepG2) ve Meme (MCF-7) kanserlerinin hücre

hatlarına karşı 0,3-5 µM aralığında denenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak hücreleri %8-92 aralığında öldürürken normal insan epitelyum hücrelerine (WRL-68) karşı 1mM konsantrasyonun üzerinde bile etkili olmamıştır (Miao vd., 2010). *T. matsutake* metanol özütünün HSC-2 insan oral kanserindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada mantar özütünün hücrelerin bölünmesini inhibe ettiği ve apoptozisi uyardığı bulunmuştur (Shin vd., 2012). *T. giganteum*'dan elde edilen %80'lik etanol özütünün Erlih asit tümörüne karşı etkinliği çalışılmıştır (Chatterjee vd., 2013). *T. matsutake*'den elde edilen polisakkaritlerin antitümör aktiviteleri HepG2 (Karaciğer) ve A549 (Akciğer) kanser hücre hatları kullanılarak MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada izole edilen polisakkaritlerden bir tanesinin hem antioksidan kapasitesi hem de her iki hücre hattına karşı etkinliği oldukça yüksek bulunmuştur (You vd., 2013). *T. terreum* isimli mantarın meyvelerinden "terreumols" diye adlandırılan 4 adet yeni terpenoid elde edilmiştir. Bunların sitotoksik aktiviteleri 5 adet insan kanser hücre hattında çalışılmıştır ve etkileri cisplatin isimli kemoterapik ajan ile karşılaştırılmıştır. Özellikle akciğer, meme ve kolon kanseri hücrelerinde pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin kadar etkili bulunmuştur (Yin vd., 2013). Yapılan bu çalışma kapsamında Türkiye'den toplanmış olan *Tricholoma terreum*, *Tricholoma arvernense* ve *Tricholoma imbricatum* türlerinin kanser hücre hatları üzerindeki durdurucu ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. *Tricholoma* türlerinden ekstraktlar elde edilip HL-60 ve MCF-7 hücre hatlarına uygulanmıştır. Bunların antiproliferatif etkinliği ve apoptotik potansiyelleri ortaya konmuştur.

2- Materyal ve Yöntem

2.1-Mantarların toplanması

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen mantarlar Çizelge 1.'de belirtilen tarihlerde belirtilen yerlerden Prof. Dr. Mesut KIRMACI ile birlikte toplanmıştır ve araziden geldikten hemen sonra Prof. Dr. Mesut KIRMACI tarafından tayin edilmiştir. Daha sonra dinlendirilmiş çeşme suyu ile yıkanarak paketlenmiş ve denemeler yapılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 1. Mantarlara ilişkin lokaliteler ve toplanma tarihleri

Takson adı	Toplanma tarihi	Buldukları yer
<i>Tricholoma terreum</i> Syn: <i>Tricholoma myomyces</i>	Mayıs-Ekim	KONYA-BOZKIR Sorkun-Dere yol kenarı, 1280 m DENİZLİ-ÇAMELİ , Bıçakçı köyü, çam ormanı
<i>Tricholoma arvernense</i>	Ekim	DENİZLİ-ÇAMELİ , Sofular köyü, çam ormanı
<i>Tricholoma imbricatum</i>	Ekim	ANTALYA-Akseki , zamona mevkii, çam ormanı 1500 m

2.2-Mantarlardan ekstraktların elde edilmesi

Ekstraksiyon için Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol kullanılmıştır. -80 °C'de dondurulmuş olan materyal liyofilizatör yardımı ile kurutulmuştur. Mantarların liyofilizasyon öncesi yaş ağırlıkları ve liyofilizasyon sonrası kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her bir mantarın kuru örneklerinden 10 gr alınarak sokslet, çalkalayıcı ve evaporatör yardımıyla; Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Ekstraksiyon için kullanılmış olan bu çözücüler polarite özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Mantar ekstraktları sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere %100 etanol içerisinde çözdürülmüştür. Bu aşamadaki çalışmalar; -80 °C'den çıkarılan ekstraktların aktivitelerinin kaybolmasını engellemek amacıyla buz üzerinde yapılmıştır. Ekstraktların üzerine bir defada 500 µl olmak üzere etanol ilavesi yapılmış ve her ilaveden sonra sonikatör yardımı ile ekstraktlar çözdürülmüştür. Ekstraktları çözmek için kullanılacak olan maksimum etanol miktarı HL-60 hücreleri ile bir ön deneme yapılarak belirlenmiştir. Bu ön denemeye ilişkin sonuçlara göre esas denemede kullanılacak alkol konsantrasyonunun maksimum %0,12 - %0,46 değerleri arasında kalması gerektiği belirlenmiştir. Daha yüksek miktarlarda alkol kullanıldığında hücrelerin normal çoğalmaları etkilenmektedir.

Kullanılan çözücü miktarlarına bağlı olarak elde edilen çözünmüş mantar ekstraktlarının yoğunluğu, kuru ağırlık göz önünde bulundurularak g/ml cinsinden stok değer olarak hesaplanmıştır. Her mantar türünden 10 gr kuru ağırlık kullanılmış olması nedeniyle 10 gr/ml stok çözeltiler elde edilmiştir. Sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere çözünmüş ekstraktlar soğutuculu santrifüjde +4 °C'de, 12.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Buradan elde edilen süpernatantlar başka bir tüpe aktararak geriye kalan pelletler de -80 °C'de saklanmıştır. Sitotoksik değerlendirmede süpernatantlar kullanılmıştır.

2.3-Hücre kültürü

2.3.1-Hücrelerin ve kültür ortamlarının temini

HL-60 ve MCF-7 hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection; ATCC)'den alınmıştır ve GIBCO (Invitrogen Co.)'nun standart hücre kültürü ortamlarında büyütülmüştür. Kültür ortamına yapılan ilaveler de (Fetal Calf Serum, L-Glutamin, Streptomisin-Pensilin, Non essential aminoasitler) GIBCO'dan alınmıştır. Apoptotik etkiyi belirlemek için Hoechst 33258 ve Propidium Iodide SIGMA (Sigma-Aldrich Co.)'dan alınmıştır.

2.3.2-Hücrelerin çoğaltılması ve ekstrakt uygulamaları

Hücreler ml'de 10.000-100.000 hücre aralığında kültür şişesinde çoğaltılmış ve mantar ekstraktları artan konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat olmak üzere uygulanmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarındaki canlı hücreler MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Çözeltinin ölçümü spektrofotometre ile 590 nm dalga boyunda yapılmıştır.

2.3.3-Bölünen hücre oranının hesaplanması

$$[(C_{72h+ekstrakt} - C_{24h+ekstrakt}) / (C_{72h-ekstrakt} - C_{24h-ekstrakt})] \times 100 = \% \text{ bölünen hücre}$$

$C_{72h+ekstrakt}$: uygulamadan 72 saat sonraki canlı hücre ölçümü

$C_{24h+ekstrakt}$: uygulamadan 24 saat sonraki canlı hücre ölçümü

$C_{72h-ekstrakt}$: ekstrakt uygulaması olmadan 72 saat sonraki canlı hücre ölçümü

$C_{24h-ekstrakt}$: ekstrakt uygulaması olmadan 24 saat sonraki canlı hücre ölçümü

Ham veriler ilgili çizelgeden excel dosyasına aktarılıp bölünen hücre oranının hesaplanması yukarıdaki formüller ile yapılmıştır. Bütün denemeler 3 tekrarlı yapılmıştır.

2.4-Apoptozis ve Nekrozis yöntemi

Apoptotik ve nekrotik etkiyi belirlemek için; hücreler kültür şişelerinde düşük yoğunlukta çoğaltılmıştır ve bölünmeyi engelleyici aktivite verilerine göre etkili bulunan seçilmiş mantar ekstraktlarının etkili konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücreler HO/PI (Hoechst 33258 / Propidium Iodide) yöntemiyle boyanarak apoptotik ve nekrotik etki gösteren ekstraktlar belirlenmiştir (Grusch, vd, 2002, Huettenbrenner, vd.,2003). Ekstrakt uygulaması sonucunda hücreler mikroskop altında gözlemlenmiş ve sayılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslamalı olarak grafikler hazırlanıp sunulmuştur. Apoptozis ve nekrozis oranları kontrol grubundaki sayılarına karşılık uygulama gruplarında % artış (%kontrol) olarak ifade edilmiştir.

2.5- İstatistiki değerlendirme

GraphPad 4.0 analiz programı ile kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar standart hataları içeren grafiklere aktarılmıştır. Kontrol grubundaki canlı hücreler ile uygulama gruplarındaki canlı hücreler ayrı sütunlarda gösterilmiş ve 3'lü tekrarlar halinde elde edilen verilerdeki standart hatalar hesaplanmıştır.

3-Bulgular

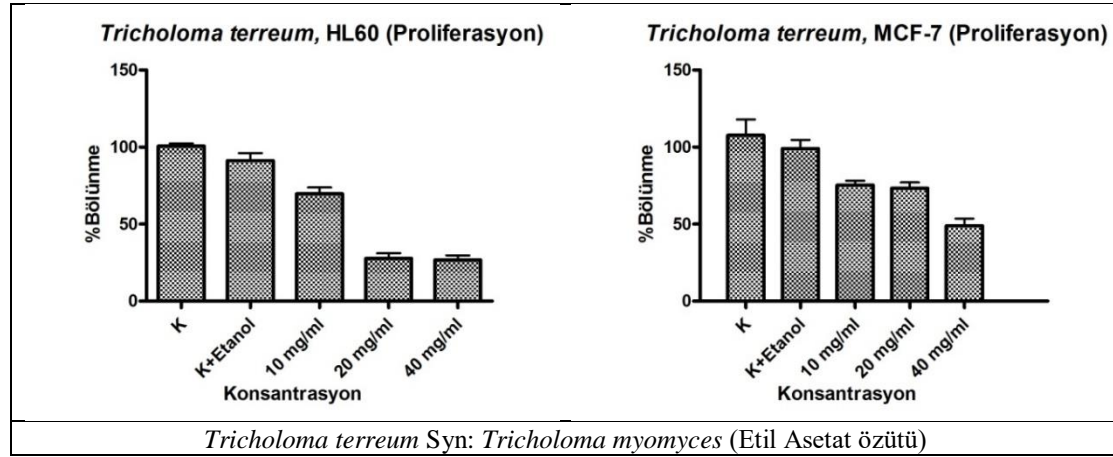
Çalışma 3 temel aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar; materyalin toplanması ve ekstraksiyonu, bölünmeyi engelleyici aktivitenin belirlenmesi ve apoptotik etkinin belirlenmesi aşamalarıdır. Bu kapsamda toplanan mantarlardan özütler elde edilmiştir. Devamında, bölünmeyi engelleyici aktiviteler HL-60 insan lösemi hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak belirlenmiştir ve etkili özüt tiplerinin hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonları seçilmiştir. Seçilen özütler ile apoptotik etkiler belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular yukarıda belirtilen sıralamaya göre aşağıda sunulmaktadır.

3.1- Bölünmeyi engelleyici aktivite bulguları

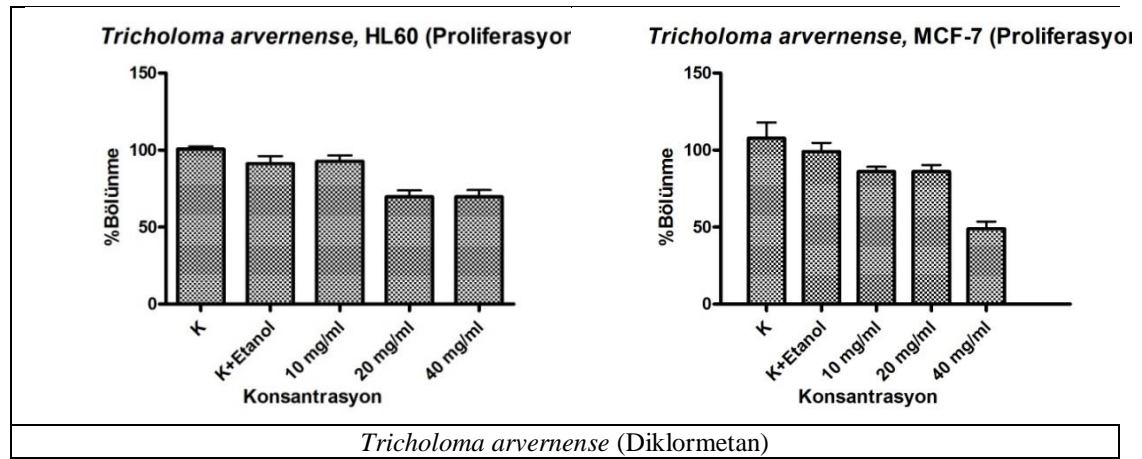
HL-60 ve MCF-7 hücreleri yöntemde de belirtildiği gibi ml'de 10.000-100.000 hücre olacak şekilde kültür şişesinde çoğaltılmıştır ve mantar ekstraktları artan konsantrasyonlarda (10, 20 ve 40 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat olmak üzere her iki hücre hattına uygulanmıştır. Daha sonra canlı hücreler MTT yöntemi ile incelenerek hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (I_pC_{50}) belirlenmiştir. Denemeler sonucu elde edilen etkili ekstrakt tiplerine ait proliferasyon verileri Şekil 1'de her bir tür için (a-c) sütun grafikler şeklinde sunulmuştur. Her bir türün bölünmeyi engelleyici aktivitesi ile ilgili bulgular Şekillerin altında

açıklama olarak verilmiştir. Proliferasyon çalışmaları aşamasında bu mantarlara ait etkili özüt tipleri belirlenmiştir. Bu aşamada yapılan çalışma ile apoptozis denemelerinde kullanılacak olan özüt tipleri ve konsantrasyonları kararlaştırılmıştır. Apoptozis denemelerine ilişkin veriler Şekil 2’de yer almaktadır.

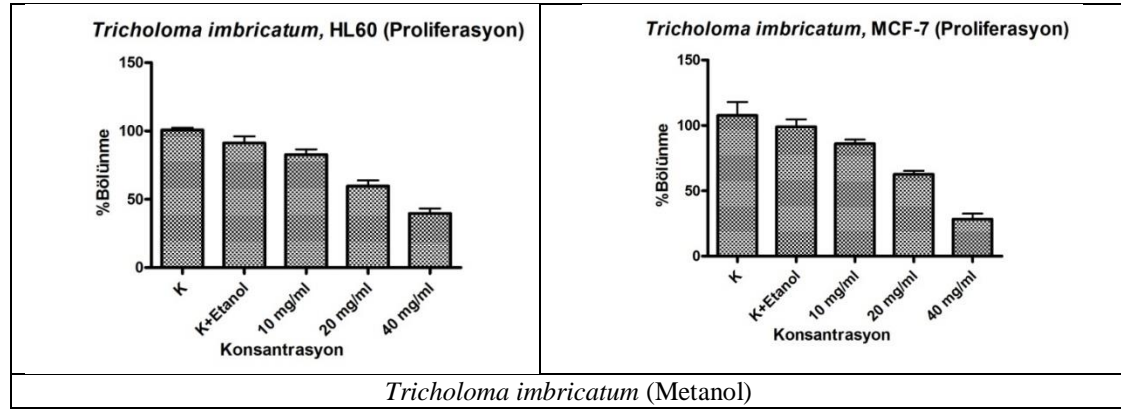
Şekil 1. Mantarlardan elde edilen etkili özütlerin artan konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda elde edilen proliferasyon verileri



Şekil 1a- *Tricholoma terreum* Syn: *Tricholoma myomyces* mantarına ait özütler artan konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücre hatlarına uygulanmıştır. 10-40 mg/ml aralığında denenmiş olan farklı özüt tiplerinden etil asetat özellikle HL-60 hücre hattına karşı iyi düzeyde etkili bulunmuştur. Burada etil asetat özütünün HL-60 hücre hattındaki $I_{pC_{50}}$ değeri yaklaşık 15 mg/ml olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre hattında bu değer ancak 40 mg/ml konsantrasyonda yakalanmıştır. Bu mantara ait etil asetat özütü HL-60 hücre hattında daha etkili bulunmuştur.

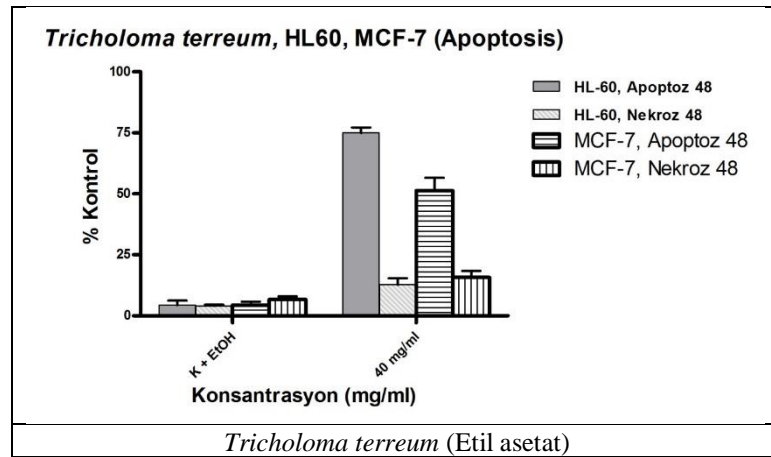


Şekil 1b- *Tricholoma arvernense* mantarına ait özütler artan konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücre hatlarına uygulanmıştır. 10-40 mg/ml aralığında denenmiş olan farklı özüt tiplerinden diklormetan sadece MCF-7 hücre hattına karşı düşük düzeyde etkili bulunmuştur. Burada diklormetan özütünün MCF-7 hücre hattındaki $I_{pC_{50}}$ değeri 40 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Şekilden de anlaşılacağı üzere bu mantardan elde edilen özütler uygun konsantrasyonlarda etkili bulunmamıştır.

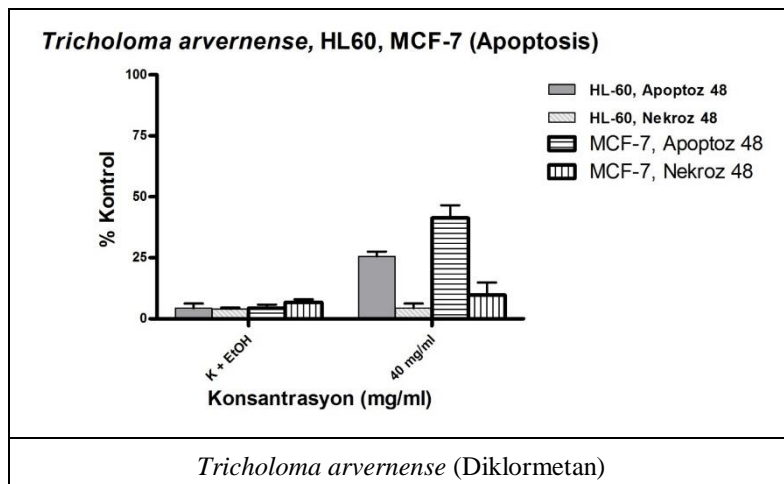


Şekil 1c- *Tricholoma imbricatum* mantarına ait özütler artan konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücre hatlarına uygulanmıştır. 10-40 mg/ml aralığında denenmiş olan farklı özüt tiplerinden metanol her iki hücre hattına karşı 20-40 mg/ml aralığında etkili bulunmuştur. Burada metanol özütünün HL-60 hücre hattındaki I_{pC50} değeri yaklaşık 30 mg/ml olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre hattında da bu değer yaklaşık 30 mg/ml olarak belirlenmiştir.

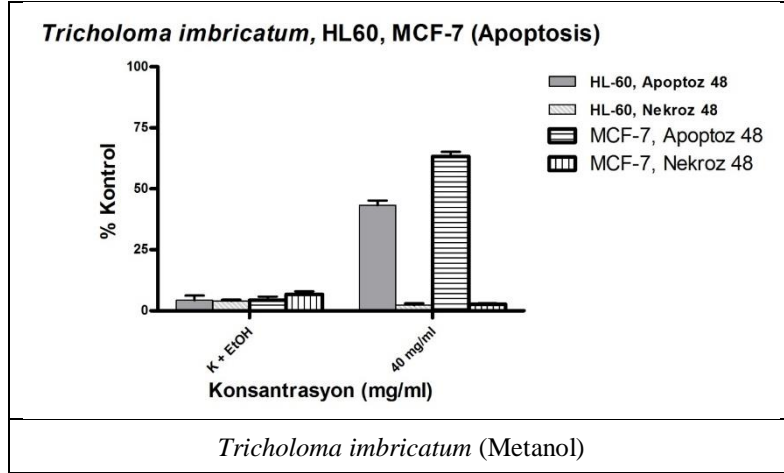
Şekil 2. Seçilen özütlerin etkili konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen apoptozis verileri



Şekil 2a- *Tricholoma terreum* mantarına ait seçilen etil asetat özütü 40 mg/ml konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Bu özüt tipinin 48 saatlik apoptotik etkisi HO/PI boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre nekrotik etki ile birlikte 48 saat apoptozis verileri özellikle HL-60 hücre hattında yüksek bulunmuştur.



Şekil 2b- *Tricholoma arvernense* mantarına ait seçilen diklormetan özüt tipi 40 mg/ml konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Bu özüt tipinin 48 saatlik apoptotik etkisi HO/PI boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda MCF-7 hücre hattında nekrotik hücreler ile birlikte çok iyi sayılamayacak düzeyde apoptotik hücre gözlenmiştir.



Şekil 2c- *Tricholoma imbricatum* mantarına ait seçilen metanol özüt tipi 40 mg/ml konsantrasyonda HL-60 ve MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Bu özüt tipinin 48 saatlik apoptotik etkisi HO/PI boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda her iki hücre hattında çok az miktarda nekrotik hücrenin yanında kontrole göre %50-60 aralığında apoptotik hücrelerin arttığı gözlenmiştir.

3.2- Apoptozis yöntemine ilişkin bulgular

Apoptotik ve nekrotik etkiyi belirlemek için; HL-60 ve MCF-7 hücreleri kültür şişelerinde düşük yoğunlukta çoğaltılmıştır ve bölünmeyi engelleyici aktivite verilerine göre etkili bulunan seçilmiş mantar ekstraktlarının etkili konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, HL-60 ve MCF-7 hücreleri 10.000-100.000/ml yoğunluk aralığında well-platelere aktarılmıştır. Daha sonra seçilen özüt tipleri 40 mg/ml konsantrasyonda 48 süre ile hücre kültürü ortamına uygulanmıştır. Yapılan sayımlar ve analizler neticesinde Şekil 2'de (a-c) verilen bulgular elde edilmiştir.

Bu veriler değerlendirildiğinde en iyi apoptotik etki *T. terreum* ve *T. imbricatum* mantarlarında gözlenmiştir. *T. terreum* etil asetat ve *T. imbricatum* metanol özütleri yüksek düzeyde apoptozise yol açmışlardır (Şekil 2a, 2c). *T. terreum* HL-60 hücre hattına karşı daha etkili bulunmuşken *T. imbricatum* MCF-7 hücre hattına karşı etkilidir. Ancak *T. terreum* etil asetat özütü uygulamasında apoptotik hücrelerin yanı sıra nekrotik hücreler de gözlenmiştir (Şekil 2a). Bu nedenle bu çalışma kapsamında en etkili bulunan mantar ve özüt tipi; *T. imbricatum*-metanol olarak belirlenmiştir.

4-Tartışma ve Sonuç

Kanserin bazı bileşikler kullanarak önlenmesi oldukça zor görünmektedir. Bu tip bileşiklerin kanserleşme sürecindeki değişiklikleri durdurması veya geri döndürmesi beklenmektedir. Günümüzde birçok yeni teknik kansere karşı aktif olabilecek yeni bileşiklerin moleküler ve biyokimyasal seviyede taranmasına olanak sağlamaktadır. Bu zamana kadar bu çalışmalar sayesinde çok sayıda yeni antikanser bileşik elde edilmiştir. Diğer taraftan tümör oluşumu ve metastazın moleküler temelleri ile ilgili ayrıntılı bilgi birikiminin yanı sıra çeşitli canlı gruplarında doğal olarak bulunan doğal bileşiklerin de bilinmesi kansere yol açan anormal moleküler ve biyokimyasal sinyalleri hedef alacak yeni ilaçların veya etken maddelerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Bu bakımdan çalışmam kapsamında ele alınan canlı grubu mantarlarla ilgili de çalışma ve bilgi birikimi bulunmaktadır. İnsanlar mantarları, mantar özütlerini veya mantarlardan elde edilen çeşitli ürünleri vücut savunma sisteminin ve insan sağlığının desteklenmesi amacıyla gıda takviyesi olarak veya beslenmelerinde kullandıkları görülmüştür. Mantarların antitümör aktivitesinin belirlenmesine yönelik araştırmalar mevcut olmakla birlikte bu çalışmalar mantarlarda bulunma olasılığı yüksek olan biyolojik olarak aktif birçok bileşiğin ortaya çıkarılmasını sağlayacaktır.

Son on yıl boyunca bu çalışma kapsamında da değerlendirilmiş olan *Tricholoma* genusuna ait farklı

türlerden elde edilen mantar özütlerinin antiproliferatif aktiviteleri gösterilmiştir. Çalışmam kapsamında elde ettiğim veriler bu çalışmaların ışığında aşağıda ele alınmıştır.

Tricholoma türlerinden; başlangıçta bazı polisakkaritler veya polisakkarit-peptit kompleksleri elde edilmiştir ve bunların özellikle fare tümörlerindeki etkinlikleri çalışılmıştır. Bu çalışmalar *in vivo* olarak yürütülmüştür. Farelerde oluşturulan Sarkoma 180 tümörüne karşılık Tricholoma cinsi mantarların özütleri araştırılmıştır. *T. lobayense*, *T. mongolicum* ve *T. giganteum* mantarlarından elde edilen polisakkaritlerin ve/veya polisakkarit protein komplekslerinin farelerde bu tümör oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Mizuno vd., 1995, Wang vd., 1996, Liu vd., 1996). Sadece polisakkaritler ve protein kompleksleri değil aynı zamanda bazı Tricholoma türlerinden elde edilen lektinlerin de fare tümörleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 1995, Li vd., 2008, Pena vd., 2009).

Devamında *T. lobayense* mantarına ait polisakkaritler veya polisakkarit-peptit komplekslerinin ras aracılığıyla yürütülen sinyalizasyon yolunu etkiledikleri ve antikanser etkilerini bu şekilde gösterdikleri sonucuna varılmıştır (Hsiao vd., 2004). Ras protein ailesi hücre biyolojisinin her alanında son derece kritik roller üstlenerek, hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, hücre içi protein trafiğini (taşınmasını), hücre iskeletinin organizasyonunu, büyüme faktörü sinyal iletimini ve gen ifadesini düzenlemektedir. Bu bakımdan ras onkoproteininin düzenlenmesi kanserdeki önemli hedeflerden bir tanesidir.

T. mongolicum 'dan elde edilen yeni bir lakkaz karaciğer (HepG2) ve meme (MCF-7) kanserlerinin hücre hatlarına karşı 0,3-5 µM aralığında hücrelerin bölünmelerini %8-92 aralığında inhibe etmiştir (Miao vd., 2010). *T. equestre*'den elde edilen "flavomannin-6,6-dimethylether" bileşiği insan kolon kanseri hücreleri Caco-2 hücrelerinin bölünmelerini 90-112 g/ml konsantrasyon aralığında %50-80 düzeylerinde inhibe etmiştir. Bu bileşik etkisini sitostatik olarak göstermiştir ve hücreleri G0/G1 fazında tutmuştur (Pena vd., 2009). *T. matsutake*'den elde edilen polisakkaritler ise HepG2 (Karaciğer) ve A549 (Akciğer) kanser hücre hatlarını inhibe etmiştir (You vd., 2013). *T. terreum* isimli mantarın meyvelerinden "terreumols" diye adlandırılan 4 adet yeni terpenoid elde edilmiştir. Bunların sitotoksik aktiviteleri 5 adet insan kanser hücre hattında çalışılmıştır ve etkileri cisplatin isimli kemoterapik ajan ile karşılaştırılmıştır. MCF-7 meme, SMMC-7721 karaciğer, HL-60 miyeloid lösemi, SW-480 kolon ve A-549 akciğer kanserlerine ait hücre hatları üzerinde 0,0625 – 40 µM aralığında özellikle akciğer, meme ve kolon kanseri hücrelerinde pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin kadar etkili bulunmuşlardır (Yin vd., 2013). Yapılan bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere Tricholoma türleri hücre döngüsünü baskılayabilecek bazı bileşikler içermektedirler ve bu bileşiklerden bazıları da bilinen kemoterapik ajanlar ile yarışabilecek potansiyel antikanser aktiviteye sahiptirler. Etkilerini ise hücre döngüsünü durdurarak ortaya koymaktadırlar. Kontrolsüz veya durdurulamayan hücre döngüsünün kanser ile mücadele direkt hedef olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu mantarların önemli aktif bileşikler içerdikleri görülmektedir. Özellikle *T. terreum* isimli türden elde edilen terpenoidler iyi düzeyde aktivite göstermişlerdir ve bu çalışma kapsamında değerlendirilen HL-60 ve MCF-7 hücre hatları ortak olarak kullanılmıştır. Yin vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada terpenoidler 1:1 oranında kloroform:metanol çözücülerini kullanılarak elde edilmiştir. Yani polaritesi yüksek ve düşük çözücüler birlikte kullanılmıştır. Mevcut çalışma kapsamında bakıldığında etkili bulunan özüt tipi etil asetat özütü olmuştur (Şekil 1a). Bu bakımdan ele alındığında etil asetat polar bir çözücü olmakla birlikte dielektrik sabitesi düşüktür. Yani etken bileşikler çok yüksek polaritelerde ortaya çıkmamaktadır. Diğer taraftan verilerimde bu mantarın etil asetat özütünün HL-60 hücre hattında daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak MCF-7 hücre hattında da yüksek konsantrasyonda etkilidir. Yin vd. (2013)'ün yapmış olduğu çalışmada ise elde edilen terpenoidler akciğer, meme ve kolon kanserleri üzerinde etkili bulunmuştur. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda farklı fraksiyonlarda farklı bileşiklerin ortaya çıktığı ve etkinliklerinin değiştiği görülmektedir. Sonuçta bu mantar türünün özüt tipine bağlı olarak elde edilen bileşikler doğrultusunda etken maddeler ihtiva ettiği açıktır.

Araştırmam kapsamında çalıştığım diğer etkili tür *T. imbricatum*'dur. Bu türün metanol özütü etkilidir. *T. imbricatum* her iki hücre hattını da inhibe etmiştir. Metanol özütünün HL-60 hücre hattındaki I_{pC50} değeri yaklaşık 30 mg/ml olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre hattında da bu değer yaklaşık 30 mg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 1c). Literatürde göz önünde bulundurulduğunda proje kapsamında çalışılan mantarların kanser hücrelerine karşı aynı etkinliklere sahip olduğu ve onların bölünmelerini inhibe ettiği düşünülmektedir. Hücre döngüsünü durduracak biyolojik olarak aktif bileşikler içerdikleri sonuçlarla örtüşmektedir.

Apoptozis, çok hücreli bir organizmada embriyonik dönemden yaşlanmaya kadar devam eden süreçte birçok evrede yer alan önemli bir hücre ölüm yolağıdır. Embriyonik dönemde çeşitli yapıların oluşmasında veya DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle enfekte hücrelerin ölümünde temel rol oynar (Vaux ve Korsmeyer, 1999). Diğer bir önemli ölüm tipi olan nekroziste metabolik prosesler çok hızlıdır ve hasar ağırdır; hücre zarının geçirgenliği bozulur, hücre şişer ve zarın patlamasıyla hücre içindeki maddeler dışarı dağılır. Bunun aksine apoptoziste hücre zarının bütünlüğü bozulmaz (Kerr vd., 1980).

Apoptozis; malignant veya kanser hücrelerini normal hücrelerden veya onları çevreleyen dokudan zarar vermeden uzaklaştırır. Apoptozisin çalışmasında aksaklık birçok kanser tipinde yaygındır ve tedaviye karşı dirençlidir. Bu nedenle apoptozis yolları kanser tedavisi için başlıca hedeflerdendir (Reed, 2003). Araştırmam kapsamında çalışılmış olan *Tricholoma* cinsi mantarlardan da apoptotik etki gösteren bileşikler izole edilmiştir. *T. matsutake* metanol özütünün HSC-2 insan oral kanserindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada mantar özütünün hücrelerin bölünmesini inhibe ettiği ve apoptozisi uyardığı bulunmuştur. Apoptotik etki PARP enziminin artışıyla gösterilmiştir ve bunun yanı sıra çekirdek yoğunlaşması ve fragmentasyonu da gözlenmiştir. Uygulanan özüt aynı zamanda Bak proteininin ekspresyonunu arttırmıştır (Shin vd., 2012). Diğer taraftan *T. giganteum*'dan elde edilen %80'lik etanol özütünün Erlich asit tümörüne karşı etkinliği çalışılmıştır. Bu özütün apoptotik etki mekanizması çalışma kapsamında aydınlatılmıştır. Flow sitometre verilerine dayalı olarak uygulama sonucunda hücrelerin G0/G1 evresinde artış gösterdikleri ve G2/M evresinde azaldıkları gözlenmiştir. Bu veriler çalışma kapsamında apoptoze işaret etmektedir. Apoptozisin uyarılmış olabileceği aynı zamanda apoptotik hücrelerin morfolojik özellikleri de göz önünde bulundurularak çekirdek boyaları ile ortaya konmuştur. Çalışmada elde edilen verilere göre pro-apoptotik bir protein olan p53 proteinin seviyesi artış göstermiştir. Tüm bu sonuçlar Erlich asit tümöründe uygulama sonrasında apoptozisi işaret etmektedir. Burada p53 aracılığı ile apoptozis başlatılmıştır ve bir diğer pro-apoptotik gen olan *Bax*'ın ekspresyonunda da artış meydana gelmiştir. Buna karşın anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2'de artış gözlenmemiştir (Chatterjee vd., 2013).

T. equestre'den elde edilen "flavomannin-6,6 -dimethylether" bileşiğinin etki mekanizmasının açıklandığı çalışmada insan kolon kanseri hücreleri Caco-2 kullanılmıştır. Bu bileşik etkisini sitostatik olarak göstermiştir ve hücreleri G0/G1 fazında tutmuştur. Bu veri p27 cdk inhibitör protein seviyelerindeki artış ile desteklenmiştir. Annexin-V ve DNA fragmentasyon verilerine dayalı olarak apoptotik ölümün gerçekleşmediği ortaya konmuştur. Ayrıca genotoksik etkisinin olmadığı da belirtilmiştir (Pena vd., 2009).

Çalışmalardan da görüldüğü üzere aynı cinse ait farklı mantar türlerinin bazıları oldukça iyi düzeyde apoptotik etki gösterirken bir diğeri apoptozis mekanizmasını çalıştıramamaktadır. Araştırmam kapsamında ele alınan türlerin etkili özütleri ile apoptozis denemeleri yapılmıştır ve benzer bir sonuca varılmıştır. Çalışılan türler arasında *T. terreum* ve *T. imbricatum* özütlerinin farklı hücre hatlarında farklı seviyelerde apoptoze yol açtığı görülmektedir. Buna karşın *T. arvernense*'den elde edilen özütün oldukça düşük seviyelerde bu mekanizma üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 2b). *T. terreum* etil asetat özütü uygulamasında apoptotik hücrelerin yanı sıra nekrotik hücrelerde gözlenmiştir ve HL-60 hücre hattında daha etkili bulunmuştur (Şekil 2a). Diğer taraftan *T. imbricatum* metanol özütü MCF-7 hücre hattında apoptozisi %60 seviyesinde uyarmıştır (Şekil 2c). Literatür verilerine de bakıldığında araştırma kapsamında çalışılan farklı mantarların hem hücre hattı düzeyinde hem de apoptozis mekanizmalarını uyarma seviyelerinde farklılıkların olması içerdikleri etken maddeler ile bağlantılı bir sonuçtur.

Araştırma kapsamında çalışılmış olan *T. terreum*, *T. arvernense* ve *T. imbricatum* türlerinden elde edilen farklı özütler her iki hücre hattında 20-40 mg/ml konsantrasyon aralığında hücrelerin %50'sini inhibe etmiştir. Bu özütler ile yapılan apoptozis araştırmalarında ise *T. imbricatum* metanol özütü MCF-7 hücre hattında 40 mg/ml konsantrasyonda %60'ın üzerinde apoptotik hücre ölümüne yol açmıştır. Mevcut literatür incelendiğinde özellikle *T. imbricatum* türünden elde edilen verilerin bilim dünyası için yeni olduğu ve yapılacak olan yeni araştırmalara ışık tutacağı aşikardır.

References

- Breene W.1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. Journal of Food Production, 53: 883-894.
- Chatterjee, S., Biswas, G., Chandra, S., Saha, G.K., Acharya, K. 2013. Apoptogenic effects of *Tricholoma giganteum* on Ehrlich's ascites carcinoma cell. Bioprocess Biosyst Eng., 36:101-107.
- Ferreira, Isabel C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in Wild Mushrooms. Current Medicinal Chemistry, 16(12):1543-1560.
- Ganeshpurkar, A., Rai, G., Jain, A. P. 2010. Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. Pharmacogn Rev., 4(8): 127-135.
- Grusch, M., Polgar, D., Gfatter, S., Leuhuber, K., Huettnerbrenner, S., Leisser, C., Fuhrmann, G., Kassie, F., Steinkellner, H., Smid, K., Peters, G.J., Jayaram, H.N., Klepal, W., Szekeres, T.,

- Knasmüller, S., Krupitza, G. 2002. Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. *Cell Death and Differentiation*, 9:169-78.
- Hosford, D., Pilz, D., Molina, R., Amaranthus, M. 1997. Ecology and management of the commercially harvested american matsutake mushroom. General Technical Report, Portland, United States Department of Agriculture PNW- GTR- 412, 5-7.
- Hsiao, W.L.W., Li, Y.Q., Lee, T.L., Li, N., You, M.M., Chang, S.T. 2004. Medicinal mushroom extracts inhibit ras-induced cell transformation and the inhibitory effect requires the presence of normal cells. *Carcinogenesis*. 25 (7), pp.1177—1183.
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., Krupitza, G. 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research*, 543(3):235-49.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.*, 68:251-306.
- Li, Y.R., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B. 2008. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1780 (1), 51– 57.
- Lim, H.W., Yoon, J.H., Kim, Y.S., Lee, M.W., Park, S.Y., Choi, H.K. 2007. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry*, 103, 1337–1342.
- Liu, F., Ooi, V. E. C., Liu, W. K., Chang, S. T. 1996. Immunomodulation and Antitumor Activity of Polysaccharide-Protein Complex From the Culture Filtrates of a Local Edible Mushroom, *Tricholoma lobayense*. *Gen. Pharmac.* Vol. 27, No. 4, pp. 621-624.
- Miao, L., Zhang, G., Wang, H., Ng, T. 2010. Purification and Characterization of a Laccase from the Edible Wild Mushroom *Tricholoma mongolicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(7), 1069–1076.
- Mizuno, T., Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-active Heteroglycans from Niohshimeji Mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(4), 568-571.
- Pena-P.G., Reyes-Zurita, F.J., Deffieux, G., Azqueta, A., Lopez de Cerain, A., Centelles, J.J., Creppy, E.E., Cascante, M. 2009. Antiproliferative effect of flavomannin-6,6'-dimethylether from *Tricholoma equestre* on Caco-2 cells. *Toxicology*. 264, 192–197.
- Reed, J.J. 2003. *Holland-Frei Cancer Medicine*; Ch 4, Edited by Donald W Kufe, Raphael E Pollock, Ralph R Weichselbaum, MD, Robert C Bast, Jr, Ted S Gansler, James F Holland and Emil Frei, III, 6th ed., BC Decker Inc ISBN: 1-55009-213-8.
- Samanta, S., Maity, K., Nandi, A.K., Sen, I.K., Devi, S.P. Mukherjee, S., Maiti, T.K., Acharya, K., Islam, S.S. 2013. A glucan from an ectomycorrhizal edible mushroom *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc.: isolation, characterization, and biological studies. *Carbohydrate Research*, 367, 33–40.
- Shin, J.A., Kim, J.S., Hong, I.S., Cho, S.D. 2012. Bak is a key molecule in apoptosis induced by methanol extracts of *Codonopsis lanceolata* and *Tricholoma matsutake* in HSC-2 human oral cancer cells. *Oncology Letters*, 4: 1379-1383.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96: 245-254.
- Wang, H. X., Liu, W. K., Ng, T. B., Ooi, V. E. C., Chang, S. T. 1995. Immunomodulatory and Antitumor Activities of a Polysaccharide-Peptide Complex from a Mycelial Culture Of *Tricholoma* Sp., A Local Edible Mushroom. *Life Sciences*, Vol. 57, No. 3, pp. 269-281.

- Wang, H.X., Ng, T.B., Ooi, V.E., Liu, W.K., Chang, S.T. 1996. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities. *Biochem Cell Biol.*, 74(1):95-100.
- Wang, C., Chen, Y., Hu, M., Ding, J., Xu, C., Wang, R. 2012. In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Tricholoma lobayense*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 534– 539.
- Yin, X., Feng, T., Li, Z.H., Dong, Z.J., Li, Y., Liu, J.K. 2013. Highly Oxygenated Meroterpenoids from Fruiting Bodies of the Mushroom *Tricholoma terreum*. *J. Nat. Prod.*, 76, 1365–1368.
- You, L., Gao, Q., Feng, M., Yang, B., Ren, J., Gu, L., Cui, C., Zhao, M. 2013. Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. *Food Chemistry*, 138, 2242–2249.
- You, Q., Yin, X., Zhang, S., Jiang, Z. 2014. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Carbohydrate Polymers*, 99, 1– 10.