

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMANITA VERNA, FUNALIA TROGII, SUILLUS COLLINITUS MANTAR
EKSTRELERİNİN NORMAL VE KANSER HÜCRELERİNE SİTOTOKSİK,
GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

FERİT ARPAZ

HAZİRAN 2018

ÖZET

AMANITA VERNA, FUNALIA TROGII, SUILLUS COLLINITUS MANTAR
EKSTRELERİNİN NORMAL VE KANSER HÜCRELERİNE SİTOTOKSİK,
GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ARPAZ Ferit

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Perihan GÜLER

Ortak Danışman: Prof.Dr. Mustafa TÜRK

Haziran 2018, 57 sayfa

Bu çalışmada, *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii*'nin sitotoksikite, genotoksikite, apoptik, nekrotik ve hücre proliferasyon etkileri incelendi. Laboratuvarında kuru olarak korunan basidiokarplardan alınan parçalar, katı ve sıvı kültürde geliştirildi. Numuneler Soxhlet cihazında 80°C, %70'lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edilerek sitotoksikite, apoptik ve nekrotik çalışmalar için hazırlandı. Sitotoksikite çalışmalarında, ekstrakt MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücrelere örnek konsantrasyonları 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL olarak uygulandı. WST-1 solüsyonu eklenerek inkübasyon sonucunda 440 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

İkili boyama deneyi ile aynı hücre hattında apoptoz ve nekroz belirlendi. İkili boyama solüsyonu hazırlanarak MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelere aynı konsantrasyonlarda uygulandı. Inkübasyon sonucunda floresan ataçmanlı mikroskop FITC ve DAPI filtresinde 20X büyütmede ölçüm yapıldı. *Suillus collinitus* yüksek konsantrasyonda (1mg/mL, 0.5mg/mL) MCF-7 kanser hücre hatlarında toksik etki (%86) gösterdi. *Amanita verna* ve *Funalia trogii* mantarlarının anlamlı bir toksik etkisinin olmadığı gözlemlendi. *Suillus collinitus*'un apoptotik ve nekrotik etkilerine rastlandı. *Amanita verna* ve *Funalia trogii*'nin düşük indekslerde

apoptotik ve nekrotik etkileri belirlendi. Genotoksisite çalışmalarında, mantar ekstreleri CHO hücrelerine örnek konsantrasyonları 25µg/mL ve 12.5µg/mL olarak uygulandı. *Suillus collinitus*, *Amanita verna*, *Funalia trogii* ekstrelerinin uygulanan konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Suillus collinitus*, *Amanita verna*, *Funalia trogii*, kanser, sitotoksisite, genotoksisite, apoptik etki, nekrotik etki.



ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF *AMANITA VERNA*, *FUNALIA TROGII*, *SUILLUS COLLINITUS* MUSHROOM EXTRACTS ON THE NORMAL AND CANCER CELLS

ARPAZ Ferit

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Msc Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Perihan GÜLER

Co-Supervisor: Prof.Dr. Mustafa TÜRK

June 2018, 57 Pages

In this study, cytotoxicity, genotoxicity, apoptotic, necrotic and cell proliferation effects of *Suillus collinitus*, *Amanita verna* and *Funalia trogii* were investigated. Taken parts from dry-preserved basidiocarps in the laboratory were developed in solid and liquid culture. The samples were prepared for cytotoxic, apoptotic, necrotic, studies by extracting at 80°C and 1 h in ethyl alcohol at Soxhlet device. In cytotoxicity studies, sample concentrations for extract MCF-7 cancer cell and L929 Fibroblast cells were applied as 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL respectively. The WST-1 solution was added and the absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 440 nm at the end of the incubation.

Apoptosis and necrosis were detected in the same cell line as the double staining experiment. Binary staining solution was prepared and MCF-7 cancer cell and L929 fibroblast cells were applied at the same concentrations. As a result of incubation, the measurement was done at fluorescence microscopy at 20X magnification in FITC and DAPI filters. *Suillus collinitus* extract showed toxic effect (86%) at high concentrations (1mg/mL, 0.5mg/mL) on MCF-7 cancer cell lines. It was observed that *Amanita verna* and *Funali trogii* extracts did not have significant toxic effect. Apoptotic and necrotic effects of *Suillus collinitus* extract were found. Apoptotic

and necrotic effects of *Amanita verna* and *Funalia trogii* at low indices were determined. In genotoxicity studies, sample concentrations for extracts CHO cells were applied as 25µg/mL and 12.5µg/mL respectively. It was determined that *Suillus collinitus*, *Amanita verna*, *Funalia trogii* extracts did not show genotoxic effects at applied concentrations.

Key words: *Suillus collinitus*, *Amanita verna*, *Funalia trogii*, cancer, genotoxicity, apoptotic effects, necrotic effects, cytotoxicity



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara destek olan, bilimsel deney imkanlarını bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. Perihan GÜLER'e, ortak danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, tez çalışmalarım esnasında, benden desteğini esirgemeyen anneme ve babama, büyük fedakarlıklarla bana destek olan arkadaşım Hayriye BARAN ve Aydın KESKİN'e, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm Hemen Gül ERASLAN ve Esra ARAT'a teşekkür ederim.

Bu çalışma; Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından 2015/107 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı.....	3
1.2.Mantarların Tıbbi Özellikleri.....	3
1.3. Kanser.....	4
1.3.1 Kanser Oluşum Mekanizması	6
1.4. Apoptoz ve Nekroz	7
1.4.1. Apoptoz.....	7
1.4.2. Nekroz.....	8
1.4.3.Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar	8
1.5. Genotoksisite	9
1.6. Kaynak Özetleri.....	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1. Kullanılan Organizmalar	14
2.2. Kültür Çalışmaları.....	14
2.2.1. Katı Kültür Çalışmaları.....	14
2.2.2 Sıvı Kültür Çalışmaları	14
2.3 Etanol Ekstraktının Eldesi	15
2.4 Hücre Kültürü Çalışması	15
2.4.1. WST-1 ile Sitotoksisite Belirlenmesi	15
2.4.2. İkili Boyama ile Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi	16
2.4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	17
2.4.4. Mikronükleus Testi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi	18
3. BULGULAR	19

3.1. Kùltür Çalışmaları.....	19
3.1.1.Katı Kùltür Çalışmaları.....	19
3.1.2. Sıvı Kùltür Çalışmaları.....	20
3.2. Hùcre Kùltürü Çalışmaları.....	20
3.2.1. WST-1 Sitotoksisite Testi Çalışmaları	20
3.3. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi.....	22
3.3.1. <i>Suillus collinitus</i> Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi.....	23
3.3.2. <i>Amanita verna</i> Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi	27
3.3.3. <i>Funalia trogii</i> Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi.....	31
3.4. Gerçek Zamanlı Hùcre Analiz Sistemi ile Hùcre Proliferasyonunun	35
Belirlenmesi.....	35
3.5. Mikronùkleus Testi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi.....	38
4. SONUÇLAR VE TARTIşMA.....	42
KAYNAKLAR.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

3.1. <i>Suillus collinitus</i> WST-1 Sitotoksisite Testi.....	21
3.2. <i>Amanita verna</i> WST-1 Sitotoksisite Testi.....	21
3.3. <i>Funalia trogii</i> WST-1 Sitotoksisite Testi.....	22
3.4. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> , <i>Funalia trogii</i> Ekstrelerinin Uygulandığı Hücrelerdeki Mikronükleus Sayısı.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

SEKİL

Sayfa

1.1. Kanser Gelişimi	5
1.2. Hücre Döngüsü	7
1.3. Apoptoza Uğrayacak Hücredeki Morfolojik Değişimler	8
2.1. Soxhlet Cihazı.....	15
2.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi.....	18
3.1. <i>Suillus collinitus</i> Morfolojik Yapısı.....	19
3.2. <i>Funalia trogii</i> Morfolojik Yapısı	19
3.3. <i>Amanita verna</i> Morfolojik Yapısı.....	19
3.4. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> , <i>Funalia trogii</i> Sıvı Kültür Çalışması.....	20
3.5. <i>Suillus collinitus</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri MCF-7 Kanseri Hücrelerinde	23
3.5.(Devamı). <i>Suillus collinitus</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri L929 Fibroblast Hücrelerinde.....	24
3.6. <i>Suillus collinitus</i> Ekstresinin MCF-7 Kanseri Hücrelerinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	25
3.7. <i>Suillus collinitus</i> Ekstresinin L929 Fibroblast Hücrelerinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	26
3.8. <i>Amanita verna</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri MCF-7 Kanseri Hücrelerinde	27
3.8. (Devamı). <i>Amanita verna</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri L929 Fibroblast Hücrelerinde.....	28
3.9. <i>Amanita verna</i> Ekstresinin MCF-7 Kanseri Hücrelerinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	29
3.10. <i>Amanita verna</i> Ekstresinin L929 Fibroblast Hücrelerinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	30
3.11. <i>Funalia trogii</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri MCF-7 Kanseri Hücrelerinde	32

3.11. (Devamı). <i>Funalia trogii</i> Floresan Ataçmanlı Mikroskop Görüntüleri L929 Fibroblast Hücrelerinde.....	32
3.12. <i>Funalia trogii</i> Ekstresinin MCF-7 Kanser Hücresinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	33
3.13. <i>Funalia trogii</i> Ekstresinin L929 Fibroblast Hücresinde Apoptoz (A) ve Nekroz (B) Grafikleri.....	34
3.14. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> ve <i>Funalia trogii</i> Uygulanan MCF-7 Kanser Hücresinin Proliferasyon Grafiği (Standart sapma)	35
3.15. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> ve <i>Funalia trogii</i> Uygulanan MCF-7 Kanser Hücresinin Proliferasyon Grafiği (12.5µg/mL)	36
3.16. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> ve <i>Funalia trogii</i> Uygulanan L929 Fibroblast Hücresinin Proliferasyon Grafiği (Standart sapma)	36
3.17. <i>Suillus collinitus</i> , <i>Amanita verna</i> ve <i>Funalia trogii</i> Uygulanan L929 Fibroblast Hücresinin Proliferasyon Grafiği (12.5µg/mL)	37
3.18. <i>Funalia trogii</i> 12.5 µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (A) ve 25µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (B)	39
3.19. <i>Amanita verna</i> 12.5 µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (A) ve 25µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (B)	39
3.20. <i>Suillus collinitus</i> 12.5 µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (A) ve 25µg/mL Uygulandığı Binükleuslu Hücreler (B)	39
3.21. Kontrol Grubuna ait CHO Hücreleri	40
3.22. <i>Suillus collinitus</i> Uygulanan CHO Hücrelerine ait Proliferasyon Grafiği	40
3.23. <i>Funalia trogii</i> Uygulanan CHO Hücrelerine ait Proliferasyon Grafiği	41
3.24. <i>Amanita verna</i> Uygulanan CHO Hücrelerine ait Proliferasyon Grafiği	41



EN BÜYÜK ZENGİNLIĞİME
ANNEM VE BABAMA...

1.GİRİŞ

Makromantarlar ‘fungi’ adı verilen canlılar aleminde yer alan ökaryotik, klorofilsiz, saprofit veya parazit olarak beslenen, sporla eşeyli veya eşeysiz olarak üreyen canlılardır (Bayuk vd., 2016). Günümüzde tarımsal üretimdeki kayıpları azaltarak atık maddelerin tekrar üretime kazandırılmasına yönelik çalışmalarda mantarların saprofit olma özelliğinden faydalanarak atık ürünlerin mantar yetiştiriciliğinde kullanılmasıyla hem çevre kirliliği önlenmekte hem de ek gelir elde edilmektedir (Yakupoğlu ve Pekşen, 2011).

Antik çağlardan beri varlığı bilinen mantarlar besleyici değeri ve tıp alanındaki öneminden dolayı günümüzde dünyanın pek çok ülkesinde ilgi görmektedir (Akbaş, 2010). Dünya üzerinde 1.5 milyon mantar türü vardır fakat bunlardan sadece %10 u bilinmekte olup 5 bin yenilebilir mantar türü bilinmektedir (Saldır, 2015). Geçmiş dönemlerde mantar ekstraktlarının besin maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir (Smith vd., 2002).

Son yıllarda mantarların yüksek besin ve tıbbi değerlerinin daha iyi anlaşılması mantarlar üzerinde ilginin artmasına neden olmuştur. Besin değerlerine ek olarak içeriğinde bulunan aktif bileşenlerin tedavi edici etkisinin olduğu saptanmıştır (Bayuk vd., 2016). Yapılan son çalışmalarda antitümör ajanlar ve bioaktif bileşik (polisakkarit, protein, alkoloid, flavanoid, karotenoids, askorbik asit enzimleri, organik asit) içeren çeşitli makrofunguslar tanımlanmıştır (Patel ve Goyal, 2011).

Mantarlar, Antik Romalıları göre tanrıların yiyecekleriydi. Mısırlılar mantarları Tanrı Osiris’ten bir hediye olarak nitelendirirken, Çinliler hayatın iksiri olarak düşünmüşlerdir (Akbaş, 2010). Pek çok yenilemeyen ve zehirli mantar türlerinin de önemli tıbbi özellikleri olduğu düşünülmektedir (Saldır, 2015). Dünyada kültüre alınmış mantar türlerinin başında *Agaricus bisporus*, *Shiitake (Lentinus edodes)* ve *Pleurotus* gelmektedir. Bu türlerin dışında tıbbi değerinden dolayı *Ganoderma lucidum* türünün yetiştiriciliği gün geçtikçe artmaktadır (Yakupoğlu ve Pekşen,

2011). Mantarlar, içeriğindeki karbonhidrat ve yağ oranının diğer besinlere göre daha az olması nedeniyle diyet için de kullanılabilir (Saldır, 2015).

Yapılan çeşitli çalışmalarda mantarların içerdikleri aktif bileşenlerin antitümör, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, kardiyovasküler, hepatite karşı koruyucu, kolesterol düşürücü, bağışıklık sistemi güçlendirici ve düzenleyici etkiler gösterdiği saptanmıştır (Bayuk, 2016).

Biyoaktif bileşenler, mantarların fruktifikasyon organından, miselden ya da kültür ortamından izole edilmektedir (Çöl vd., 2017). Mantarlar temel aminoasitler bakımından zengindir. Doğadan toplanan tıbbi özelliğe sahip mantarların sap ve şapkası, sporları, miselleri, ekstraktı ya da farklı kısımlardan izole edilmiş içerikleri tıp alanında insanlar tarafından kullanılmıştır. Makromantarlardan izole edilmiş bu içerikler incelendiğinde bunların, fosfor ve potasyum başta olmak üzere mineraller, tiyamin (B1), ribofilavin (B2), niyasin, biyotin ve askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminler bakımından zengindirler. Alternatif tıpta mantarlar kalp, beyin, karaciğer ve akciğer koruyucu, bağışıklık sistemini güçlendirici, akne, adet düzensizliği, alzheimer, anoraksiya, astım, bronşit, depresyon, eklem romatizması, epilepsi, hemoroid, hipertansiyon, kanser, kireçlenme, kronik hepatit, katarakt, obezite, gut, nezle, rinit, retinal pigment dejenerasyonu, saç dökülmesi, nefrit, nevrastenî, ülser ve uykusuzluk gibi birçok hastalığın tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır (Saldır, 2015). Mantarların kolesterol, kanser, hipertansiyon gibi hastalıkları tedavi edici etkilerinin bulunması, yapısında bulunan bileşimlerden kaynaklandığı belirlenmiştir (Manzi vd., 2001).

Mantarlarda bulunan polisakkaritler, fenolik bileşen türevleri antitümör etkisi olan önemli bileşenlerdir (Vaz vd., 2012). *Shiitake*' nin kan dolaşımını düzenlemesi, beyin kanamalarının, damar sertliğinin, böbrek yetmezliği vb. hastalıkları engellendiği; *Cordyceps sinensis* mantarının hepatit üzerine etkileri olduğu, karaciğer fonksiyonlarını düzenlediği, antioksidan etki gösterdiği, kolesterol yağlarının birikmesini engellediği; *Grifola frondosa* mantarının tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir (Öztürk ve Çopur, 2014). Mantarların sağlık alanında kullanımı Batı ülkelerinde son dönemlerde artarken, Asya ülkelerinde uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir (Lindequisit vd., 2005). Mantarların besin değerleri oldukça yüksektir

ve yapısında yüksek oranda protein içermektedir (Özdemir, 2010). Serbest radikallerin artması ve radikalleri detoksifiye eden antioksidanların yeterli gelmemesi toplumumuzda kanser kökenli ve kalp damar hastalıklarını arttırdığını öngörmektedir (Ames vd., 1993).

Tıbbi açıdan öneme sahip mantarlar kanser, bağışıklık koruyucu, bronşit, nezle, hemoroid, ülser, uyku düzensizliği gibi bir çok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadır (Ooi ve Lui 2000; Chen vd., 2004; Liu ve Zhang, 2005). *Schizophyllum commune* gibi antimikrobiyal etkisi yüksek mantar türlerinin alternatif tıpta kullanılabileceği belirtilmiştir (Demirhan vd., 2007).

1.1. Çalışmanın Amacı

Basidiomycota sınıfında yer alan *Suillus collinitus* -Suillaceae, *Amanita verna* - Amanitaceae, *Funalia trogii* -Polyporaceae familyalarında yer almaktadır ve bu makromantar ekstrelerinin L929 Fibroblast ve MCF-7 kanser hücrelerine sitotoksik, genotoksik, apoptotik, nekrotik ve hücre proliferasyonu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2.Mantarların Tıbbi Özellikleri

Makromantarların yapılan çalışmalar sonucunda antiviral, antibakteriyal, antifungal etkilerinin yanı sıra önemli kimyasal bileşiklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Genellikle Basidiomycota sınıfında yer alan mantarların tıbbi açıdan önemli bileşiklerin kaynağı olduğu bilinmektedir (Smith vd., 2002). Son dönemlerde tıbbi ilaçların yanlış kullanımı sonucu antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin ölümlere yol açtığı saptanmış, bazı mantar türlerinde bulunan bileşiklerin bu tür bakterilerin üremesini durdurduğu belirlenmiştir (Kalyoncu vd., 2010).

Ayrıca bulaşıcı hastalıkların yok edilmesinde kullanılan antibiyotiklerin etkisiz kalmış olması, bilim insanlarını yeni ilaçların keşfine sürüklemiş ve uzun yıllardır

besin olarak tüketilen mantarların etkilerini ortaya çıkarmıştır (Duman vd., 2003). Mantarların ürettiği organizmaya özel bileşikler makrofungusların antimikrobiyal etkilerini ortaya çıkarmıştır (Benedict vd., 1983). Bu maddelerin başında makromantarların yapısında bulunan özellikle beta-glukan maddeleri hücre bağışıklığını sağladığı ve antitümör etkileri rapor edilmiştir (Roupas vd., 2012).

Mantarın antibakteriyel, antitümör, antiviral etkilerinin yanı sıra antifungal etki gösterdiği belirlenmiş ve çalışmada *Psathyrella condolleana* ve *Psathyrella spadiceogrisea* mantarlarının antifungal etki gösterdiği saptanmıştır (Eraslan ve Güler, 2017).

Makromantarların geçmiş dönemlerde yiyecek olarak kullanılmasının yanı sıra tedavi edici özellikleri de bulunmaktadır (Ribeiro vd., 2006). Bu özellikler mantarları tıbbi alanda ön plana çıkarmaktadır. Mantar özütleri ile yapılan çalışmalarla tıbbi özelliklerinden biri olan antioksidan etkisi belirlenmektedir (Tong vd., 2009). Yapılan çalışmalarda bazı mantar türleri ile kuru misellerden ekstrakt elde edilerek yüksek oranda öldürücü etkilerinin saptandığı bildirilmiştir (Thillaimaharani vd., 2013). Porisin, lentinan gibi mantarların içeriğinde bulunan maddelerin antitümör etkisinin yanı sıra antiviral etkileri de saptanmıştır (Benedict ve Brady, 1972; Conchran, 1978).

1.3. Kanser

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalmasıdır. Bu durum kromozomal, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda ortaya çıkan çok basamaklı bir süreç olup, hücre bölünmesi, farklılaşması, apoptoz, DNA tamiri gibi temel hücresel işlevleri de etkileyen bir mekanizmadır. Kanserler başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler. Buna rağmen tüm kanserler moleküler seviyede ortak karakteristik özellik gösterirler (Tuncer, 2014).

Günümüzde oldukça sık rastlanan ve çağın hastalıklarından olan kanser geçmiş dönemlerde de bilinmektedir. Alkol, ilaçlar, tütün ürünleri, katkı maddeleri gibi etkenlerin kanseri tetiklediği bildirilmiştir (Clapp vd., 2007). Hücreler bölünme özelliğine sahiptir. Ancak bölünme sayıları ve zamanları sınırlıdır. Kanserli hücrelerde bu durum sınırsızdır. Kanserli hücrelerin sağlıklı hücreler arasına yayılım gösterdikleri belirtilmiştir (Kosova ve Arı, 2008). Hücre ölümleri apoptotik sistemler tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistemlerin kontrolü proto-onkogenler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Genlerde meydana gelebilecek bir hasar, hücre kontrolünün kaybolmasına ve hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Lodish vd., 2000).

Kanserde teşhis ve tedavi oluşum bölgeleri ve hücrelerin niteliğine göre yapılmaktadır. Bazı anormal hücreler sağlıklı hücrelerin bölünmesini ve ölümünü kontrol eder. Bu anormal hücrelere dönüşebilecek normal genlere proto-onkogen gen denir. Bu genler çevre, genetik faktörler gibi durumlardan etkilenmektedir (Anonim, 2018a). Kanser oluşum yerlerine göre; akciğer kanseri, kolon kanseri, cilt kanseri, lösemi, kemik kanseri gibi sınıflandırılmaktadır. Ülkemizde en fazla görülen kanser çeşitleri akciğer, meme ve prostat kanserleridir (Özdemir, 2014). Kanser gelişimi Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Kanser gelişimi (Anonim, 2018b)

1.3.1 Kanser Oluşum Mekanizması

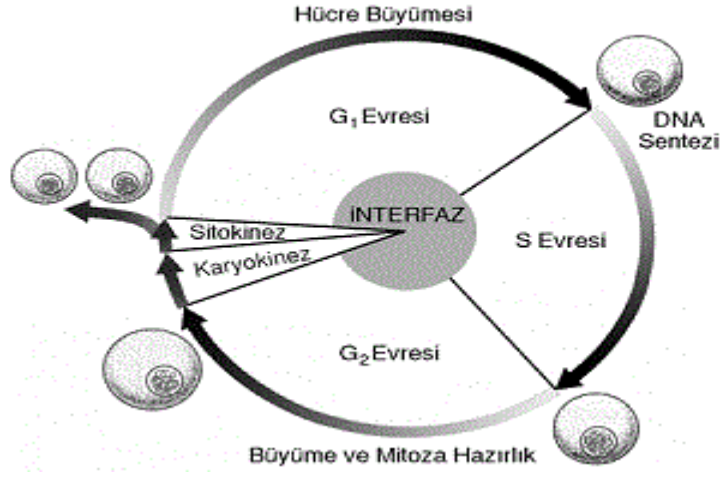
Kanserli hücreler, normal hücrelerden farklı olarak normal büyüme sınırı sistemine dahil olmazlar. Bu tip hücrelerin doku ve hücreler arasında dolaşma istekleri oldukça fazladır. Hücrede gerçekleşebilecek mutasyon gibi anormal durumlar kanser oluşumuna neden olabilmekte ve kanserli hücrelerin çoğalmasını hızlandırabilmektedir. Hücre kontrol mekanizmasında bulunan G1 kontrol evresinde DNA eşlenmesi kontrol edilmektedir. Bu evrede kontrol noktasındaki aksaklıklar hücre kontrolünün kaybolmasına ve kontrol noktasında bulunan proteinlerin inaktif hale gelerek kanserli hücre oluşumuna yol açabilmektedir (Lowitz ve Casciato, 2000; Herceg ve Hainaut, 2007). Ayrıca hücre kontrolü kaybolmuş hücreler damarlaşmayı artırarak gerekli besin öğelerini de sağlayabilmektedir (Guyton ve Hall, 2001).

Hücre bölünmesinin kontrolü proto-onkogenler tarafından sağlanmaktadır. Bu genlerin işleyişini dengeleyen ve baskılayan genler tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılmaktadır ve p-53, c-myc, bcl-2 ve bcl-XL ailesi olarak gruplandırılmaktadır (Annamalai vd., 2015; Pythoud vd., 2015).

DNA onarımından p-53 geni sorumludur. Hasar durumunda hücre siklusunun ilerlemesini durdurmaktadır. Hücre hasarının onarılması durumunda siklus devam ettirilmektedir. Ancak hasar onarılamıyor ise hücre uyarılarak apoptoza sürüklenmektedir (Pompei vd., 2015).

Hücre büyümesinde etkili c-myc geni, c-myc proteininin üretimini sağlar. Hücre siklusu sırasında büyüme faktörleri ortamda bulunmadığında hücreyi programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozise uğratmaktadır (Buzin vd., 2015).

Mitokondrinin aktifleşmesi bcl-2 ve bcl-XL ailesi genleri tarafından sağlanmaktadır. Mitokondrinin aktifleşmesi apoptozun döndürülemeyeceği anlamına gelir ve apoptozisi başlatan en önemli etkeninin mitokondriyi aktif hale getiren bcl-2 ve bcl-XL ailesi genleri olarak bildirilmiştir (Papadopoulos vd., 2015). Hücre döngüsü Şekil 1.2’de verilmiştir.

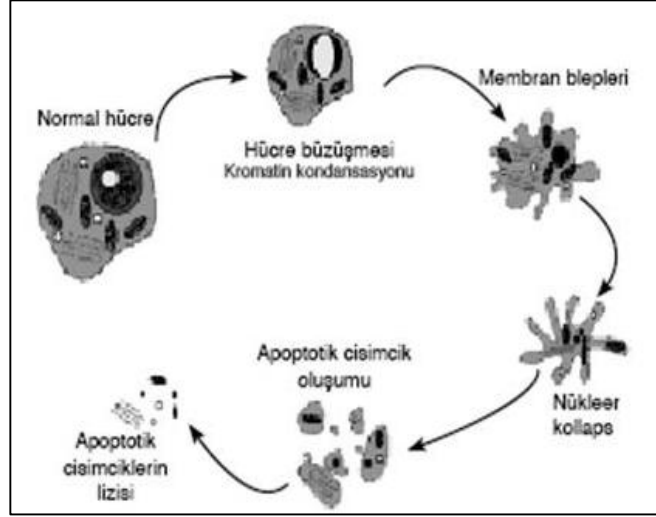


Şekil 1.2. Hücre döngüsü (Anonim, 2018c)

1.4. Apoptoz ve Nekroz

1.4.1. Apoptoz

Apoptozis, hücrelerin genetik bilgiler kontrolünde diğer hücrelerin yapısına zarar vermeden yok edilmesidir (Cohen, 1998). Apoptoz, yaşlanmış, yıpranmış ve özelliğini kaybetmiş hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini durdurarak bu tür hücrelerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olmaktadır (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). Mutasyon, kimyasal ilaçlar gibi etkenlerle hasar görmüş hücrelerde apoptoz mekanizması ile ortadan kaldırılabilir (Nagata, 1997). Apoptozda canlının iç dengesinin korunması ve devamlılığının sağlanması esastır (Tomatır, 2003). Programlı hücre ölümünde temel olay hücre çekirdeğinin önce yoğunlaşması, sonra parçalara ayrılmasıdır (Galle, 1997). Apoptoza uğrayacak hücredeki morfolojik değişimler Şekil 1.3’de verilmiştir.



Şekil 1.3. Apoptoza uğrayacak hücredeki morfolojik değişimler (Gültekin vd., 2008)

1.4.2. Nekroz

Nekroz, hücrelerin normal metabolik faaliyetleri dışında gelişen mekanik hasar, oksijen yokluğu gibi faktörlerle hücre zar ve organellerinin zarar görerek parçalanması sonucu ölmesidir (Parlakpınar, 2004).

1.4.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

Hücrelerin yapısal değişimleri apoptoz ya da nekroz durumlarının belirlenmesinde kullanılır. Apoptoza uğrayacak hücrede, DNA nükleozomlar arasından kesilerek aynı zamanda küçük cisimciklere parçalanmaktadır. Nekroz da hücre zarı parçalanır ve hücre koruyucu bir etki mekanizması olan inflamasyona uğrar (Huppertz vd., 1999; Willingham, 1999; Barisic vd., 2003).

1.5. Genotoksisite

Genotoksisite çalışmalarında kullanılmak üzere, kanser ve mutasyona neden olan maddelerin toksik etkilerini ölçebilmek için çok sayıda genotoksik testler belirlenmiştir (Bedir vd., 2004). Geliştirilen bu testler genetik bilgide meydana gelen aksaklıkları belirlemek üzere geliştirilmiş canlının içinde ve dışında gerçekleştirilen testlerden oluşmaktadır (Choy, 2001; Zeiger, 2004; Vural, 2005).

Genotoksisite esas olarak, gametlerde bulunan kromozomları etkileyebilecek zararlı ışınlar gibi fiziki etmenlerin, gıda katkı maddelerinin, ilaçların, kimyasalların mutasyona ve kansere etkilerinin tespitinde, farmakolojik olarak kullanılacak ilaçların olumsuz etkilerinin ve güvenilirliğinin belirlenmesinde, genetik kaynaklı hastalıkların belirlenmesi gibi olayların tayininde kullanılan yöntemlerdir (Preston vd., 1981; Choy, 2001; Jena vd., 2002; Mateuca vd., 2006).

1.6. Kaynak Özetleri

Mantarlar, besin kaynağı, hastalıkların tedavisi, antikanser çalışmaları, alternatif tıp gibi önemli dallarda uzak doğu ülkelerinde uzun yıllardır bilim dünyasına katkı sağlamaktadır.

Funalia trogii' nin sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Ünyayar vd. 2006), HeLa kanser hücrelerini %71.5 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir.

Amanita verna içerdiği amatoksinlerin zehirli maddesi α -amanitin nedeniyle öldürücü etkiye sahiptir. α -amanitinin üzerinde bulunan silibininin mekanizmasının serbest radikaller ve kan aktivitesi invitro olarak araştırılmış ve antitoksik etkileri incelenmiştir (Khunnala vd., 2009).

Funalia trogii miselleriyle yapılan bir çalışmada belirli ölçüde sitotoksik etkisi olduğunu belirlemişlerdir (Patel ve Goyal, 2011).

Rashid vd. (2011), *Funalia trogii*' nin sulu miselyal ekstraktlarının tümör hücrelerine karşı anti-tümör toksitelerini ve önemli ölçüde sitotoksik etkilerini belirtmişlerdir.

Suillus collinitus mantarı içerdiği aktif bileşenlerden dolayı yüksek oranda antikanser aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir (Vaz vd., 2012).

Funalia trogii; beyaz çürükçül makrofungus olup, glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan etki gösteren enzimlere sahiptir. İçerdiği diğer bileşiklerden dolayı çevre kirliliğinin önleminde önemli bir mantar türü olmakla birlikte sitotoksik etkisi olduğu bildirilmiştir (Yalın vd., 2012).

Beyaz çürükçül mantar *Funalia trogii* superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlere sahiptir. Bu özelliğinden dolayı bu mantarın oksidatif stresin neden olduğu hasarın derecesini kalp dokusunda da azaltacağı düşünülmektedir (Yalın vd., 2012).

Rashid vd. (2015), *Funalia trogii* lakkaz enzimlerinin antikanser ajan olarak potansiyelini araştırmışlardır.

Literatür araştırmalarında mantarların antikanser etkileri ile ilgili bulgular 1950' li yıllardan itibaren başlamıştır. Çalışmada kullandığımız makromantarlar ile kanser üzerine yapılmış çalışmalar oldukça azdır. Kanserle ilgili diğer makromantarlarla yapılmış çalışmalarda,

İsviçre albino farelerine 7 makromantarın (*Auricularia auricula-judae*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spodoleucus*, *Pholiota nameko*, *Tricholoma matsutake*) sulu etraktarı enjekte edilerek Sarkoma 180 kanser hücrelerine karşı antitümör etki gösterdiği ve *Auricularia auricula-judae* mantarı hariç diğer mantar türlerinde yüksek oranda tümör etkisini azalttığı, en yüksek antitümör etkisini *Lentinus edodes*'e ait olduğunu belirlemişlerdir (İkekawa vd., 1969).

Lentinula edodes makromantarının kromatografik deneyleri sonucunda Chihara vd., (1970), 6 farklı polisakkarit elde etmiş (Lentinan, LC-11, LC-12, LC-13, EC-11 ve EC-14) ve bu polisakkaritlerden Lentinan ve LC-11 polisakkaritlerinin antitümör etkisinin ve farelerde Sarkoma-180 kanser hücresinin büyümesini engellediğini belirlemişlerdir.

Miselyal kültürü yapılan *Tricholoma* sp.'nin antitümör ve bağışıklık sistemi güçlendirici etkileri incelenmiş, mantar içeriğinin makrofajları uyararak T-hücrelerini arttırdığını ve kanser tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Wang vd., 1995)

Laboratuar ortamında *Tricholoma giganteum* makromantarıyla hazırlanan ekstraktların Sarkoma-180'i %80 oranında, Karsinoma'yı %90 oranında engellediği belirlenmiştir (Mizuno vd., 1996).

Cui ve Chisti (2003), Uzak doğu ülkelerinde alternatif tıp alanında oldukça yaygın kullanılan *Trametes versicolor*'un içeriğinde bulunan polisakkarit bileşiklerin ((polisakkaropeptid krestin (PSK) ve polisakkaropeptid (PSP)) kanserli hücrelere etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Sarkoma 180, meme adenokarsinoma 755, lösemi L-1210 gibi kanser hücrelerine karşı *Schizophyllum commune*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* makromantarlarının ekstrakt özütlerinin antitümör etkisi incelenmiş ve makromantarların tümöre karşı etkin bir aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Daba ve Ezeronye, 2003).

Ölümsüzlük iksiri olarak da bilinen *Ganoderma lucidum* mantarının bronşit, ülser, hipertansiyon gibi hastalıkların yanı sıra kanserle mücadelede de kullanıldığı belirtilmiştir (Sliva, 2003).

Zhao vd. (2003), *Agrocybe aegerita* ile yaptıkları çalışmada mantar ekstraktının HeLa, SW480, SGC-7901, MGC80-3, BGC-823, HL-60 ve Sarkoma S-180 kanserli hücrelerinin inhibisyonunu gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Ng vd. (2006), *Flammulina velutipes*' in yapısında proflamin adı verilen bir antikanser etkili glikoproteini saptamışlardır.

Pleurotus ostreatus ile yapılan çalışmada Sarkoma-180 enjekte edilmiş fareler üzerinde mantar içeriğinin antitümör ve antikanser etkilerinin olduğunu ve kanser ilacı olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir (Sarangi vd., 2006).

Ünyayar vd. (2006), *Funalia trogii* ve *Coriolus versicolor* mantarları ekstraktlarının memeli hücreleri üzerindeki mutajenik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır.

Ajith ve Janardhanan (2007), Hindistan'da yetişen tıbbi özelliği bulunan mantarlardan, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus pulmonaris*, *Phellinus rimosus* ve *Pleurotus florida*'nın antitümör ve antioksidan etkilerini belirlemişlerdir.

Vaz vd. (2010), yaptıkları çalışmada Portekiz yabani mantarları olan *Clitocybe alexandri* ve *Lepista inversa* türlerinin antitümör ve antioksidan aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Pleurotus florida ve *Calocybe indica* mantarları ile T24 mesane kanseri hücrelerine yapılan çalışma sonucunda kanserli hücre gelişimini yavaşlattığı ve bu mantar türlerinin antikanser ilacı olarak kullanılabileceğini saptamışlardır (Selvi vd., 2011).

Akciğer hücre hattına (A549) farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200 ve 400 µg/mL) enjekte edilen *Armillaria mellea* mantarı yüksek oranda A549 hücre hattının büyümesini engellediğini belirlemişlerdir (Wu vd., 2012).

Jiao vd. (2013), yaptıkları çalışmada 13 makromantar (*Agrocybe cylindracea*, *Amauroderma rude*, *Tremella fuciformis*, *Auricularia polytricha*, *Cordyceps militaris*, *Auricularia auricula*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Sarcodon imbricatus*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Boletus edulis*'in kanser hücreleri üzerine (MB231, BEAS-2B, 4T-1, MCF-7, MB468, MT-1, MB231, A459, U87, Jurkat, HepG2, DU145, HeLa) antikanser etkilerini

araştırmışlardır. *Ganoderma lucidum* makromantarından daha fazla antikanser etki gösteren *Amauroderma rude* makrofungusunu belirlemişlerdir.

Liu vd. (2013), *Ramaria flava* ile yaptıkları çalışmada 200 µg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktını 3 ayrı kanser hücresinde (BGC-803, NCI-H520, MDA-MB-231) etkisini incelemişler ve MDA-MB-231 hücre hattında %71.66, BGC-803 hücre hattında %33.83 ve NCI-H520 hücre hattında %54.63 oranında etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Hericium erinaceus mantarının ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda etanol ekstraktları kanserli hücelere (HepG2, Huh-7, HT-29 ve NCI-87) enjekte edilmiş ve mide kanser türlerine karşı etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir (Li vd., 2014).

Rouhana-Toubi vd. (2015), *Coprinus comatus* mantar özütünü insan yumurtalık kanseri ES-2 hücre hatlarında apoptotik etkilerini araştırmışlardır.

Wang vd. (2016), *Tricholoma matsutake* mantar özütlerinin apoptotik etkilerini HepG2 ve SMMC-7721 kanser hücrelerinde araştırmışlardır.

Kumaran vd. (2017), *Ganoderma applanatum* mantarından elde edilen lektin molekülünün sitotoksik etkilerini belirlemişlerdir.

Tangen vd. (2017), *Agaricus blazei* mantar ekstraktının insan miyelom kanser hücre hatlarında sitotoksik etkilerini belirlemişlerdir.

Wang vd. (2017), *Phellinus igniarius* mantarının ekstraktının MGC-803, BEL-7402, HeLa, MCF-7, HCT-116 kanser hücre hatlarında apoptotik etkilerini araştırmışlardır

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Organizmalar

Çalışmada kullanılan *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* makromantarlar Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Sistematiği, Mikoloji ve Koruma Biyolojisi Laboratuvarından temin edildi.

Hücre kültürü çalışmaları için meme kanseri hücre hattı (MCF-7), L929 Fibroblast ve CHO hücreleri Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (KÜBTUAM) temin edildi.

2.2. Kültür Çalışmaları

2.2.1. Katı Kültür Çalışmaları

Mantar örneklerinden alınan sporlar 90 mm çapındaki petrilere bulunan malt ekstrakt agar (MEA) besiyerinde çoklu spor yöntemi ile inokule edilerek 27°C'de 10 gün süre ile karanlıkta inkübasyonu gerçekleştirildi. Primer miseller elde edildi. Gelişen primer miseller ayrı ayrı olacak şekilde 90 mm çapındaki petrilere bulunan Malt ekstrakt agar besiyer merkezine tek pelet yöntemi ile inokule edilerek 27°C'de 10 gün süre ile karanlıkta inkübasyonu gerçekleştirildi ve sekonder miseller elde edildi. Gelişen miseller +4°C'de muhafaza edildi (Fritsche, 1972).

2.2.2 Sıvı Kültür Çalışmaları

Rangkhwong vd., (2014)'nin sıvı kültür yöntemi modifiye edilerek katı besiyerinde gelişimini tamamlayan misellerden beş adet miselyal agar diskleri 8mm çapında 250 mL Nutrient broth besiyerine ayrı ayrı inokule edilerek 5 gün 27°C'de 140 rpm'de çalkalamalı etüvde geliştirildi.

2.3 Etanol Ekstraktının Eldesi

Hücre kültürü sitotoksisite testinde kullanılmak için mantar örnekleri Soxhlet cihazına yerleştirildi (Şekil 2.1). Ranz ve Marshall (1952),’ın yöntemi modifiye edilerek 80°C, %70’lik etil alkolde 1 saat ekstraksiyon edilerek mantar özütleri elde edildi. Elde edilen özütler 40°C’ de 75 br düşük basınç altında konsantre edildi. Ekstrakta kalan suyu uçurmak için 2 gün boyunca 40°C’ de etüvde bekletildi ve çalışmada kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edildi.



Şekil 2.1. Soxhlet cihazı

2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.4.1 WST-1 ile Sitotoksisite Belirlenmesi

Sitotoksisiteyi belirlemek için WST-1 testi kullanılır. Bu prosedürde WST-1 tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondrial respiratuar zincirde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilir formazan boyasına dönüştürüldü. Bu yöntemle bir örnekteki bu mitokondrial dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla yükseltildi. Enzimin

aktivitesinin artması, kültür medyumundaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile direkt ilişkili olarak formazan boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden oldu. Elisa-Reader kullanılarak absorpsiyon sayılabilir hale getirildi. L929 Fibroblast hücreleri 96'lık well platelere her bir kuyucuğa 5000 hücre düşecek şekilde ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra belirlenen miktarlardaki mantar ekstraktları hücrelere ilave edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak sadece besi ortamı, negatif kontrol olarak H₂O₂'li besi ortamı hücrelere uygulandı. Süre sonunda her kuyucuğa 15 µL WST-1 çözeltisi ilave edilerek (37) °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 440 nm'de okundu. Canlı hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmedi. Kontrol grubu baz alınarak canlılık oranı yüzde olarak hesaplandı (Huhtala vd., 2003).

2.4.2 İkili Boyama ile Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

İkili boyama için hücreler her kuyucukta 10×10^3 olacak şekilde 24 wellplate ekildi. 24 saat süreyle hücrelerin plate tutunması için inkübe edildi. Süre sonunda mantar ekstraktları belirlenen konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. 48 saatin sonunda floresan boyama yapıldı. Bu şekilde apoptoz ve nekroz belirlendi. Boyama esnasında sadece DNA'nın boyanması için ribonükleaz A (Sigma R-500) hücreler ile muamele edilerek sitoplazmik RNA yok edildi. Hoechst boyama (33342) hücrelerin çekirdeklerini maviye boyadı. Bütün hücreleri boyamasına rağmen apoptotik hücreler daha parlak ve çekirdek homojenliği kaybolmuş ve parçalanmış olarak görüntülendi. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler normal hücrelerden ayırıldı. İkili boyamada diğer boya Propidiumiodide kullanıldı (PI). DNA'yı kırmızıya boyayarak nekroz gözlendi. PI normal hücrelerin zarlarından geçmeyen, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçerek nekroza uğramış hücreleri gösterdi. Boyama işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı:

- a) Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı,
- b) Hoechst 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı,
- c) Propidiumiodide 1mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

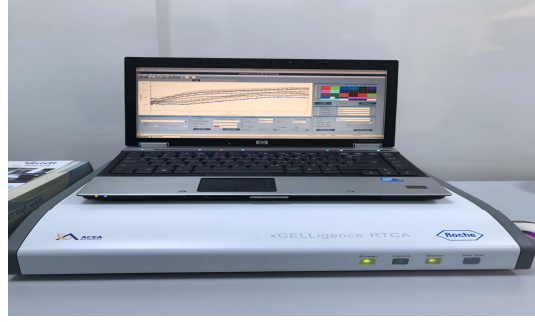
Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

- a) 10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre alındı,
- b) Hoechst stoktan 500 mikrolitre alındı,
- c) Propidiumiodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlandı.

İkili boyama için 48 wellplate kullanıldı. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak 48 wellplate'in her kuyucuğuna ekim yapıldı. 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltıldı. Daha önceden hazırlanan 1mg/mL'lik mantar ekstrelerinden belirlenen konsantrasyonlarda (1µg/mL-0.5µg/mL-0.25µg/mL) hücrelerin üzerine uygulanıp, 24,48,72 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna sadece medyum eklenip, 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltıldı ve her kuyucuğa 70 µL ikili çalışma solüsyonu (doublestaining çalışma solüsyonu) eklenip, 48 wellplate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı (Ulukaya vd., 2001).

2.4.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan hücre hatlarının her biri 5000 well olacak şekilde altın kaplı 96 wellplate ekimi yapıldı. Hücrelerin bir gün süre ile RTCA-SP sisteme bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilerek 24 saat sonra belirlenen konsantrasyonda (0.5mg/mL) farklı oranlarda ekstreler, belirlenen oranlarda hücrelerin üzerine ilave edilerek 96 saat süre ile kültürü yapıldı ve 5 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alındı ve sonunda zamana bağlı hücre proliferasyonu gösteren ve yine zamana ve miktara bağlı IC₅₀ değerlerini gösteren grafikler elde edildi (Jiang vd., 2004). Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi Şekil 2.2'de verildi.



Şekil 2.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi

2.4.4. Mikronükleus Testi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

Mikronükleus testi ile genotoksisitenin belirlenmesi için CHO hücre hattı kullanıldı. 6 kuyucuklu platelere 50×10^3 hücre ekildi. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* ekstreleri 3 tekrarlı çalışıldı. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri olan hücreler, pozitif kontrol olarak ethymethanosulfonate kullanıldı. Her örnekten 1 mg/mL tartılarak 1 mL besiyerinde çözüldü. Hücreler ekildikten 24 saat sonra her örnekten 2 farklı konsantrasyon ($25 \mu\text{g/mL}$ ve $12.5 \mu\text{g/mL}$) uygulandı. İnkübasyonun 44. saatinde binükleuslu hücreler elde etmek amacıyla hücre bölünmesini sitokinez aşamasında durduran final konsantrasyonu $6 \mu\text{g/mL}$ olan sitokalazin-B (Cyt- B) ilave edilerek,

- 1) 72 saatin sonunda kuyucuklardaki vasatlar atıldı.
- 2) Hücrelerin şişerek parçalanmalarını ve kromozomların birbirlerinden iyice ayrılmalarını sağlamak amacıyla 5dk oda sıcaklığında soğuk 0.075 M KCL hipotonik solüsyonu ile inkübe edildi.
(KCL hazırlanışı: 1.397 g toz KCL 250 mL 'lik balon joje içerisinde steril distile su ile çözülür. $+4^\circ\text{C}$ 'de uzun süre saklanabilir.)
- 3) 5 dk sonunda KCL solüsyonu atılır ve hipotonik solüsyon muamelesi sonucu açılmış olan metafaz plaklarının tespit edilmesini sağlamak amacıyla, 3:1 oranında (metanol: glasiyel asetik asit) taze hazırlanmış fiksatif ile biraz mekanik etki yardımıyla fikse edildi.
- 4) Fiksasyon 3 kez tekrarlandı.
- 5) Daha sonra propodiumiodide boyası ile boyandı. Floresan ataçmanlı mikroskopta incelendi. (Diaz vd., 2007).

3. BULGULAR

3.1. Kültür alışmaları

3.1.1. Katı Besiyerindeki Kültür alışmaları

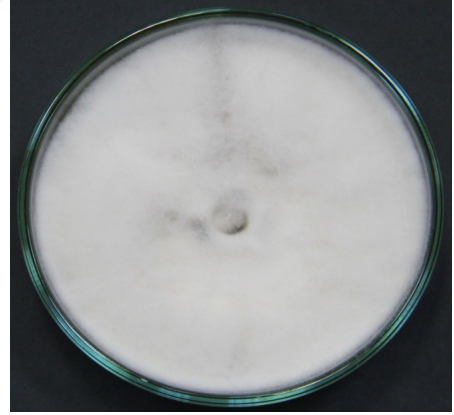
Suillus collinitus misel gelişimini 7 günde tamamladı. İnokülasyondan 60 saat sonra gelişmeye başladı. Hava hifi oluşturmadı (şekil 3.1).

Funalia trogii miselleri gelişimini 7 günde tamamladı. İnokülasyondan 48 saat sonra gelişim gösterdi. Hava hifi oluşumu gözlenmedi (şekil 3.2).

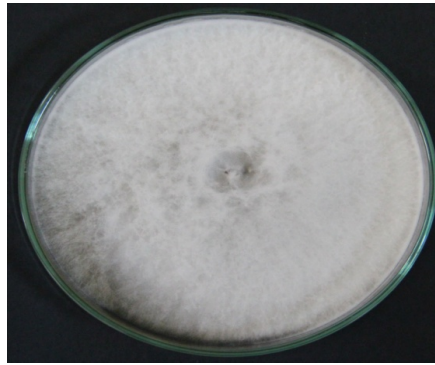
Amanita verna miselleri gelişimini 7 günde tamamladı. İnokülasyondan 48 saat sonra gelişim gözlendi. Hava hifi oluşturmadı (şekil 3.3).



şekil 3.1. *Suillus collinitus* morfolojik yapısı



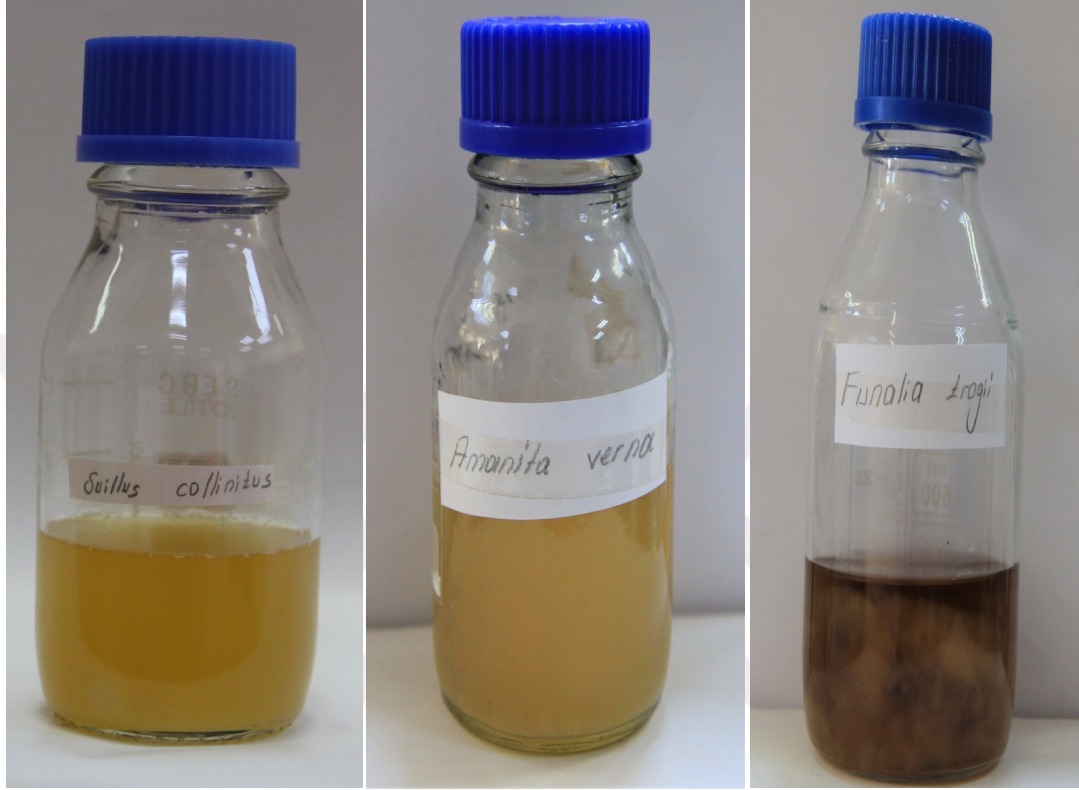
şekil 3.2. *Funalia trogii* morfolojik yapısı



şekil 3.3. *Amanita verna* morfolojik yapısı

3.1.2. Sıvı Kültür Çalışmaları

Suillus collinitus ve *Amanita verna* sıvı kültür gelişiminde yoğunluk gözlenmedi. *Funalia trogii*’ de oldukça yoğun gelişim gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* sıvı kültür çalışması

3.2. Hücre Kültür Çalışmaları

3.2.1. WST-1 ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Suillus collinitus’un MCF-7 kanser hücrelerinde sitotoksite testinin 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL dozajlarda mantarın 1mg/mL ve 0.5mg/mL konsantrasyonların toksite etkisinin yüksek (sitotoksite %86) olduğu saptandı. Konsantrasyon azaltıldıkça toksisitenin azaldığı belirlendi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Suillus collinitus* WST-1 sitotoksosite testi

<i>Suillus collinitus</i>	MCF-7		L929 Fibroblast	
Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans (440nm)	% Canlılık	Absorbans (440nm)	% Canlılık
1	0.162	14.71	1.097	93.15
0.5	0.730	66.46	1.125	95.49
0.25	0.806	73.43	1.142	96.97
Kontrol	1.098	100	1.178	100

Amanita verna'da MCF-7 kanser hücrelerinde 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL konsantrasyonlarda MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücreleri arasında belirlenen konsantrasyonlarda anlamlı bir toksik etki gözlenmedi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Amanita verna* WST-1 sitotoksosite testi

<i>Amanita verna</i>	MCF-7		L929 Fibroblast	
Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans (440nm)	% Canlılık	Absorbans (440nm)	% Canlılık
1	1.228	111.83	1.135	96.33
0.5	1.318	120.07	1.148	97.44
0.25	1.156	105.27	1.220	103.55
Kontrol	1.098	100	1.178	100

Funalia trogii'nin MCF-7 kanser hücrelerinde 1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL konsantrasyonlarda MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücreleri arasında belirlenen dozajlarda anlamlı bir toksik etki gözlenmedi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. *Funalia trogii* WST-1 Sitotoksosite testi

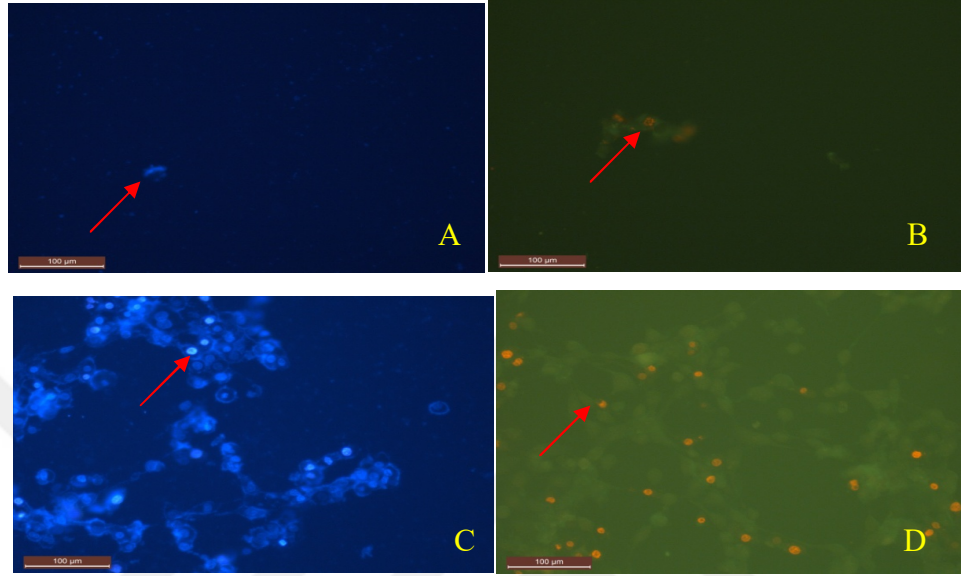
<i>Funalia trogii</i>	MCF-7		L929 Fibroblast	
Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans (440nm)	% Canlılık	Absorbans (440nm)	% Canlılık
1	1.273	115.97	1.089	92.47
0.5	1.253	114.11	1.096	93.02
0.25	1.218	110.92	1.221	103.64
Kontrol	1.098	100	1.178	100

3.2. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

Suillus collinitus, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* ekstraktları normal (L929 Fibroblast) ve kanserli hücre (MCF-7) kültürlerine uygulandı. İkili boyamada Hoechst 33342 floresan boyada hücre çekirdekleri koyu mavi renkte görülmekte olup apoptozun olduğu hücreleri göstermektedir. Propidiumiodide (PI) DNA'yı kırmızıya boyayarak nekrozu göstermektedir. Floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi kullanılarak nekroza uğramış hücreler fotoğraflandı. Yapılan çalışma sonucu resimlerinde hücre sayımı yapılarak çıkartılan grafikler ile apoptoz ve nekroz değerlendirildi.

3.3.1. *Suillus collinitus* Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

Suillus collinitus'un MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücresi apoptoz ve nekroz durumları floresan mikroskop görüntüleri elde edildi (Şekil 3.5).

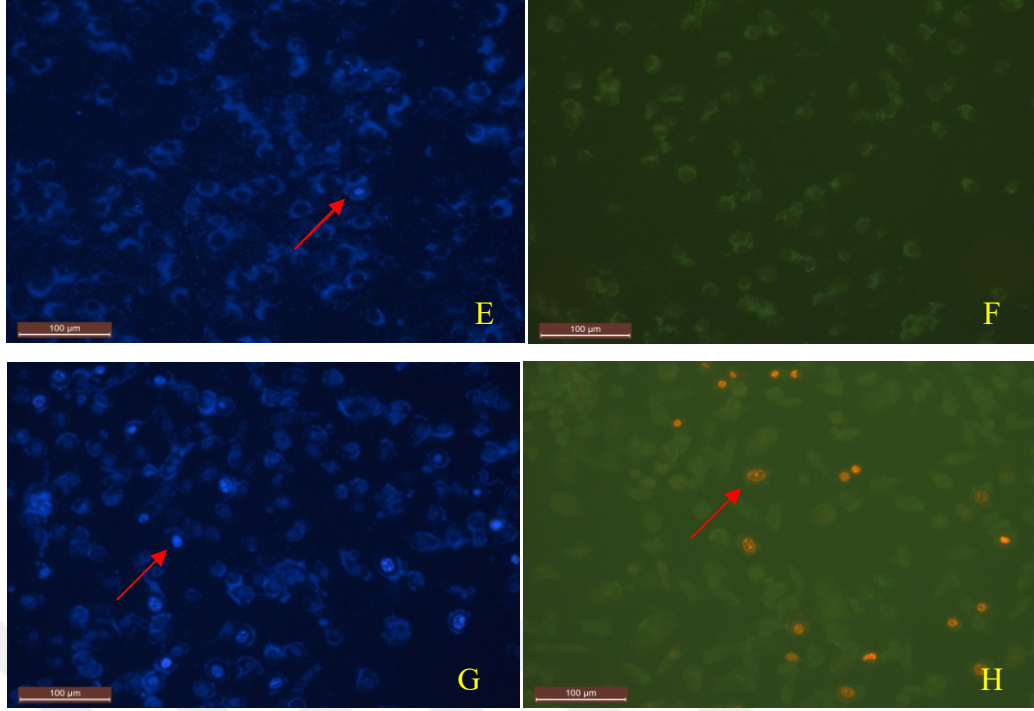


→ Apoptotik ve Nekrotik hücreler

Şekil 3.5. *Suillus collinitus* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

MCF-7 kanser hücrelerinde:

- (A) 1mg/mL apoptotik hücreler
- (B) 0.5mg/mL nekrotik hücreler
- (C) Apoptotik hücreler (Kontrol)
- (D) Nekrotik hücreler (Kontrol)



→ Apoptotik ve Nekrotik hücreler

Şekil 3.5.(Devamı). *Suillus collinitus* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

L929 Fibroblast hücrelerinde:

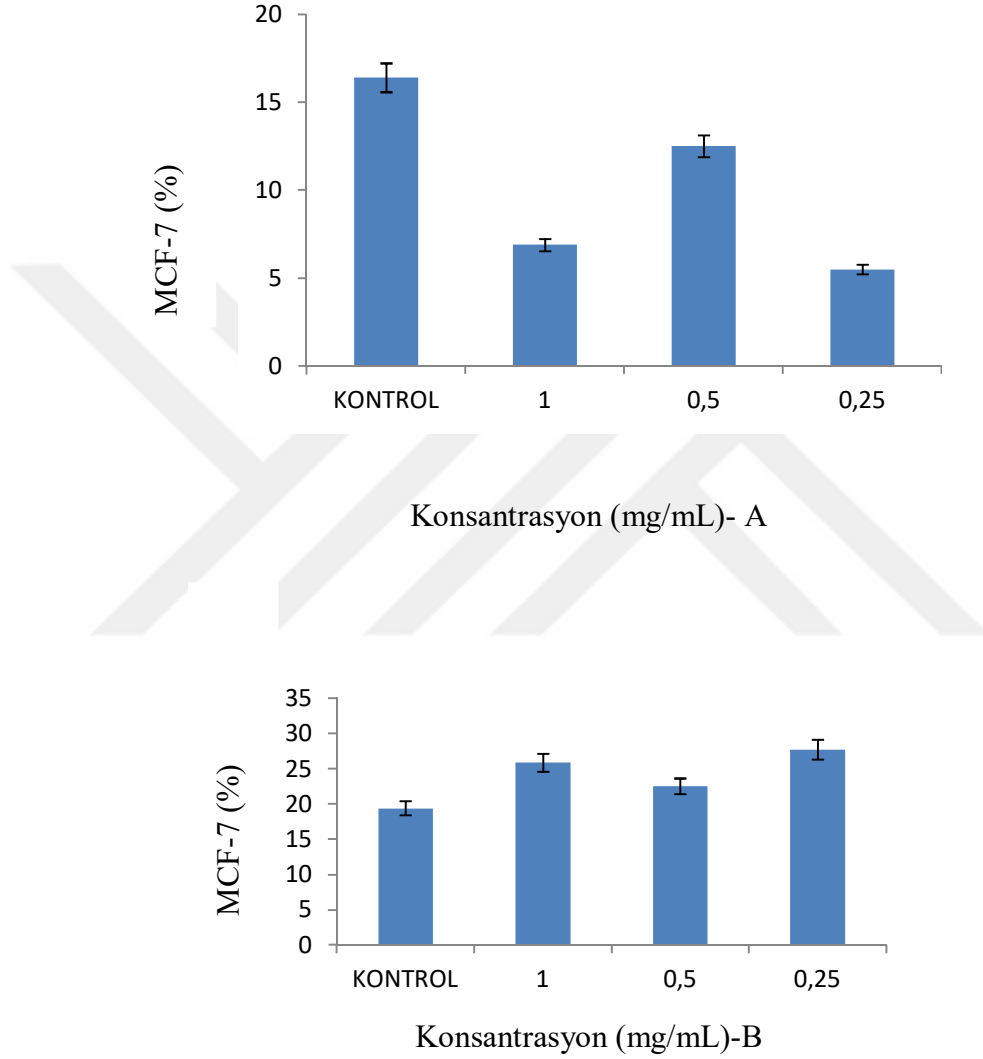
(E) 1mg/mL apoptotik hücreler

(F) 0.5 mg/mL nekrotik hücreler

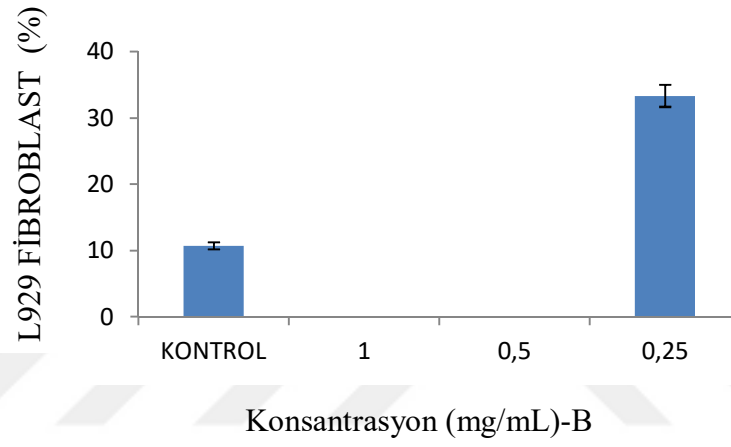
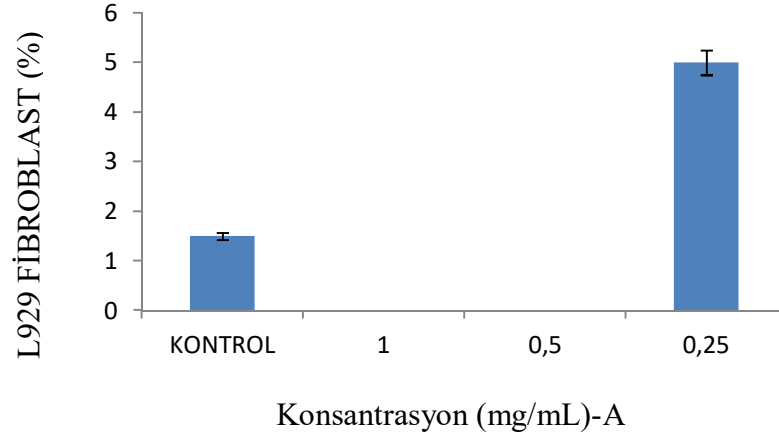
(G) Apoptotik hücreler (Kontrol)

(H) Nekrotik hücreler (Kontrol)

MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücrelerinde *Suillus collinitus*' un uygulanan tüm konsantrasyonlarda apoptotik ve nekrotik etkilerini gösteren grafikler verildi. Yüksek konsantrasyonlarda apoptoz ve nekrozun olduğu belirlendi (Şekil 3.6, Şekil 3.7).



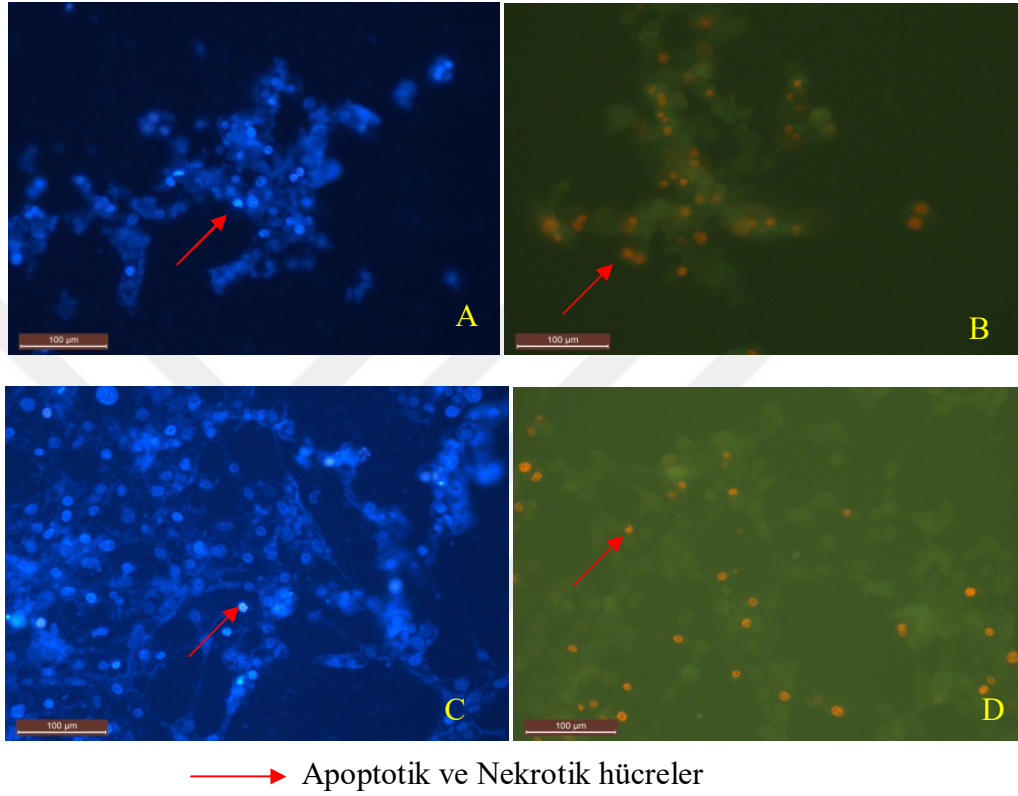
Şekil 3.6. *Suillus collinitus* ekstresinin MCF-7 kanser hücresinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri



Şekil 3.7. *Suillus collinitus* ekstresinin L929 Fibroblast hücrelerinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri

3.3.2 *Amanita verna* Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

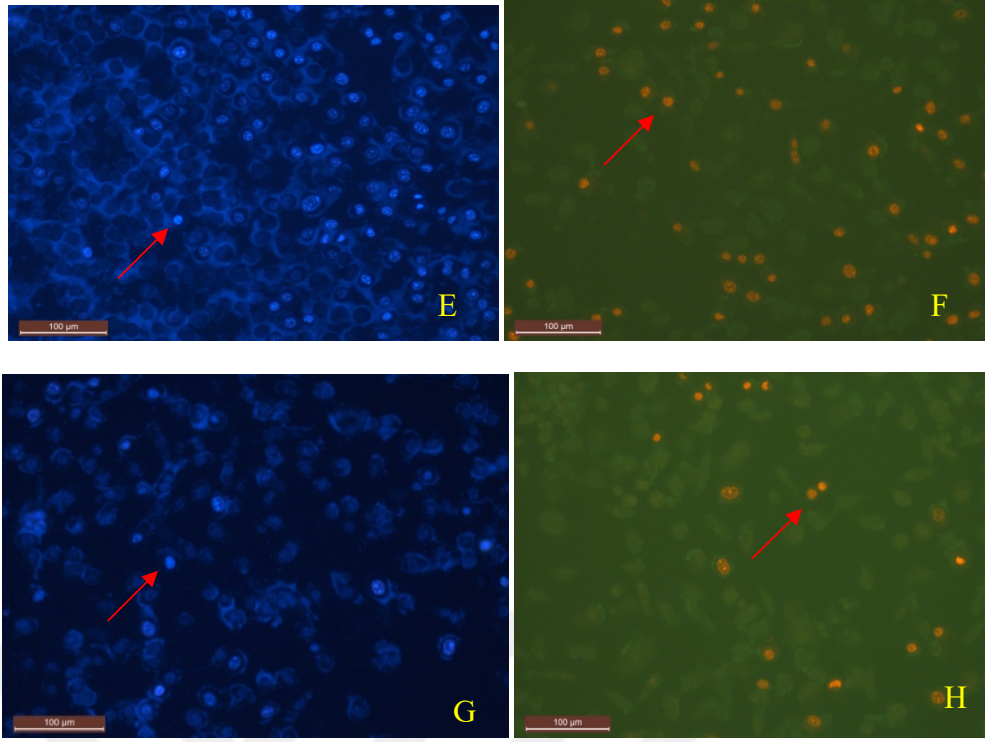
Amanita verna'da MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücreleri floresan mikroskop görüntüleri elde edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *Amanita verna* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

MCF-7 kanser hücrelerinde:

- (A) 1mg/mL apoptotik hücreler
- (B) 0.5mg/mL nekrotik hücreler
- (C) Apoptotik hücreler (Kontrol)
- (D) Nekrotik hücreler (Kontrol)



→ Apoptotik ve Nekrotik hücreler

Şekil 3.8. (Devamı). *Amanita verna* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

L929 Fibroblast hücrelerinde:

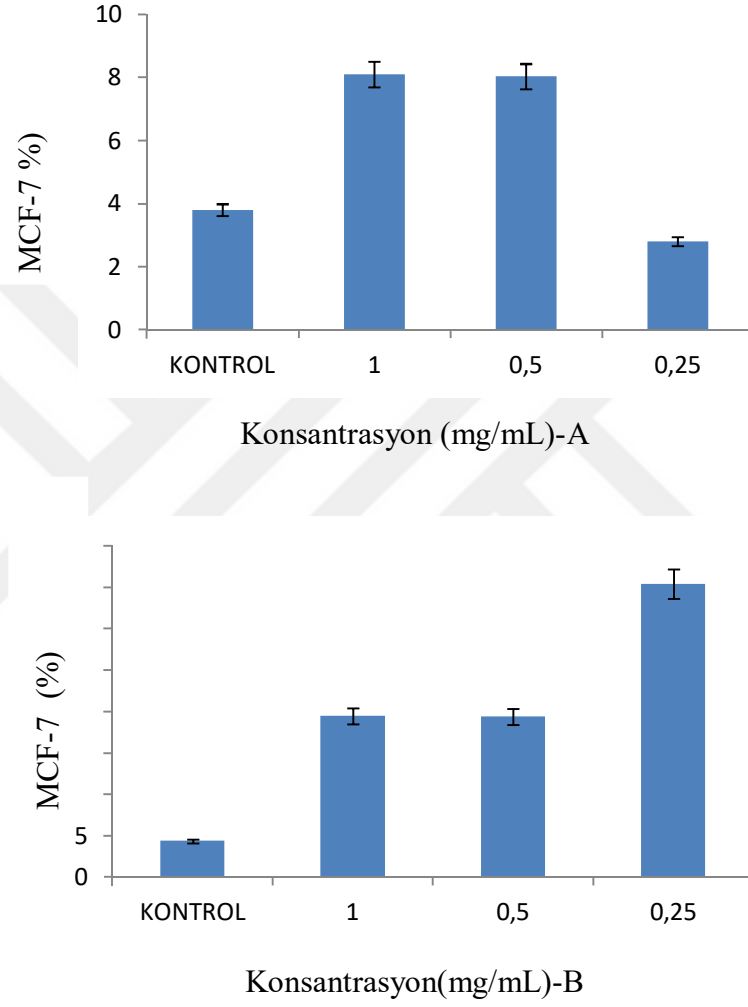
(E) 1mg/mL apoptotik hücreler

(F) 0.5 mg/mL nekrotik hücreler

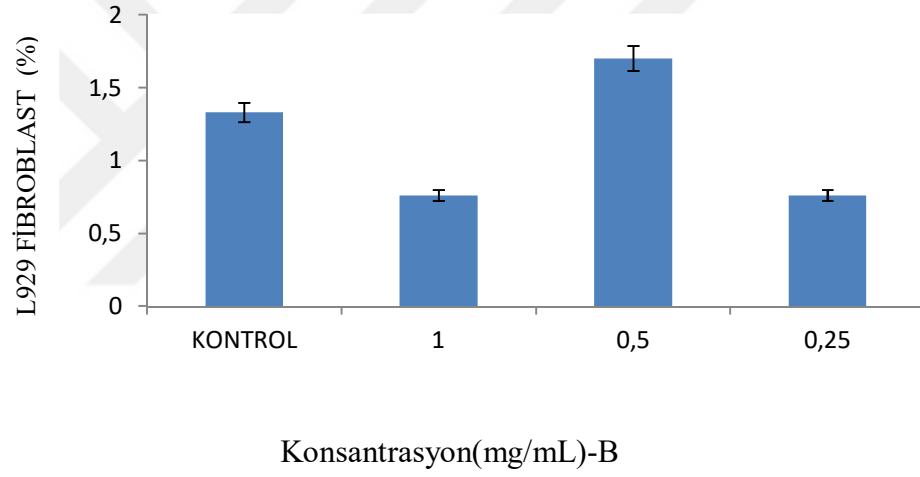
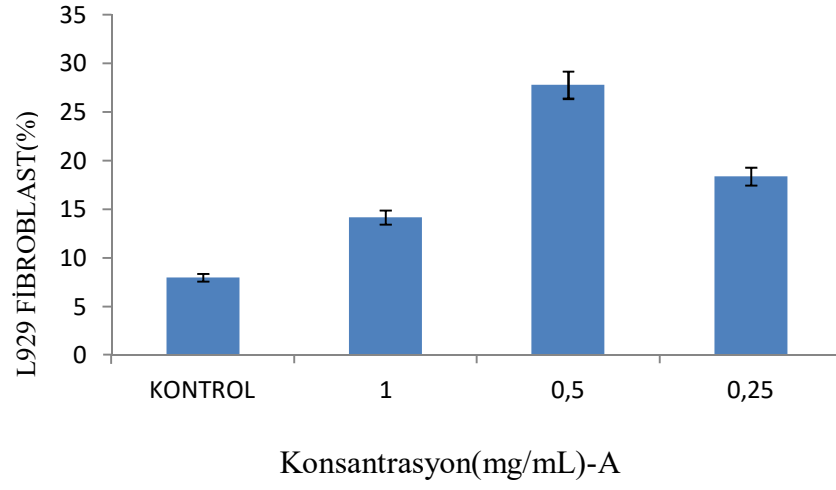
(G) Apoptotik hücreler (Kontrol)

(H) Nekrotik hücreler (Kontrol)

MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücrelerine uygulanan 1mg/mL, 0.5mg/mL konsantrasyon sonuçlarında apoptoz ve nekroz olduğu belirlendi. Konsantrasyonlar düşürüldüğünde apoptoz'un azaldığı, nekroz'un arttığı belirlendi (Şekil 3.9, 3.10).



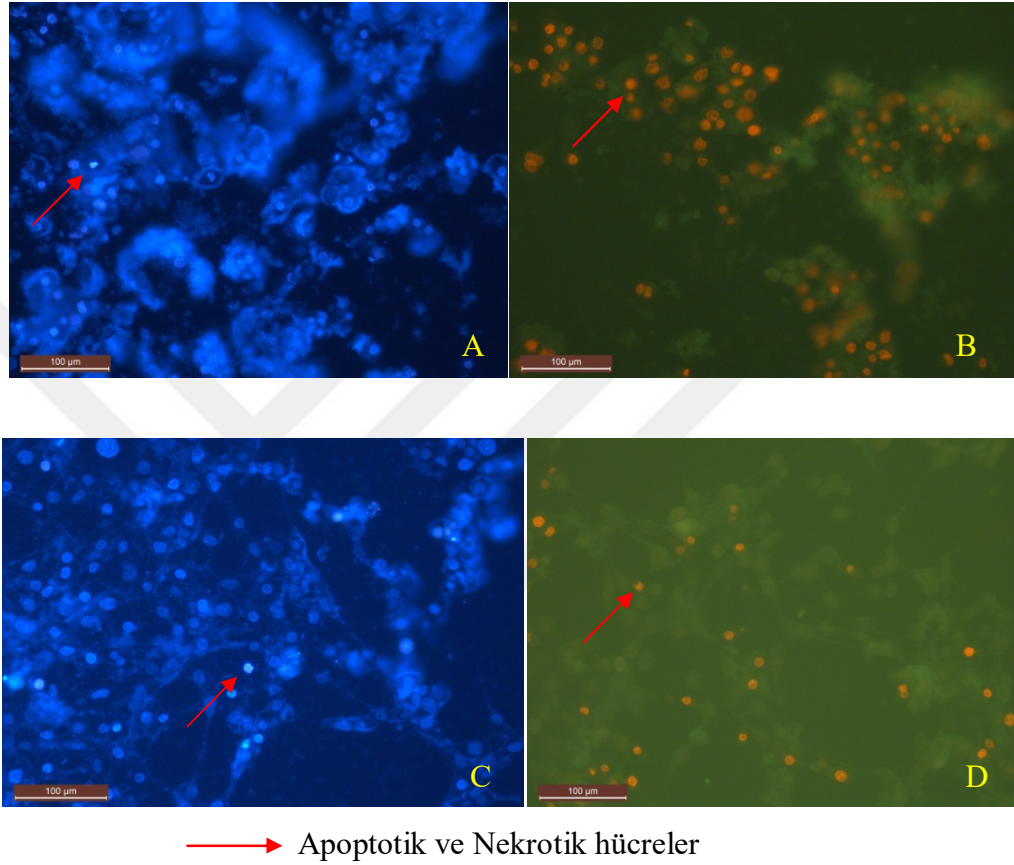
Şekil 3.9. *Amanita verna* ekstresinin MCF-7 kanser hücresinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri



Şekil 3.10. *Amanita verna* ekstresinin L929 Fibroblast hücrelerinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri

3.3.3 *Funalia trogii* Apoptoz ve Nekroz Belirlenmesi

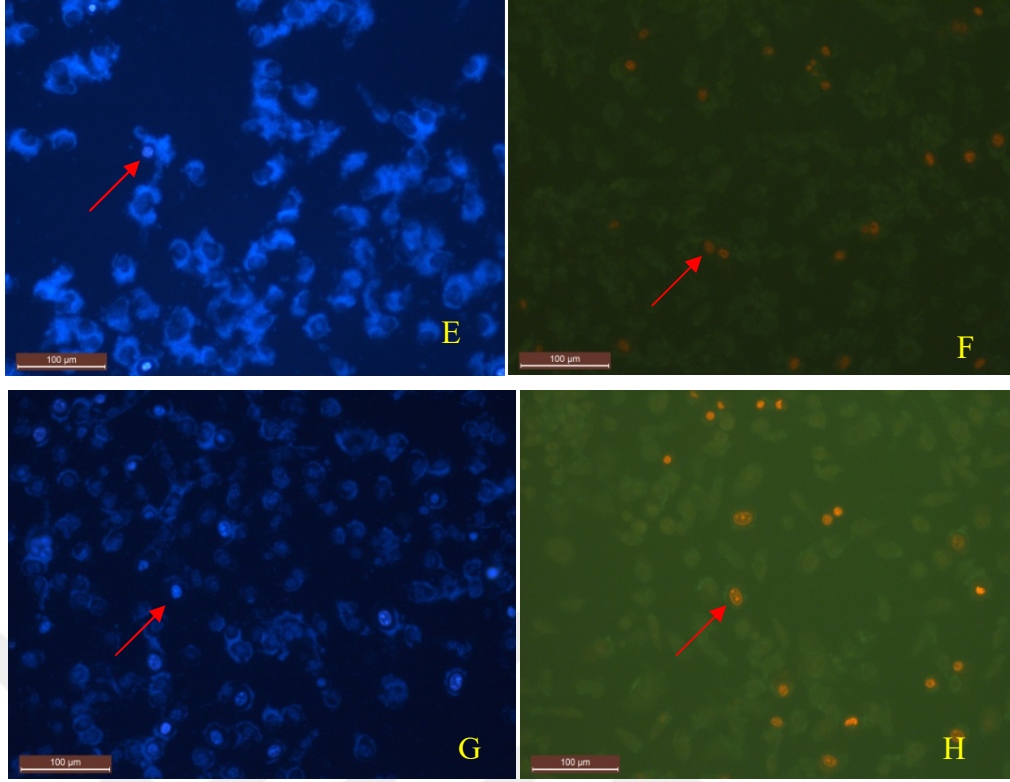
Funalia trogii'de MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelerinde apoptoz ve nekroz floresan mikroskop görüntüleri elde edildi (Şekil 3.11)



Şekil 3.11. *Funalia trogii* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

MCF-7 kanser hücrelerinde:

- (A) 1mg/mL apoptotik hücreler
- (B) 0.5mg/mL nekrotik hücreler
- (C) Apoptotik hücreler (Kontrol)
- (D) Nekrotik hücreler (Kontrol)



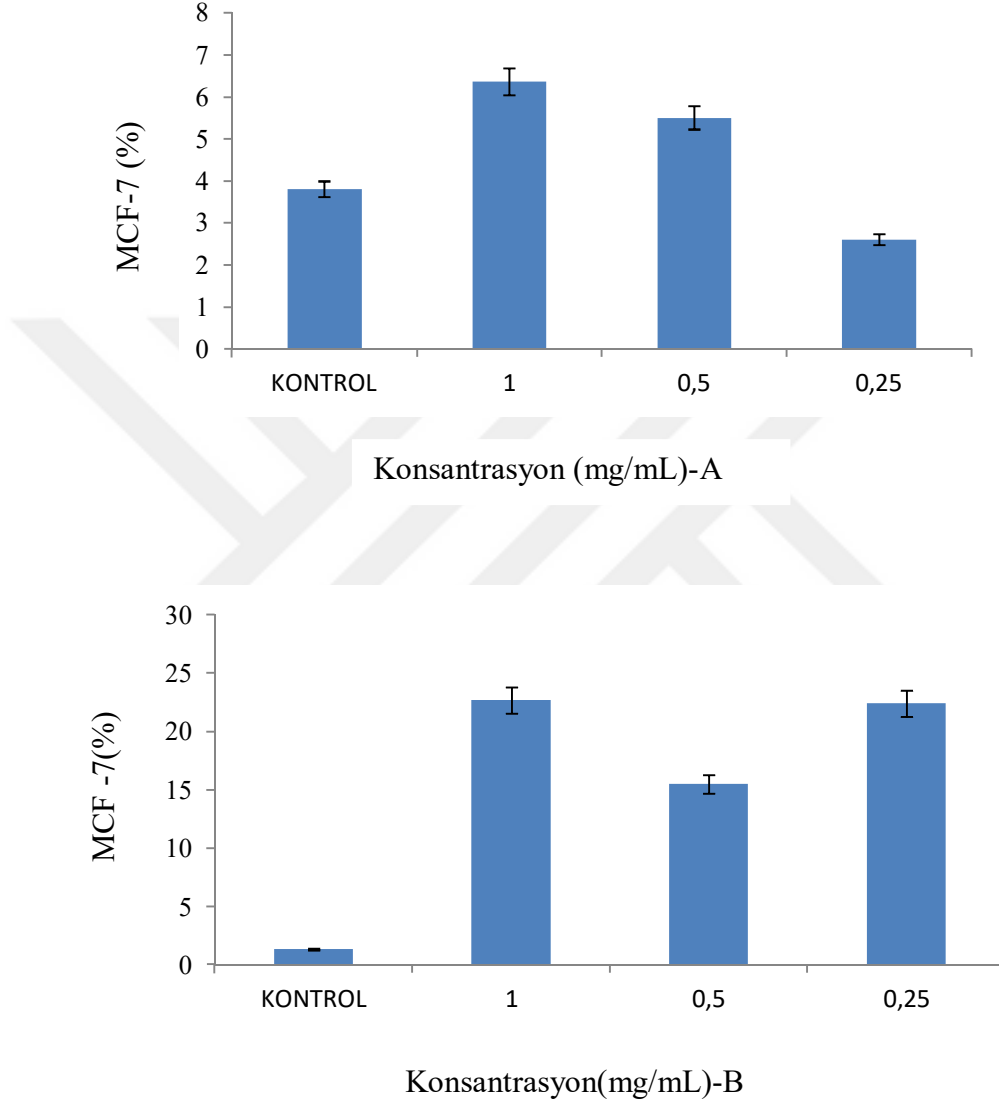
→ Apoptotik ve Nekrotik hücreler

Şekil 3.11.(Devamı). *Funalia trogii* floresan ataçmanlı mikroskop görüntüleri

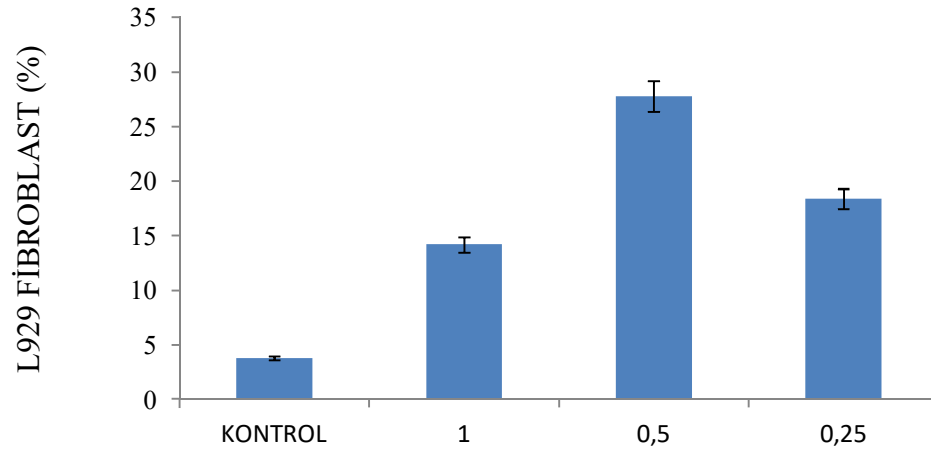
L929 Fibroblast hücrelerinde:

- (E) 1mg/mL apoptotik hücreler
- (F) 0.5 mg/mL nekrotik hücreler
- (G) Apoptotik hücreler (Kontrol)
- (H) Nekrotik hücreler (Kontrol)

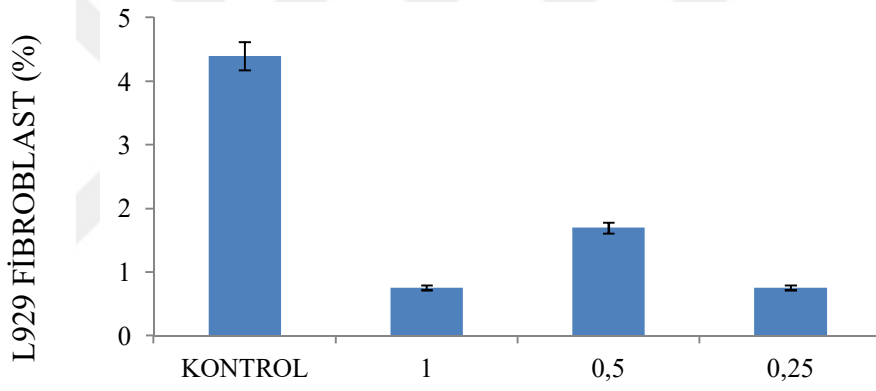
Funalia trogii'de MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelerinde belirlenen konsantrasyonlarda apoptoz ve nekroz grafikleri elde edildi (Şekil 3.12, Şekil 3.13).



Şekil 3.12. *Funalia trogii* ekstresinin MCF-7 kanser hücresinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri



Konsantrasyon(mg/mL)-A

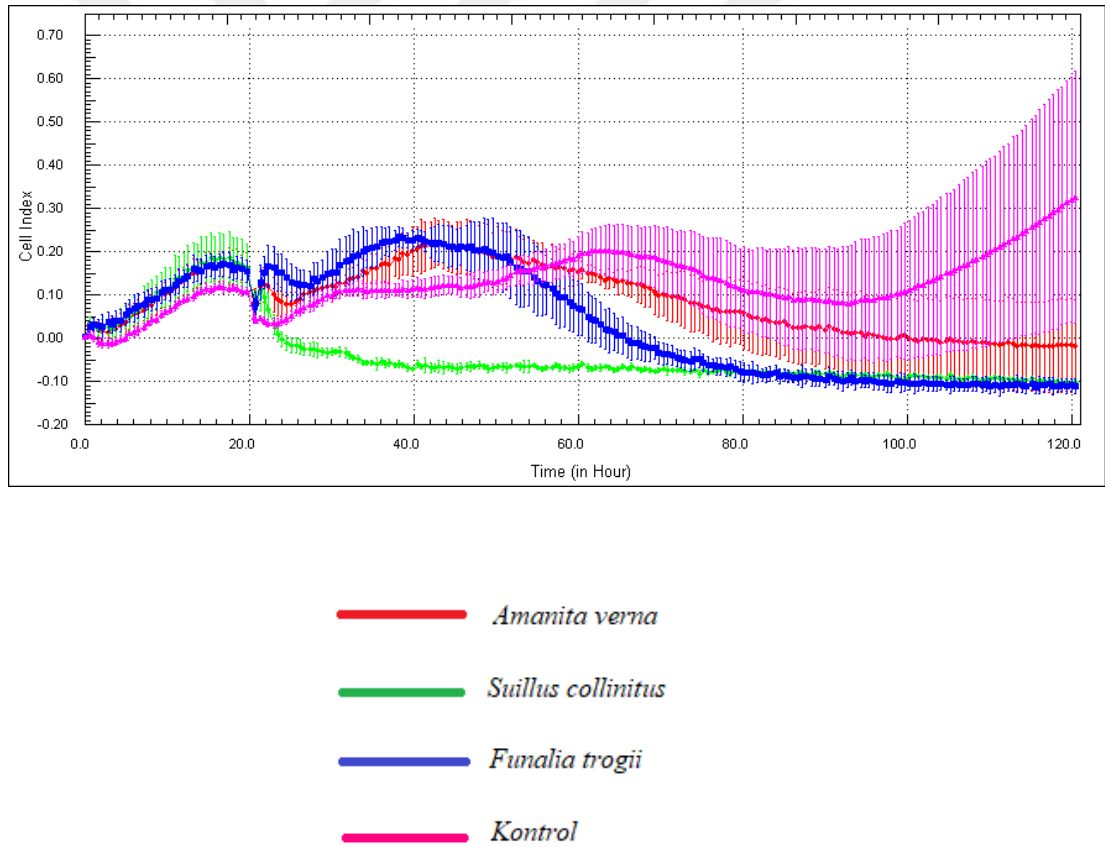


Konsantrasyon(mg/mL)-B

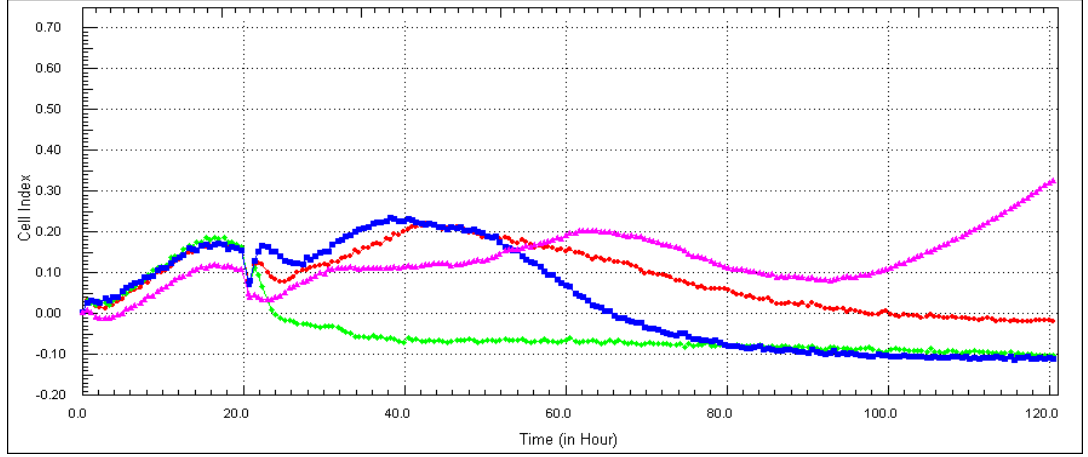
Şekil 3.13. *Funalia trogii* ekstresinin L929 Fibroblast hücrelerinde apoptoz (A) ve nekroz (B) grafikleri

3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

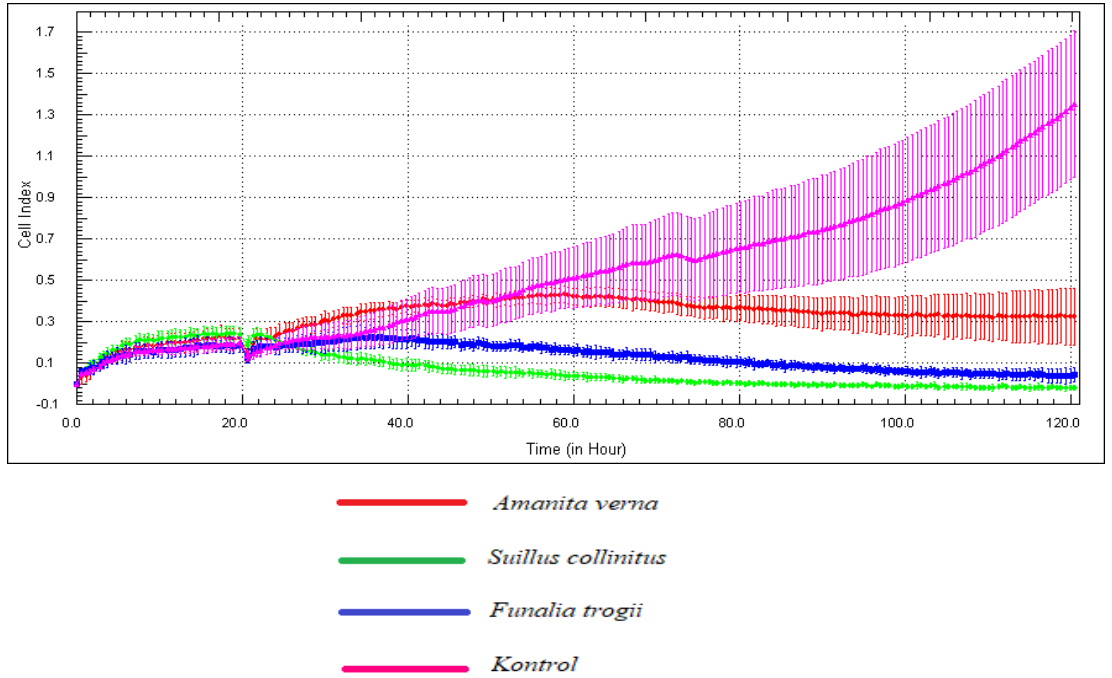
Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* mantarlarının proliferasyon sonuçları verildi (Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17). Mantar özütlerinin MCF-7 kanser hücreleri ve L929 Fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna göre sabit aralıkta olduğu belirlendi. Hücrelerde canlılığın anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre yapışma yüzeyi ve sayısı empedans olarak ölçülmektedir. Test sonucunda mantar ekstraktlarının ilavesinden bir süre sonra hücre sayısında 120 saat boyunca artış görülmemektedir.



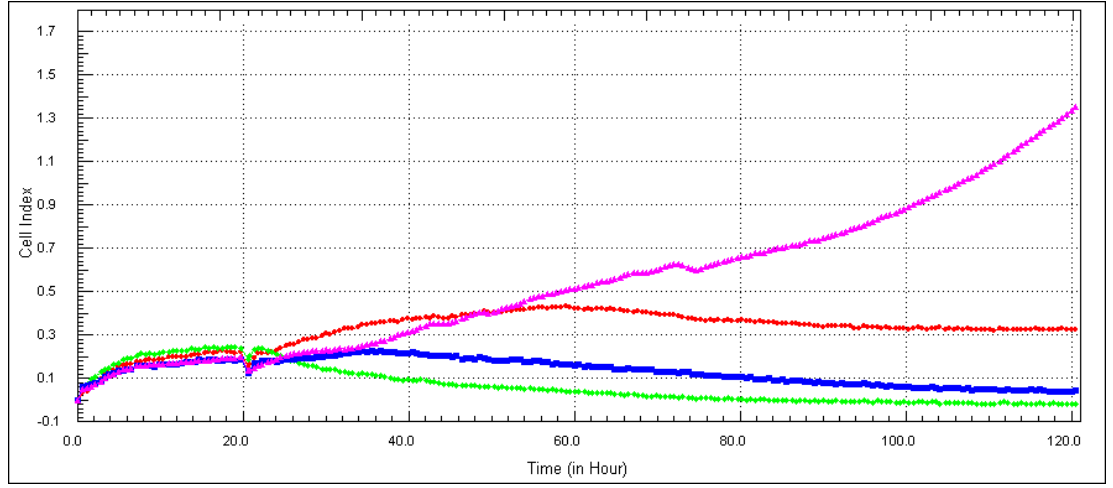
Şekil 3.14. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* uygulanan MCF-7 kanser hücresinin proliferasyon grafiği (Standart sapma)



Şekil 3.15. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* uygulanan MCF-7 kanser hücresinin proliferasyon grafiği (12.5 µg/mL)



Şekil 3.16. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* uygulanan L929 Fibroblast hücresinin proliferasyon grafiği (Standart sapma)



— *Amanita verna*
— *Suillus collinitus*
— *Funalia trogii*
— Kontrol

Şekil 3.17. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* uygulanan L929 Fibroblast hücresinin proliferasyon grafiği (12.5 µg/mL)

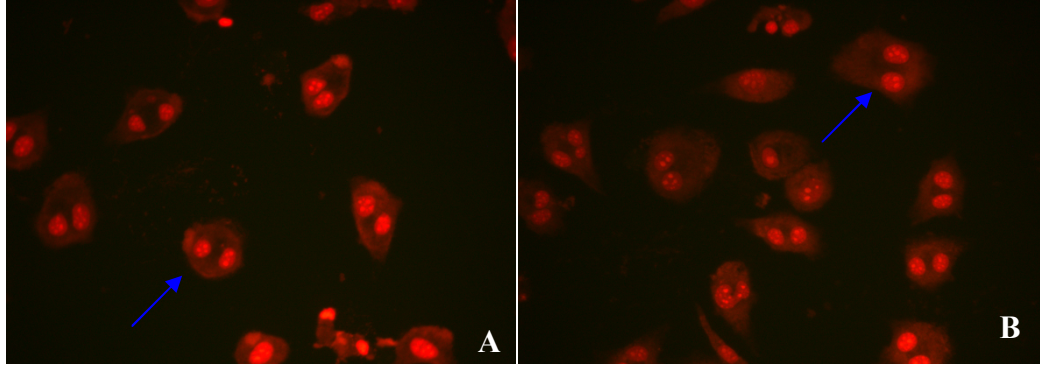
3.5. Mikronükleus Testi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

SPSS 15 ile Independent T-testi analizine göre $p > 0.05$ olduğundan % 95 güven aralığında *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* ekstralarının uygulandığı hücreler ile kontrol grubu arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (Çizelge 3.4).

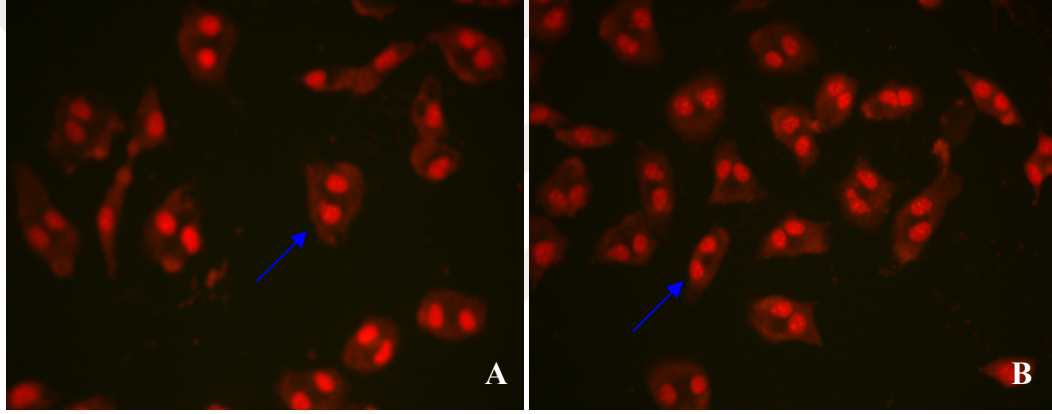
Çizelge 3.4. *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* ekstralarının uygulandığı hücrelerdeki mikronükleus sayısı

	Binükleuslu Hücrelerde Mikronükleus sayısı	
Kontrol	0±0.01	
Mantar Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	
	25 µg/mL	12.5 µg/mL
<i>Funalia trogii</i>	1±0.03	0±0.01
<i>Amanita verna</i>	1±0.02	0±0
<i>Suillus collinitus</i>	1±0.02	0±0.1

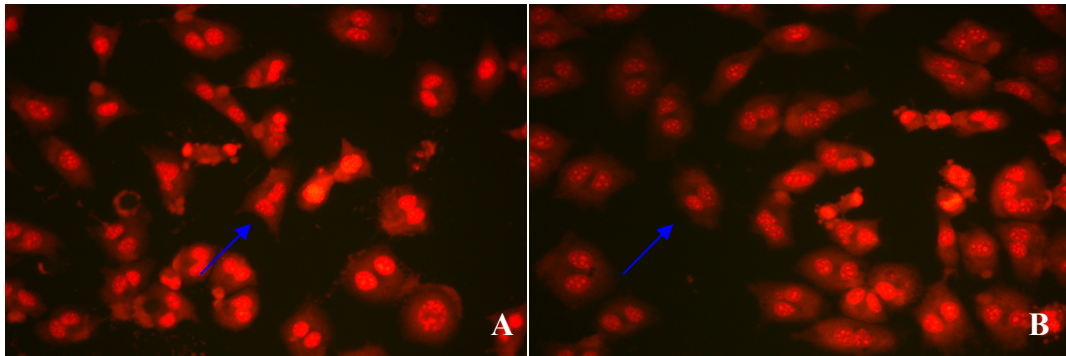
Suillus collinitus, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* ekstraları belirlenen konsantrasyonlarda (25 µg/mL, 12.5 µg/mL) CHO hücrelerine verildi. (Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21).



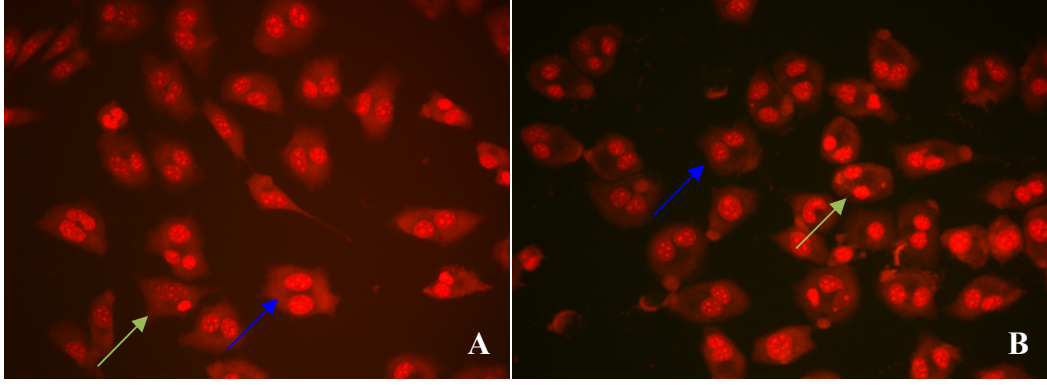
Şekil 3.18. *Funalia trogii* 12.5 µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (A) ve 25µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (B) (—→ binükleuslu hücreler).



Şekil 3.19. *Amanita verna* 12.5 µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (A) ve 25 µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (B)(—→ binükleuslu hücreler)

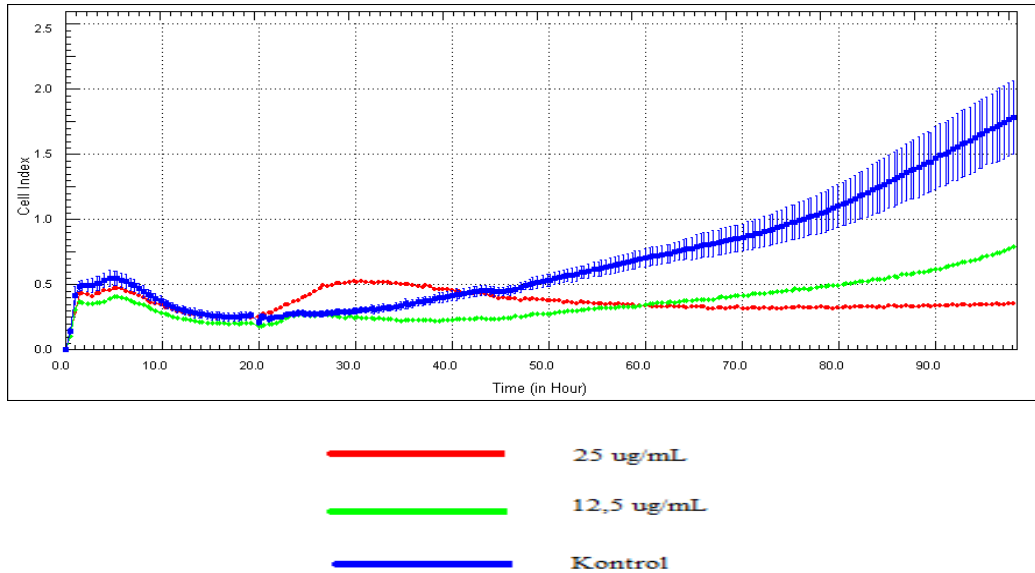


Şekil 3.20. *Suillus collinitus* 12.5 µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (A) ve 25 µg/mL uygulandığı binükleuslu hücreler (B) (—→ binükleuslu hücreler)

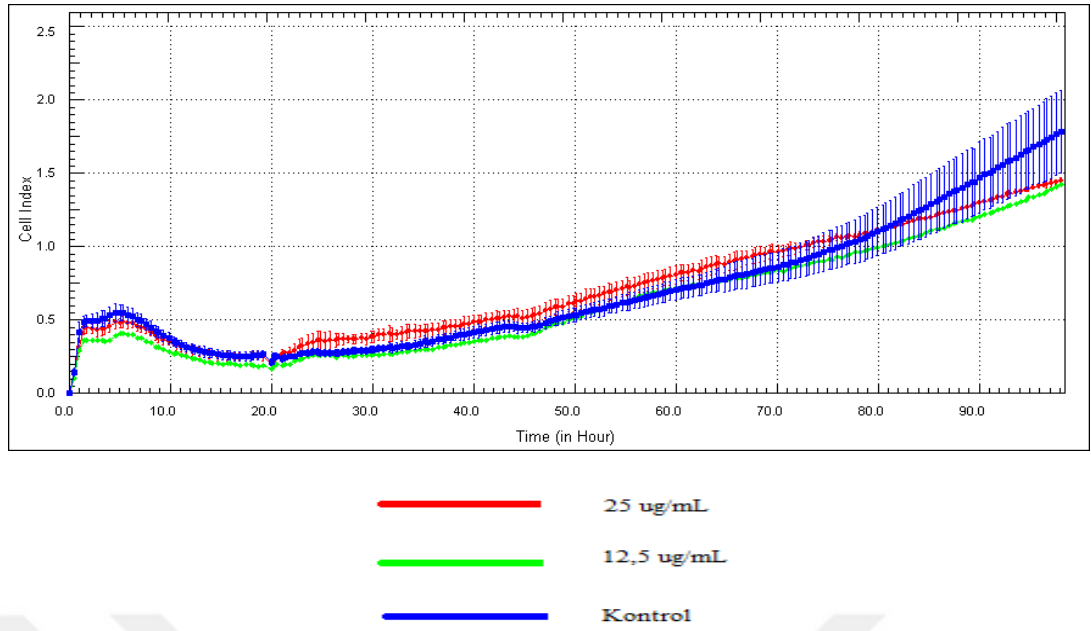


Şekil 3.21. Kontrol grubuna ait CHO hücreleri.(Yalnızca besiyeri uygulanmıştır) (A) ve Pozitif kontrol (ethymethanosulfonate uygulanmıştır) (B) (————— mikronükleuslu hücreler, ————— binükleuslu hücreler)

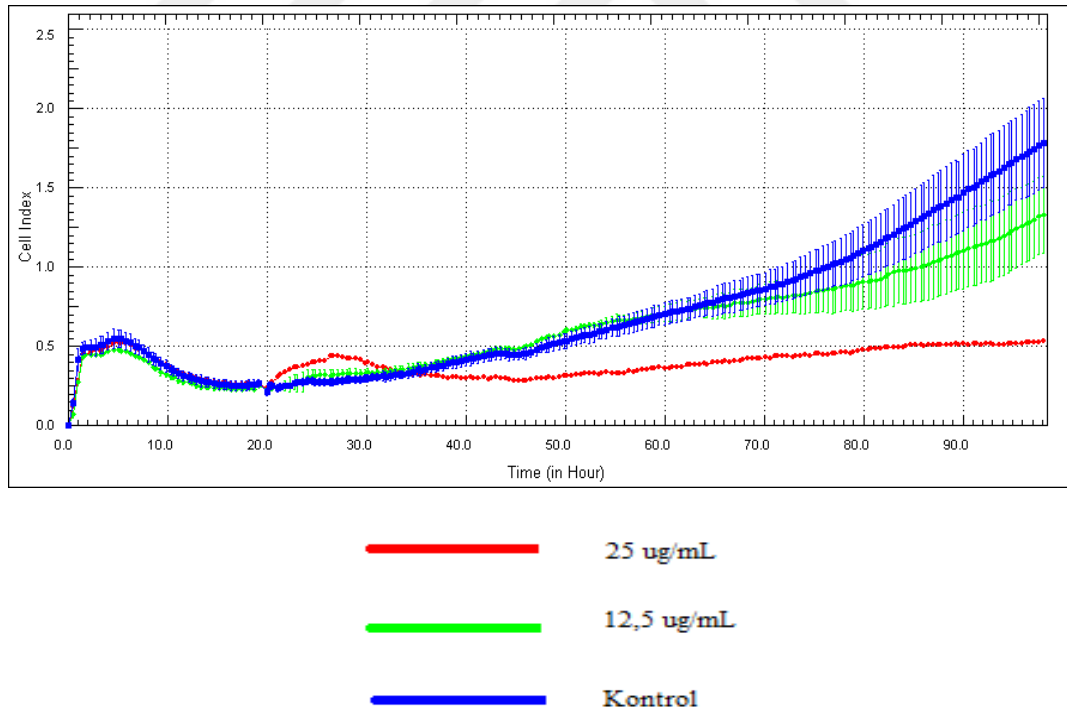
Genotoksisite testinde *Suillus collinitus*, *Amanita verna* ve *Funalia trogii* mantarlarının proliferasyon sonuçları kontrol grubuna göre sabit aralıkta olduğu belirlendi. Mantarların hücelere genotoksisite etkisinin olmadığı saptandı (Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24).



Şekil 3.22. *Suillus collinitus* ekstresinin uygulandığı CHO hücrelerine ait proliferasyon grafiği



Şekil 3.23. *Funalia trogii* ekstresinin uygulandığı CHO hücrelerine ait proliferasyon grafiği



Şekil 3.24. *Amanita verna* ekstresinin uygulandığı CHO hücrelerine ait proliferasyon grafiği

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Dünyada bilimsel ve teknolojik gelişmelerin hızla artması, kaynaklarımızın bilinçsiz tüketimi, çağımızda hastalıklara hergün bir yenisinin eklenmesi nedeniyle doğal kaynakların daha etkin kullanılması zorunluluğunu beraberinde getirmiştir. Bu zorunluluk makrofungusların önemini ortaya çıkarmıştır. Mantarların besinsel öğelerinden ziyade içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenlerin önemi artmıştır.

Makromantarların, MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücre hatlarına farklı konsantrasyonlar uygulanarak hücrelerin apoptotik, nekrotik, sitotoksikite genotoksikite ve hücre proliferasyonu etkisi incelendiği çalışmada önemli bulgular elde edilmiştir.

Son yıllarda ölümlere neden olan hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kansere karşı bir çok tedavi yöntemi oluşturulmasına rağmen henüz etkili bir çözüm bulunamamıştır. Kanser tedavisinde yoğun olarak kullanılan yöntemlerin başında cerrahi yöntem, kemoterapi, radyoterapi, immune terapi ve bitkisel yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımların etkisiz kalması bilim dünyasını farklı yöntemler aramaya yöneltmiştir. Mantarların kanser tedavisinde kullanılmasının yaygınlaşmasını sağlamıştır (Ivanova vd., 2014).

Çalışmada mantar ekstraktlarının MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelerine uygulanan konsantrasyon sonrası özellikle *Suillus collinitus*'un MCF-7 kanser hücresinde 1 mg/mL dozda %86 oranda toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda mantarın daha etkili olduğu saptanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda doz arttırımı ile paralel olarak MCF-7 kanser hücrelerinde ciddi sitotoksik etki gözlenmiştir. En yüksek sitotoksikite 1 mg/mL konsantrasyonda %86 oranında belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda L929 Fibroblast hücre hatlarında sitotoksik etki gözlenmemiştir. Eş zamanlı proliferasyon testinde uygulanan diğer konsantrasyonlarda ve türlerde ise canlılık değerlerin kontrol grupları ile yakın olduğu tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile yapılan proliferasyon testinden elde edilen sonuçlara göre ise, bütün

türlerde hücre proliferasyonunun kontrol gruplarına göre sabit kaldığı tesbit edilmektedir. Bu durum toksisite testi ile çelişiyor gibi görünse de iki farklı testte metodların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Vaz vd. (2012)'nin sonuçları ile uyum içerisinde. Araştırmacılar *Suillus collinitus* mantarının metanol ekstraktının p-53 geni üzerindeki aktivitesinin yüksek olduğunu belirlemiştir. Çalışmanın sonucunda konsantrasyon arttığında MCF-7 kanser hücrelerinin öldüğü, L929 Fibroblast hücrelerinin apoptoz ve nekroza uğramadıklarını belirlemiştir.

Amanita verna hücre kültürü çalışmaları sonucunda mantarın apoptotik ve nekrotik etkilerinin MCF-7 kanser hücre hattında 1 mg/mL ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarda nekroz'un apoptozdan yüksek olduğu ve 0.25 mg/mL konsantrasyonda nekroz etkisinin yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı konsantrasyonda L929 Fibroblast hücre hattında apoptoz ve nekroz'un 0.5 mg/mL'de yüksek olduğu belirlenmiştir. MCF-7 kanser hücrelerinde olduğu gibi L929 Fibroblast hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda apoptoz ve nekroza rastlanılmıştır. *Amanita verna* türü ekstresinin L929 Fibroblast hücrelerinde %20 apoptoz ile en yüksek oran elde edilmiştir. Nekrotik indekslere bakıldığında ise oranların çok yüksek olmadığı görülmüştür. *Amanita verna* türünde kanser hücrelerinde %35 oranında apoptotik etkiye rastlanmıştır.

Araştırmacılar *Amanita verna*'nın içerdiği amatoksinlerin zehirli maddesi α -amanitin nedeniyle öldürücü etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. α -amanitin üzerinde bulunan silibininin mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada serbest radikaller ve kan aktivitesi invitro olarak araştırılmış ve antitoksik etkilerini incelemiştir (Khunnala vd., 2009).

Funalia trogii apoptotik ve nekrotik etkileri sonucunda MCF-7 kanser hücre hattında uygulanan konsantrasyonların hepsinde apoptoz ve nekroz'a rastlanılmıştır. Ancak belirlenen seviyeler kontrol grubuna yakın seyretmektedir. Aynı konsantrasyonda L929 Fibroblast hücre hattında apoptoz'un olduğu ve nekroz'un uygulanan tüm konsantrasyonlarda etkisinin düşük olduğu belirlendi. *Funalia trogii* türünde uygulanan konsantrasyonların kontrol grubuna yakın olarak seyrettiği belirlendi. Yüksek konsantrasyonda kanser hücrelerinin gelişimini engellediği, L929 Fibroblast

hücrelerinin gelişimine olumsuz etkisinin olmadığı saptandı. Bu bulgular Patel ve Goyal, (2011)'in *Funalia trogii* ile yaptıkları çalışma ile örtüşmektedir. Araştırmacılar mantar miselleriyle belirli ölçüde sitotoksik etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Mantar ekstresinin L929 Fibroblast hücrelerinde, hücre ölümlerine rastlanmadığı, tümörlü hücrelerde büyümenin yavaşladığı belirlenmiştir.

Hücre proliferasyonu testinde MCF7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelerinde mantarların değerlerinin kontrol grubuna yakın aralıklarda olduğu belirlenmiştir. Hücre sayısında anlamlı bir artış görülmemiştir. Hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine yapılan bazı çalışmalarda, mantar bileşiklerinin hücre proliferasyonunu durdurduğu, apoptozu artırdığı A549, HT29, PC-3 DF-1 kanser hücre hatlarında gösterilmiştir (Takei vd., 2005; Lavi vd., 2006; Kumar vd., 2015; Çöl vd., 2017).

Genotoksisite CHO hücre hattında yapılan mikronükleus testi ile gösterilmiştir. Uygulanan mantar ekstrelerinin hiçbirinde mikronükleus tespit edilmemiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen bu veriler literatürde belirtilen sonuçlarla örtüşmektedir. Mantar bileşikleri ile yapılan in vitro genotoksisite ve mutajenite testlerinde genotoksik ve mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Aksine bu bileşikler genotoksik ve mutajenik kimyasallarla birlikte hücrelere uygulandığında bu etkilerini mantar bileşikleri tarafından engellendiği tesbit edilmiştir. Önceki çalışmalarda mantarlardan elde edilen bileşikler genellikle genotoksisiteyi ve mutasyonu önleyici, tümör büyümesini yavaşlatması üzerinde durulmuştur (Thyagarajan vd., 2010; Chen vd., 2013).

Sonuç olarak, yapılacak uygulamalarda mantar ekstresinin yerine saflaştırılmış bileşiklerin kullanılması etki mekanizmasının açıklanması açısından daha anlamlı olacağı, literature bakıldığında mantar bileşiklerinin doğrudan anti kanserojen etkisinin yanında, diğer kanser ilaçları ve uygulamaları ile kullanılmasının tedavide önemli bir destek sağladığı görülmektedir.

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen bu çalışmalar, günümüzde önemi giderek artmakta olan alternatif tıp alanına öncülük edecek niteliktedir. Ülkemizde kanser üzerine yapılan çalışmalarda mantar türlerinin kullanımının oldukça az olduğu

literatür araştırmalarından anlaşılmaktadır. Ülkemiz Kırıkkale İli yöresinden toplanan makromantarların MCF-7 kanser hücresi ve L929 Fibroblast hücrelerine etkisinin araştırılması, doğal kaynakların etkin kullanımı ve kullanımının yaygınlaştırılması bakımından önem taşımaktadır. Yaptığımız çalışma ile mantarların içeriğinde bulunan aktif bileşenler izole edilerek insanlığın kullanımına sunulmasıyla kimyasal bileşimli ilaçların kullanımının azaltılacağı düşünölmektedir. Bu tür çalışmalar kemoterapik kanser çalışmalarında yeni materyal ve yöntemlerin oluşumuna katkı sağlayacaktır.

Elde edilen bulgular ışığında mantarların günümüzde ve gelecekte sağlık alanında daha etkin olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar dikkate alındığında mantarların antikanser çalışmalarına referans olacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- Ajith, T. A., Janardhanan, K. K., Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40 (3): 157-162, 2007.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 (17): 7915-7922, 1993.
- Annamalai, P., Thayman, M., Rajan, S., Raman, L. S., Ramasubbu, S., Perumal, P., Ethyl acetate extract from marine sponge *Hyattella cribriformis* exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. *Pharmacogn Mag.* 11 (42) :345-55, 2015.
- Anonim 2018a, Kanser <https://kanser.org/saglik/toplum/pdf/knedir.pdf> (Erişim tarihi: (04/05/2018).
- Anonim 2018b, Kanser Gelişimi. <http://www.kansertedavisi.web.tr/kanser-nedir/kanser-gelisimi> , (Erişim Tarihi : 17.04.2018).
- Anonim 2018c, <http://muratkizilaltun.blogspot.com.tr/2015/10/10-snf-biyoloji-hucre-bolunmesi-mitoz.html>, (Erişim Tarihi:18.05.2018).
- B. G. Bayuk, Acıpayam (Denizli) Yöresinde Yetişen Makrofunguslar Üzerine Taksonomik Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2016.
- Barisic, K., Petrik, J., Rumora, L., Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.*, 53: 151-164, 2003.

- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş., Alvur, M., DNA hasarı analizinde μ -fadu ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3): 97-103, 2004.
- Benedict, C. V., Cook, W. J., Jarrett, P., Cameron, J. A., Huang, S. J., Bell, J. P., Fungal degradation of polycaprolactones. *Journal of Applied Polymer Science*, 28 (1): (1983).
- Benedict, R.G., L.R. Brady, Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *Jour. of Pharmaceutical Sciences* 61 (11): 1820- 182, 1972.
- Buzin, A.R., Pinto, F.E., Nieschke, K., Mittag, A., De Andrade T.U., Endringer D.C., Lenz, D., Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 420: 24-30, 2015.
- Chen, S., Ge, W., Buswell, J. A., Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: Possible involvement in fruit body development. *Fems Microbiology Letters*, 230 (2): 171-176, 2004.
- Chen, T. I., Zhuang, H. W., Chiao, Y. C., Chen, C. C., Mutagenicity and genotoxicity effects of *Lignosus rhinocerotis* mushroom mycelium. *Journal of Ethnopharmacology*, 149 (1): 70-74, 2013.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y., Fukuoka, F., Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (an edible mushroom). *Cancer Research*, 30 (11): 2776-2781, 1970.
- Choy, W. N., Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Crc Press, 2001.

- Clapp, R. W., Howe, G. K., Jacobs, M. M., Environmental and occupational causes of cancer: a call to act on what we know. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61 (10): 631-639, 2007.
- Cohen, J.J., Apoptosis. to be or not to be. *Postgraduate Syllabus (Aaaa-I)* 1: 1-19, 1998.
- Conchran, K.W., Medicinal Effects, in: *The biology and cultivation of edible mushrooms* (Ed. Chung, S.T. ve Hayes, W.A.), Academic Press, New York, 1978.
- Cui, J., Chisti, Y., Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21 (2): 109-122, 2003.
- Çöl, B., Balcı, E., Güneş, H., Allı, H., *Schizophyllum commune* Fr. türünden misel eldesi, moleküler tanımlanması ve antitümör etkisinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21 (2): 586-591, 2017.
- Daba, A. S., Ezeronye, O. U., Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12): 672-678, 2003.
- Demirhan, A., Yesil, O. F., Yildiz, A., Gul, K., A research on antimicrobial activity of some macrofungi species. *Science and Engineering Journal of Firat University*, 19 (4): 425-433, 2007.
- Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W., Costales, C., Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 630 (1): 1-13, 2007.
- Duman, R., Doğan, H. H., Ateş, A., *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) Sf Gray, makrofunguslarının antimikrobiyal aktiviteleri 1. Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Fen Dergisi, 1(22): 19-24, 2003.

- Eraslan, H. G., Güler, P., *Psathyrella condolleana* ve *Psathyrella spadiceogrisea*'nın *Aspergillus* türleri üzerinde antifungal aktivitesi. *Life Sciences*, 12 (4): 42-47, 2017.
- Erdoğan, B. B., Uzaslan, E. K., Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Türkiye Klinikleri Archives of Lung (Akciğer arşivi)*, 4 (3): 165-174, 2003.
- Fritsche, G., Experiments on the maintenance of strains of cultivated mushroom. III. Propagation by multispore culture. *Mushroom News*, 20 (8): 4-19, 1972.
- G. Akbaş, *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers.'nin Antioksidan, Antimikrobiyal Etkilerinin ve Yağ Asiti Kompozisyonunun Belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- Galle, P. R., Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 27: 405-412, 1997.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., Protein Sentezi, Hücre Fonksiyonu ve Hücre Çoğalmasının Genetik Kontrolü, *Tıbbi Fizyoloji*, 10th Ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti, 24-37, 2001.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardioloji Derneği Arşivi*, 36 (2): 120-130, 2008.
- Herceg, Z., Hainaut, P., Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 1 (1): 26-41, 2007.
- Huhtala, A., Alajuuma, P., Burgalassi, S., Chetoni, P., Diehl, H., Engelke, M., Salminen, L., A collaborative evaluation of the cytotoxicity of two surfactants by using the human corneal epithelial cell line and the WST-1 test. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 19 (1): 11-21, 2003.

- Huppertz, B., Frank, H. G., Kaufmann, P., The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, 200 (1): 1-18, 1999.
- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., Fukuoka, F., Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29 (3): 734-735, 1969.
- Ivanova, T. S., Krupodorova, T. A., Barshteyn, V. Y., Artamonova, A. B., Shlyakhovenko, V. A., Anticancer substances of mushroom origin. *Experimental Oncology*, (36, 2): 58-66, 2014.
- Jena, G. B., Kaul, C. L., Ramarao, P., Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ich guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34 (2): 86-99, 2002.
- Jiang, J., Slivova, V., Valachovicova, T., Harvey, K., Sliva, D., *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International Journal of Oncology*, 24 (5): 1093-1099, 2004.
- Jiao, C., Xie, Y. Z., Yang, X., Li, H., Li, X. M., Pan, H. H., Cai, M.H., Zhong, H.M., Yang, B. B., Anticancer activity of *Amauroderma rude*. *PLoS One*, 8 (6): e66504, 2013.
- Kalyoncu, F., Oskay, M., Kalmış, E., Bazı yabani makrofungus misellerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. *Mantar Dergisi*, 1 (1): 1-8, 2010.
- Khunnala, A., Narongchai, S., Butkrachang S, Leelarungrayub D, Naronchai P., Anti-oxidative stress of silibinin on α -amanitin in vitro. *Thai J Toxicology*, 24 (2): 106-112, 2009.
- Kosova, F., Arı, Z., Adipositokinler ve meme kanseri. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, 22 (6): 377-84, 2008.

- Kumar, G., Tuli, H. S., Mittal, S., Shandilya, J. K., Tiwari, A., Sandhu, S. S., Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumor Biology*, 36 (6): 4005-4016, 2015.
- Kumaran, S., Pandurangan, A. K., Shenbhagaraman, R., Esa, N. M., Isolation and characterization of lectin from the artist's conk medicinal mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), and evaluation of its antiproliferative activity in HT-29 colon cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19 (8): 675-684, 2017.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., Schwartz, B., An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, 244 (1): 61-70, 2006.
- Liu, G. Q., Zhang, K. C., Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst.: A new understanding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47 (2): 129-135, 2005.
- Li, G., Yu, K., Li, F., Xu, K., Li, J., He, S., Tan, G., Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *Journal of Ethnopharmacology*, 153 (2): 521-530, 2014.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., Jülich, W. D., The pharmacological potential of mushrooms. *evidence-based complementary and alternative medicine*, 2 (3): 285-299, 2005.
- Liu, K., Wang, J., Zhao, L., Wang, Q., Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 375-380, 2013.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, Sl., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, Je., *Molecular cell biology*. 4 Edition: Whfreemanandco, Newyork, 2000.

- Lowitz, B. B., Casciato, D. A., Manual of Clinical Oncology, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L., Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food Chemistry, 73 (3): 321-325, 2001.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., Chromosomal changes: Induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie, 88 (11): 1515-1531, 2006.
- Mizuno, T., Yokohui, P., Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, Y., Antitumor activity and chemical modification of polysaccharides from *Niohshimeji* mushroom, *Tricholma giganteum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60 (1): 30-33, 1996.
- Nagata, S., Apoptosis by death factor. Cell, 88 (3): 355-365, 1997.
- Ng, T. B., Ngai, P. H., Xia, L., An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. Mycologia, 98 (2): 167-171, 2006.
- Ooi, V. E., Liu, F., Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Current Medicinal Chemistry, 7 (7): 715-729, 2000.
- Ö. Özdemir, *Terfezia boudieri* (Chatin), *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Phellinus igniarius* (L.) Quél. ve *Tricholoma anatolicum* HH Dogan ve Intini'nin Meme Kanseri Hücrelerine Antikanser ve Modülasyon Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- Özdemir, C., Mantar Yetiştiriciliği. T.C. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi Yayın Şubesi, Samsun, 2010.
- Öztürk, A., Çopur, Ö. U., Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. Bahçe, 38 (1): 19-24, 2014.

- Papadopoulos, E. I., Yousef, G. M., Scorilas, A., Gemcitabine impacts differentially on bladder and kidney cancer cells: distinct modulations in the expression patterns of apoptosis-related micrnas and bcl2 family genes. *Tumor Biology*, 36 (5): 3197-3207, 2015.
- Parlakpınar, H., Koç, M., Acet, A., The effects of apoptosis and melatonin levels on aging. *T Klin Tıp Bilimleri*, 24: 62-67, 2004.
- Patel, S., Goyal, A., Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. *3 Biotech*, 2 (1): 1-15, 2012.
- Patel, S., Goyal, A., Recent developments in mushroom as anti-cancer therapeutics: A review. DOI: 10.1007/s13205-011-0036-2, 2011.
- Pompei, L.M., Cunha, E.P., Steiner, M.L., Theodoro, T.R., Mader, A.M., Petri G., Pinhal, M.A.S., Fernandes, C.E., Effects of estradiol, progestogens, and of tibolone on breast proliferation and apoptosis. *Journal Climacteric*, 1-5. 5, 2015.
- Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., Mcfee, A.F., Wolff, S., Wassom, J. S., Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the US Epa's gene-tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 87 (2): 143-188, 1981.
- Pythoud, C., Rothenberger, S., Martinez-Sobrido, L., de la Torre, J.C., Kunz, S., Lymphocytic choriomeningitis virus differentially affects the virus-induced type I interferon response and mitochondrial apoptosis mediated by RIG-I/Mavs. *J Virol.*, 89: 6240-50, 2015.
- Rangkhawong, P., Issaranuwat, P., Gaensakoo, R., Mycelial fermentation in submerged culture of *Schizophyllum commune* and its properties. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*, 33 (5): 420-427, 2014.

- Ranz, W. E., Marshall, W. R., Evaporation from drops. Chem. Eng. Prog, 48 (3): 141-146, 1952.
- Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., McKeown, S. R., Worthington, J., Banat, I. M., A Study of anti cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol, 49: 1477-1483, 2011.
- Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., McKeown, S. R., Banat, I. M., Worthington J., Potential of a *Funalia trogii* laccase enzyme as aN anticancer agent. Annals of microbiology 65 (1), A5-183, 2015.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (22): 8530-8537, 2006.
- Rouhana-Toubi, A., Wasser, S. P., Fares, F., The shaggy ink cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (higher basidiomycetes) extract induces apoptosis in ovarian cancer cells via extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. Int J Med Mushrooms, 17 (12): 1127-1136, 2015.
- 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.
- S. Tuncer, Çoklu İlaça Dirençli Kanser Hücre Hattına Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, 2014.
- Sarang, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., Maiti, T. K., Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. International Immunopharmacology, 6 (8): 1287-1297, 2006.

- Selvi, S., Umadevi, P., Murugan, S., Senapathy, J. G., Anticancer potential evoked by *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* using T 24 urinary bladder cancer cell line. African Journal of Biotechnology, 10 (37): 7279-7285, 2011.
- Sliva, D., *Ganoderma lucidum* (Reishi) cancer treatment. Integrative Cancer Therapies, 2 (4): 358-364, 2003.
- Smith, J., Rowan, N., Sullivan, R., Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Special Report Commissioned by Cancer Research UK. The universty of strathclyde in Glasgow P, 256, 2002.
- Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Kobori, M., Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69 (1): 212-215, 2005.
- Tangen, J. M., Holien, T., Mirlashari, M. R., Misund, K., Hetland, G., Cytotoxic effect on human myeloma cells and leukemic cells by the *Agaricus blazei* murill based mushroom extract, Andosan™. BioMed Research International, 2017.
- Thillaimaharani, K. A., Sharmila, K., Thangaraju, P., Karthick, M., Kalaiselvam, M., Studies on antimicrobial and antioxidant properties of oyster mushroom *Pleurotus florida*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4 (4): 1540, 2013.
- Thyagarajan, A., Jedinak, A., Nguyen, H., Terry, C., Baldrige, L. A., Jiang, J., Sliva, D., Triterpenes from *Ganoderma lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). Nutrition and Cancer, 62 (5): 630-640, 2010.
- Tomatır, A. G., Apoptoz; Programlı hücre ölümü. T. Klin. J. Med. Sci., 23: 499-508, 2003.

- Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Sun, X., Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, 100 (4): 1682-1686, 2009.
- Ulukaya, E., Kurt, A., Wood, E. J., 4-(N-hydroxyphenyl) retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts. *Cancer Investigation*, 19 (2): 145-154, 2001.
- Ünyayar, A., Demirbilek, M., Türkoğlu, M., Çelik, A., Mazmancı, MA., Erkut, E. A., Ünyayar, S., Çekiç, Ö., Atacağ, H., Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 29 (1): 69-83, 2006.
- Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Tavares, C., Almeida, G. M., Martins, A., Vasconcelos, M. H., *Suillus collinitus* methanolic extract increases p-53 expression and causes cell cycle arrest and apoptosis in a breast cancer cell line. *Food Chemistry*, 135 (2): 596-602, 2012.
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C., Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10): 2881-2884, 2010.
- Vural, N., Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73: 381, 2005.
- Wang, F. F., Liu, F., Shi, C., Ma, W., Wang, K. J., Li, N. (Cytotoxic activities of fractions of the willow bracket medicinal mushroom, *Phellinus igniarius* (Agaricomycetes), and the induction of cell cycle arrest and apoptosis in MGC-803 cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19 (6): 561-570, 2017.
- Wang, H. X., Liu, W. K., Ng, T. B., Ooi, V. E. C., Chang, S. T., Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma sp.*, A local edible mushroom. *Life Sciences*, 57 (3): 269-281, 1995.

- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Cai, G., An, S., Wang, X., Wang, D., *Tricholoma matsutake* aqueous extract induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis via caspase-dependent mitochondrial pathway. *BioMed Research International*, 2016.
- Willingham, M. C., Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47 (9): 1101-1109, 1999.
- Wu, J., Zhou, J., Lang, Y., Yao, L., Xu, H., Shi, H., Xu, S., A Polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51 (4): 663-667, 2012.
- Y. Saldır, Bazı Mantarların Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
- Yakupoğlu, G., Pekşen, A., Çay atığından hazırlanan farklı kompost ve partikül büyüklüğünün *Ganoderma lucidum* mantarının verimi ve bazı morfolojik özellikleri üzerine etkisi. *Ekoloji*, 20 (78): 41-47, 2011.
- Yalın, S., Çömelekoğlu, Ü., Mazmancı, B., Ballı, E., Eroğlu, P., Söğüt, F., Berköz, M., Mazmancı M.A., Yalın, E., Ünyayar, A., Effect of *Funalia troglia* in heart tissue of rats exposed to deltamethrin. *Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi*, 37 (3): 239-244, 2012.
- Zeiger, E., History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44 (5), 363-371, 2004.
- Zhao, C., Sun, H., Tong, X., Qi, Y., An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*, 374 (Pt 2): 321, 2003.