

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MANTAR POLİSAKKARİTLERİNİN İZOLASYONU,  
ANTİKANSER, ANTİBİYOFİLM VE ANTIENFLAMATUVAR  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DOĞUKAN MUTLU**

**DENİZLİ, EKİM 2022**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**MANTAR POLİSAKARİTLERİNİN İZOLASYONU,  
ANTİKANSER, ANTİBİYOFİLM VE ANTİENFLAMATUVAR  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DOĞUKAN MUTLU**

**DENİZLİ, EKİM 2022**

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2021FEBE023 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**Doğukan MUTLU**

## ÖZET

**MANTAR POLİSAKKARİTLERİNİN İZOLASYONU, ANTİKANSER,  
ANTİBİYOFİLM VE ANTİENFLAMATUVAR ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ  
DOKTORA TEZİ  
DOĞUKAN MUTLU  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)**

**DENİZLİ, EKİM 2022**

Mantarlar yüzyıllardır gıda ve ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır. Mantarlar içerdikleri çok sayıda biyoaktif bileşik nedeniyle fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilir. Günümüzde kimyasal yapılarını ve biyolojik aktivitelerini ortaya çıkarmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Sağlıklı dokulara zarar vermeyen hedefe yönelik kanser tedavisi ise son yıllarda önemli bir hedef haline gelmiştir. Ayrıca, doğal ürünlerin antibiyofilm etkileri de son yıllarda popüler bir araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmada, *Gyromitra esculenta*, *Lyophyllum decastes*, *Albatrellopsis flettii* ve *Lactarius chrysorrheus*'tan su ekstraksiyonu ve alkol çöktürmesi yoluyla izole edilen polisakkarit ekstraktının biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, MTT testi, Annexin V boyaması ve qRT-PCR yöntemi ile sitotoksik potansiyeli ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bunun yanında koloni formasyon, yara iyileşmesi, invazyon kapasitesi ve antioksidan testleri kullanılmıştır. Ayrıca, *Bacillus cereus* ve *Streptococcus mutans* tarafından üretilen biyofilme karşı antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Aynı zamanda çalışmada polisakkaritlerin antienflamatuvar etkilerini belirlemek için LPS ile uyarılan RAW264.7 hücre hattı üzerinde Griess yöntemi ve qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar, *G. esculenta*, *A. flettii* ve *L. chrysorrheus* polisakkaritlerinin önemli antikanserojenik aktiviteye sahip olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, *S. mutans* ve *B. cereus*'a karşı biyofilm eradikasyon aktivitesi elde edilmiştir. Genel olarak, çalışmamız yeni antikanser ve antibakteriyel ajanların geliştirilmesinde *G. esculenta*, *A. flettii* ve *L. chrysorrheus* polisakkaritlerinin kullanımını için yeni bir bakış açısı sağlamıştır.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Mantarlar, antikanser, antibiyofilm, antienflamatuvar, polisakkarit

# ABSTRACT

## ISOLATION OF POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS AND DETERMINING THEIR ANTICANCER, ANTIBIOFILM, AND ANTIINFLAMMATORY EFFECTS

PhD THESIS

DOGUKAN MUTLU

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SEVKI ARSLAN)

DENIZLI, OCTOBER 2022

Mushrooms have been used for centuries as a source of food and medicine. Mushrooms are considered functional foods because of the numerous bioactive compounds they contain. Nowadays, they have been intensively studied to reveal their chemical structures and biological activities. Targeted cancer therapy, which is not harmful to healthy tissues, has become a desirable target in recent years. Moreover, the antibiofilm effects of natural products have also been a popular research topic in the last few decades. In this study, it was aimed to determine the biological activities of the polysaccharide extract isolated from *Gyromitra esculenta*, *Lyophyllum decastes*, *Albatrellopsis flettii*, and *Lactarius chrysorrheus* by water extraction and alcohol precipitation. In this context, cytotoxic potential and apoptotic effects were investigated by MTT assay, Annexin V staining, and qRT-PCR method. In addition, colony formation, wound healing ability, invasion capacity and antioxidant activities were also tested in this study. Also, the antibiofilm activity has been investigated against the biofilm produced by *Bacillus cereus* and *Streptococcus mutans*. At the same time, the Griess method and qRT-PCR studies were carried out on the LPS stimulated RAW264.7 cell line to determine the antiinflammatory effects of the polysaccharides in the study. The results showed that *G. esculenta*, *A. flettii*, and *L. chrysorrheus* polysaccharides may have high anticarcinogenic activity. Furthermore, biofilm eradication activity was obtained against *S. mutans* and *B. cereus*. Overall, our study provided new insight into the usage of polysaccharides of *G. esculenta*, *A. flettii* and *L. chrysorrheus* in the development of novel anticancer and antibacterial agents.

**KEYWORDS:** Mushrooms, anticancer, antibiofilm, antiinflammatory, polysaccharide

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
ÖNSÖZ.....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Geleneksel Tıp ve Mantarlar.....	2
1.1.1 Tıbbi Mantarlar.....	3
1.1.2 Tıbbi Mantarlardan İzole Edilen Polisakkaritler.....	5
1.1.2.1 Antikanser Ajanlar Olarak Mantar Polisakkaritleri.....	6
1.1.2.2 Polisakkaritlerin Antioksidan ve Antienflamatuvar Etkileri.....	9
1.1.2.3 Polisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	12
1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Mantarlar.....	15
1.2.1 <i>Gyromitra esculante</i> Pers. ex Fr.....	15
1.2.2 <i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Singer.....	16
1.2.3 <i>Albatrellopsis flettii</i> (Morse ex Pouzar) Audet.....	16
1.2.4 <i>Lactarius chrysorrhoeus</i> Fr.....	16
<b>2. YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
2.1 Malzemeler.....	18
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	18
2.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	18
2.2 Mantar Türlerinin Toplanması ve Teşhisi.....	19
2.3 Ekstraksiyon İşlemleri.....	19
2.4 Memeli Hücre Kültürü ve Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	20
2.5 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	21
2.6 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi.....	21
2.7 Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi.....	21
2.8 Antienflamatuvar Etkilerin Belirlenmesi.....	22
2.9 Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS)'nin Belirlenmesi.....	23
2.10 Apoptozun Belirlenmesi.....	24
2.11 Toplam RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi.....	24
2.12 Apoptozda Görev Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Analizi.....	26
2.13 Protein Tayini.....	27
2.14 Protein Ekspresyon Düzeylerinin Tespit Edilmesi.....	28
2.15 Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi.....	29
2.16 Antibiyofilm Aktivitenin Floresan Görüntüleme ile Analizi.....	30
2.17 İstatistiksel Analiz.....	31
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
3.1 MTT Metoduyla Hücre Canlılığın Belirlenmesi.....	32
3.1.1 Polisakkaritlerin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	32
3.1.2 Polisakkaritlerin HepG2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	36

3.1.3	Polisakkaritlerin HT-29 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	41
3.1.4	Polisakkaritlerin Ishikawa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	45
3.1.5	Polisakkaritlerin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	49
3.1.6	Polisakkaritlerin MIA PaCa-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	54
3.1.7	Polisakkaritlerin PANC-1 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	58
3.1.8	Polisakkaritlerin TT Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	62
3.1.9	Polisakkaritlerin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .....	66
3.2	Koloni Formasyon Metoduyla Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi .....	73
3.3	Matrijel-İnvazyon Yöntemiyle İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi .....	78
3.4	Yara İyileştirme Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi .....	83
3.5	Polisakkaritlerin Antienflamatuvar Etkileri .....	93
3.6	Polisakkaritlerin TAS ve TOS Seviyelerine Etkileri .....	98
3.7	Apoptoz Analizleri .....	106
3.7.1	Annexin-V/PI Boyama Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi ..	106
3.7.2	Apoptozda Görev Alan Genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi .....	112
3.7.3	Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini .....	118
3.7.4	Apoptoz İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin Western-blot Yöntemi ile Belirlenmesi .....	119
3.8	Antibiyofilm Aktivite Analizleri.....	122
3.8.1	Polisakkaritlerin Biyofilm İnhibisyon Etkisi .....	122
3.8.2	Biyofilm İnhibisyonunun Floresan Mikroskopla Analizi .....	124
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>128</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>130</b>
<b>6.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>150</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 3.1:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	32
<b>Şekil 3.2:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	33
<b>Şekil 3.3:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	33
<b>Şekil 3.4:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	34
<b>Şekil 3.5:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	34
<b>Şekil 3.6:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	35
<b>Şekil 3.7:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	35
<b>Şekil 3.8:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi .....	36
<b>Şekil 3.9:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	37
<b>Şekil 3.10:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	37
<b>Şekil 3.11:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	38
<b>Şekil 3.12:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	38
<b>Şekil 3.13:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	39
<b>Şekil 3.14:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	39

<b>Şekil 3.15:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi.....	40
<b>Şekil 3.16:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi.....	40
<b>Şekil 3.17:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	41
<b>Şekil 3.18:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	41
<b>Şekil 3.19:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	42
<b>Şekil 3.20:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	42
<b>Şekil 3.21:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	43
<b>Şekil 3.22:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi .....	43
<b>Şekil 3.23:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi.....	44
<b>Şekil 3.24:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi.....	44
<b>Şekil 3.25:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	45
<b>Şekil 3.26:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	46
<b>Şekil 3.27:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	46
<b>Şekil 3.28:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	47
<b>Şekil 3.29:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	47
<b>Şekil 3.30:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	48

<b>Şekil 3.31:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	48
<b>Şekil 3.32:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi .....	49
<b>Şekil 3.33:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	50
<b>Şekil 3.34:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	50
<b>Şekil 3.35:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	51
<b>Şekil 3.36:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	51
<b>Şekil 3.37:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	52
<b>Şekil 3.38:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	52
<b>Şekil 3.39:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	53
<b>Şekil 3.40:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi .....	53
<b>Şekil 3.41:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	54
<b>Şekil 3.42:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	54
<b>Şekil 3.43:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	55
<b>Şekil 3.44:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	55
<b>Şekil 3.45:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	56
<b>Şekil 3.46:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi .....	56

<b>Şekil 3.47:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi.....	57
<b>Şekil 3.48:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi.....	57
<b>Şekil 3.49:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	58
<b>Şekil 3.50:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	58
<b>Şekil 3.51:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. ....	59
<b>Şekil 3.52:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	59
<b>Şekil 3.53:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	60
<b>Şekil 3.54:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	60
<b>Şekil 3.55:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	61
<b>Şekil 3.56:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi .....	61
<b>Şekil 3.57:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	62
<b>Şekil 3.58:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	62
<b>Şekil 3.59:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	63
<b>Şekil 3.60:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	63
<b>Şekil 3.61:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	64
<b>Şekil 3.62:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	64

<b>Şekil 3.63:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	65
<b>Şekil 3.64:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi .....	65
<b>Şekil 3.65:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	66
<b>Şekil 3.66:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	66
<b>Şekil 3.67:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	67
<b>Şekil 3.68:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. decastes</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	67
<b>Şekil 3.69:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	68
<b>Şekil 3.70:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>A. flettii</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	68
<b>Şekil 3.71:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	69
<b>Şekil 3.72:</b> Değişik konsantrasyonlardaki <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi .....	69
<b>Şekil 3.73:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	73
<b>Şekil 3.74:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	74
<b>Şekil 3.75:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	74
<b>Şekil 3.76:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	75
<b>Şekil 3.77:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	75
<b>Şekil 3.78:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	76

<b>Şekil 3.79:</b> <i>L. chrysoarrheus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	76
<b>Şekil 3.80:</b> <i>L. chrysoarrheus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	77
<b>Şekil 3.81:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	79
<b>Şekil 3.82:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	80
<b>Şekil 3.83:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	80
<b>Şekil 3.84:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	81
<b>Şekil 3.85:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	81
<b>Şekil 3.86:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	82
<b>Şekil 3.87:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	84
<b>Şekil 3.88:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	85
<b>Şekil 3.89:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	86
<b>Şekil 3.90:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	87
<b>Şekil 3.91:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	88
<b>Şekil 3.92:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. ....	89
<b>Şekil 3.93:</b> <i>L.chrysoarrheus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	90
<b>Şekil 3.94:</b> <i>L.chrysoarrheus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği.....	91
<b>Şekil 3.95:</b> a) <i>G. esculenta</i> HWEP ve b) <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının RAW 264.7 hücre hattı canlılığına etkisi. ....	93
<b>Şekil 3.96:</b> Nitrik oksit (NO) standart eğri grafiği.....	94
<b>Şekil 3.97:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP ve <i>A. flettii</i> HWEP örneklerinin 24, 48 ve 72 saat uygulamalarının ardından 1µg/mL LPS ile oluşturulan inflamasyona karşı etkileri .....	95

<b>Şekil 3.98:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP ve <i>A. flettii</i> HWEP örneklerinin 72 saat uygulamalarının ardından LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücre hattından elde edilen RNA'larn %1'lik agaroz jel elektroforezi. ....	96
<b>Şekil 3.99:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP ve <i>A. flettii</i> HWEP örneklerinin 72 saat uygulamalarının ardından 1µg/mL LPS ile oluşturulan inflamasyona karşı iNOS ve COX-2 gen ekspresyonlarındaki değişim .....	96
<b>Şekil 3.100:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkaritinin HeLa hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	99
<b>Şekil 3.101:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkaritinin TT hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	100
<b>Şekil 3.102:</b> <i>A.flettii</i> HWEP polisakkaritinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	101
<b>Şekil 3.103:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP polisakkaritinin MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	102
<b>Şekil 3.104:</b> <i>A. flettii</i> HWEP polisakkaritinin MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	103
<b>Şekil 3.105:</b> <i>A. flettii</i> HWEP polisakkaritinin HepG2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri.....	104
<b>Şekil 3.106:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	107
<b>Şekil 3.107:</b> <i>G. esculenta</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	108
<b>Şekil 3.108:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	109
<b>Şekil 3.109:</b> <i>A. flettii</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	110
<b>Şekil 3.110:</b> <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	111
<b>Şekil 3.111:</b> <i>L. chrysorrhoeus</i> HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. ....	112
<b>Şekil 3.112:</b> Polisakkaritlerin 72 saat uygulamalarının ardından HeLa, TT, HepG2 ve MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen RNA'larn %1'lik agaroz jel elektroforezi. ....	113
<b>Şekil 3.113:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HeLa hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	114
<b>Şekil 3.114:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında TT hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	114
<b>Şekil 3.115:</b> <i>A.flettii</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan	

BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	115
<b>Şekil 3.116:</b> <i>A.flettii</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HepG2 hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	116
<b>Şekil 3.117:</b> <i>L. chrysoarrheus</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HepG2 hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	117
<b>Şekil 3.118:</b> <i>L. chrysoarrheus</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında PANC-1 hücre hattında apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. ....	117
<b>Şekil 3.119:</b> Bilinen farklı konsantrasyonlardaki protein numunelerinin standart eğri grafiği .....	118
<b>Şekil 3.120:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında TT ve HeLa hücre hattında apoptotik proteinlerden BCL-2, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 protein seviyelerine etkisi. ....	119
<b>Şekil 3.121:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin TT ve HeLa hücre hattında western-blot yöntemi sonrası protein bantlarının densitometrik analizi. ....	120
<b>Şekil 3.122:</b> Apoptoz sinyal yolağı.....	121
<b>Şekil 3.123:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (30, 40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında <i>B. cereus</i> ve <i>S. mutans</i> bakterilerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkisi. ....	123
<b>Şekil 3.124:</b> <i>A. flettii</i> polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (30, 40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında <i>B. cereus</i> ve <i>S. mutans</i> bakterilerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkisi. ....	124
<b>Şekil 3.125:</b> <i>G. esculenta</i> polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında <i>B. cereus</i> ve <i>S. mutans</i> bakterilerinin kontrol ve doz gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri. ....	125
<b>Şekil 3.126:</b> <i>A. flettii</i> polisakkaritinin 50 mg/mL uygulaması sonrasında <i>B. cereus</i> ve <i>S. mutans</i> bakterilerinin kontrol ve doz gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri. ....	126



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> İnflamasyon ilişkili genlerin primer dizileri.....	23
<b>Tablo 2.2:</b> Kuyucuklara yüklenen RNA ve marker konsantrasyonları .....	25
<b>Tablo 2.3:</b> Apoptoz ilişkili genlerin primer dizileri.....	27
<b>Tablo 2.4:</b> Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması .....	28
<b>Tablo 2.5:</b> Çalışmada kullanılan bakteri ve maya türleri.....	30
<b>Tablo 3.1:</b> Polisakkarit ekstraktlarının 72 saat EC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) değerleri .....	70

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ALP</b>	: Alkalen Fosfataz
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>BCA</b>	: Bikinkoninik asit tahlili
<b>BCIP</b>	: 5-bromo-4-kloro-indol-fosfat
<b>BSA</b>	: Sığır serum albümini
<b>CD4+</b>	: Yardımcı T hücreleri
<b>CD8+</b>	: Sitotoksik T hücreleri
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>DC</b>	: Dendritik hücreler
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>EC50</b>	: Yarı maksimal etkili konsantrasyon
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
<b>HBV</b>	: Hepatit virüsü
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	: İnterferon beta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon gama
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>LB</b>	: Luria-Bertani
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MRSA</b>	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MTT</b>	: 3-(4,5- dimetiltiazoş-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromid
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	: Sodyum Nitrit
<b>NBT</b>	: Nitro Blue Tetrazolyum
<b>NCBI</b>	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
<b>NK</b>	: Doğal öldürücü
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit iyonu
<b>OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>OSI</b>	: Oksidatif Stres İndeksi
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi

<b>PI</b>	: Propidyum iyodür
<b>PSK</b>	: Polisakkarit-K
<b>PSP</b>	: Polisakkarit-peptid kompleksi
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RIPA</b>	: Radyo-immünopresipitasyon tahlil tamponu
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>ROO·</b>	: Peroksil radikali
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviyesi
<b>TCDD</b>	: 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
<b>TEMED</b>	: Tetrametilendiamin
<b>THB</b>	: Todd-Hewitt Broth
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviyesi
<b>TRIS</b>	: (hidroksimetil) aminometan
<b>TSB</b>	: Triptik soya unu
<b>XTT</b>	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfo fenil)

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, mantarlardan izole edilen polisakkarit ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, içerdiği yararlı biyoaktif bileşiklerin bolluğu nedeniyle günümüzün farmasötik endüstrisinin önemli bir bölümünü temsil eden mantarların korunması, yeni antikanser, antibakteriyel ve bağışıklık uyarıcı özelliklerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Zamanını, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, lisans ve yüksek lisans eğitimimde de olduğu gibi doktora tez çalışmamın şekillenmesi ve yürütülmesinde katkı sunan değerli danışmanım Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a;

Çalışmalarım süresince beni destekleyen, önerilerde bulunan, sadece bölüm içerisinde değil okul dışında da hayata dair her alanda yanımda olan ve yönlendiren sevgili hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a;

Değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR'a, Dr. Öğr. Üyesi Can YILMAZ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gürçay Kıvanç AKYILDIZ'a;

Laboratuvar çalışmalarım da desteğini esirgemeyen ve yardımcı olan başta Öğr. Gör. Dr. Naime Nur BOZBEYOĞLU KART'a, Amine Hafis ABDELSALAM'a, Hale Ayşe KARAMAN'a, Volkan KUZUCU'ya ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, projenin maddi desteğini sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Ve son olarak, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni bu günlere getiren aileme; sevgili annem Şükriye MUTLU ve babam Hüseyin MUTLU'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

# 1. GİRİŞ

Mantarlar, içerdikleri çok sayıda bileşenden dolayı iyi bilinen fonksiyonel gıdalardır. Diyetel açıdan, yüksek protein ve düşük kalori içerikleri gibi besinsel önemleri ile tanınırlar. Eski zamanlardan beri toplumların diyetinde bulunan mantarlar, Romalılar tarafından Tanrı'nın yemeği olarak kabul edilirken, geleneksel Çin tıbbında yaşam iksiri olarak adlandırılmış ve binlerce yıl öncesinde kullanıldığı bilinmektedir (Valverde ve diğ. 2015). Günümüzde 3000 civarında yenilebilir mantar türü vardır, ancak sadece 100 tür insanlar tarafından yetiştirilmektedir (Chang 1999). Özellikle yenilebilir özellikleri sebebiyle üç tür yaygın olarak yetiştirilmektedir. Bunlar, Beyaz şapkallı mantar ya da kültür mantarı olarak bilinen *Agaricus bisporus* L., istiridye mantarı *Pleurotus ostreatus* L. ve saman mantarı *Volvariella volvacea* L.'dir (Aida ve diğ. 2009, Patel ve Goyal 2012). Mantarlar, fosfor gibi minerallerin yanı sıra riboflavin, tiamin, ergosterol, niasin ve askorbik asit gibi vitaminler açısından da zengindir. Ayrıca sekonder metabolitler (terpenoidler, asitler, alkaloidler, seskiterpenler, polifenolik bileşikler, laktonlar, steroller, nükleotid analogları ve metal şelatlayıcı maddeler) gibi biyoaktif bileşenleri ve başta  $\beta$ -glukanlar ve glikoproteinler olmak üzere çok sayıda polisakkarit içerirler (Valverde ve diğ. 2015). Düşük yağ ve yüksek lif içerikleri nedeniyle kardiyovasküler hastalıkları önlemede büyük potansiyele sahiptirler ve ayrıca oksidatif hasarları azaltmada yararlı olan doğal antioksidanların önde gelen kaynaklarıdır. Mantarlar, içerdikleri fonksiyonel bileşenler nedeniyle antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip ilaçların hazırlanması için bir kaynak olarak kullanılmaktadır (Chang ve Wassar 2012, Finimundy ve diğ. 2013).

Mantarlardan elde edilen polisakkaritler, özellikle  $\beta$ -glukanlar, antioksidan, antidiyabetik, antikanserojenik ve bağışıklık düzenleyici etkilerinin yanı sıra diğer terapötik etkileri nedeniyle bilim insanlarının ve diğer gıda endüstrilerinin dikkatini çekmektedir (Daba ve Ezeronye 2003, Yu ve diğ. 2009, Hung ve Nhi 2012). Mantarlardan biyoaktif maddelerin geri kazanılması için günümüzde kullanılan çok sayıda geleneksel ve gelişmiş ekstraksiyon tekniği bulunmaktadır. Günümüzde, yenilebilir mantarlar, alternatif tedavi ve ilaç hammaddesi keşifleri için daha popüler

hale gelmekte ve farklı mantar türlerine odaklanan araştırma faaliyetlerinin de ilerlemesine yol açmaktadır.

Literatürde mantarların biyoaktif bileşenleri ve terapötik etkileri hakkında pek çok bilgi mevcut olmasına rağmen, biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu ve işlenmelerine yönelik tekniklere ilişkin her geçen gün yeni çalışmalar yayımlanmaktadır. Bunun sebebi, mantarların besin değerlerinin yanında bağıışıklık güçlendirici, antikanser, antimikrobiyal, antioksidan ve antidiyabetik ajanlar olarak büyük potansiyele sahip olmalarıdır.

Bu çalışmanın amacı, *Gyromitra esculenta* Pers. Ex Fr., *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer, *Albatrellopsis flettii* (Morse ex Pouzar) Audet ve *Lactarius chrysorrheus* Fr. mantarlarından ekstrakte edilen polisakkaritlerin antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar ve antibiyofilm potansiyellerini araştırmaktır.

## 1.1 Geleneksel Tıp ve Mantarlar

Fosil kayıtları, Silüriyen dönemindeki (408 - 438 milyon yıl önce) kadar eski zamanlarda mantarların varlığını kanıtlamıştır (Alexopoulos ve diğ. 1996). Yaklaşık 300 milyon yıldır insanoğlunun diyetinin bir parçası olan mantarların, tarih öncesi insanlar tarafından yiyecek olarak ve tıbbi amaçlarla toplanmış olabileceği düşünülmektedir (Chang ve Miles 2004). Öyle ki, antik Çin dönemine ait, makrofungusların tanımları, yetiştiricilik kayıtları, pişirme yöntemleri ve eski metinlerde övüldüğüne dair kanıtlar bulunmuştur (Di 2013). Yine Han Hanedanlığı dönemi ve sonrasına ait, bitki ve mantarların kullanıldığı, salgın hastalıklarda çeşitli enfeksiyonların tedavisine yönelik formülasyonlar, kullanım endikasyonları ve hazırlanış biçimlerinin yer aldığı dikkate değer belgeler vardır (Wang ve diğ. 1993).

İnsanlığın uygarlığı ilerledikçe, mantarlar bazı Asya ülkelerinde (Çin ve Japonya gibi) yenilebilir ve tıbbi kaynaklar olarak değerlendirilmiştir. Avrupa'da tatsız olarak kabul edilmesine ve yaygın olarak tüketilmemesine rağmen, Asyalılar, iki bin yılı aşkın bir süredir mantar toplamış, yetiştirmiş ve tüketmiştir (çoğunlukla çorbalarda) (McKnight ve McKnight 1998). Geçmiş kaynaklarda 'mantar', şemsiye şeklindeki şapkası, belirgin ve görünür etli gövdesiyle tanımlanmıştır (Zhang ve diğ.

2007). Mantarlar, zengin besin içeriği ve tıbbi değerleri nedeniyle fonksiyonel bir gıda ve diyet takviyeleri olarak kabul edilmektedir (Chang ve Miles 2004).

### 1.1.1 Tıbbi Mantarlar

Mantarlar binlerce yıldır insan diyetinin bir parçası olmuştur, ancak tüketicilerin sağlığını korumadaki yararlı etkilerinin çoğu, yalnızca son on yılda araştırılmış ve kanıtlanmıştır. *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Boletus*, *Inonotus*, *Grifola* ve *Armillaria* gibi cinslere ait birçok mantar, antimikrobiyal, antiviral, antidiyabetik, antienflamatuvar, hipokolesterolemik ve antitümör gibi aktivitelerinden dolayı uzun süredir tıbbi gıda olarak kullanılmaktadır (Zhang ve diğ. 2019). Fonksiyonel bir gıda olarak yenilebilir mantarlar, mikrobiyota modelini ve metabolomik fonksiyonu modüle eden değerli bileşiklerin doğal bir kaynağıdır. Mantar türlerinin mikrobiyota modülasyonunda kullanılması, antimikrobiyal ve antienflamatuvar aktiviteleri olan yeni moleküller bulma ihtiyacından kaynaklanmıştır. Mevcut biyofarmasötik endüstrisinin bu ihtiyacı, uygulanan antibiyotik miktarındaki artıştan kaynaklanmaktadır ve bu da antibiyotik direncinin tekrar tekrar ortaya çıkmasına neden olmuştur (Matamoros-Recio ve diğ. 2021).

Mantarlar yüzden fazla tıbbi işlevden sorumludur. Başlıca terapötik etkileri şunları içermektedir: antioksidan, antikolesterolemik, antikanser, antidiyabetik, antialerjik, bağışıklık düzenleyici, kardiyovasküler koruma, antiviral, antibakteriyel, antiparazit, antienflamatuvar, antifungal, detoks ve hepatoprotektif etkiler (Li ve diğ. 2010, Zhao ve diğ. 2010, Zhou ve diğ. 2011, Zhang ve diğ. 2012, Basnet ve diğ. 2017). Çeşitli mantar ekstreleri, enflamasyon ile ilişkili (nitrik oksit (NO), sitokinler ve prostaglandinler) ajanların azalmasına yardımcı olurken hücre enflamasyonlarını azaltabilmektedir. Çok sayıda mantar ekstraktı immünomodülatör (Boh ve diğ. 2013), antitümör ve antikanser (Vaz ve diğ. 2013, Finimundy ve diğ. 2013), antibakteriyel ve antioksidan (Ren ve diğ. 2014), antiviral (Santoyo ve diğ. 2012) ve antihipoglisemik ve antiaterosklerotik ajanlar olarak (Fortes ve diğ. 2008) kullanılabilceği gösterilmiştir.

Mantarlar, fenolik bileşikler, terpenoidler, polisakkaritler, glukanlar ve lektinler gibi farklı türde biyoaktif bileşenler üretir ve bunların antimikrobiyal,

bağışıklık düzenleyici, antioksidan, antiviral ve hipokolesterolemik dahil olmak üzere 126'dan fazla etkisi ortaya koyulmuştur (Kozarski ve diğ. 2011, Chen ve diğ. 2012, Li ve diğ. 2012, Ferreira ve diğ. 2015). İmmünomodülatör ve antimikrobiyal özelliklere sahip terpenoidler ve glukanolar gibi biyomoleküller, *Fomes*, *Ganoderma*, *Phellinus*, *Trametes Fomitopsis*, *Inonotus* ve *Schyzophillum* cinslerine ait farklı ağaç türlerinde yaşayan mantarlardan elde edilebilmektedir (Rodrigues ve diğ. 2011). Farklı mantar türlerinde bulunan proteinler, lektinler, lignoselüloz, enzimler, proteazlar, ribozomu inaktive eden proteinler, proteaz inhibitörleri ve hidrofobinler, yeni ilaçların hazırlanması için farklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere büyük potansiyel göstermektedir (Scuderi 1989).

Mantarların biyoaktiviteleri kapsamlı çalışmalarla doğrulanmıştır. Mantarların antikanser özelliklerine ilişkin ilk çalışmalardan biri, 1957 yılında, Çörek mantarı'nın (*Boletus edulis* Bull.) Fare yumuşak doku kanseri (S180) hücre hattı üzerindeki etkisi Lucas ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Lucas 1957). O tarihten bu yana, çeşitli mantarlardan birçok mantar polisakkariti elde edilmiş ve antitümör özellikleri gösterilmiştir.

Farklı polipeptitler ve sitotoksik steroidler içeren *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. ve *Polyporus alveolaris* Fr. gibi tıbbi mantarlardan elde edilen ekstraktların, antienflamatuvar, antikanser, hepatoprotektif, antifungal ve antibakteriyel etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Wang ve diğ. 2004, Jiang ve Sliva 2010). Yine yoğun şekilde tüketilen İstiridye mantarları'nın da (*Pleurotus* türleri) hipokolesterolemik, antioksidan, antibakteriyel, antidiyabetik, hepatoprotektif, antikanserojenik, antiviral ve bağışıklık düzenleyici özellikleri bilinmektedir (Reis ve diğ. 2012, Younis ve diğ. 2015).

Son zamanlarda, mantarlardan izole edilen çok sayıda bileşik, güçlü farmasötik özellikleri ile vurgulanmıştır. Lektinler, polisakkaritler, polisakkarit-peptidler ve polisakkarit-protein kompleksleri dahil olmak üzere bu bileşiklerin, immünomodülatör (Singh ve diğ. 2014), antikanser (Figueiredo ve Régis 2017), antienflamatuvar (Hassan ve diğ. 2015), antioksidan (Singh ve diğ. 2014, Anusiya ve diğ. 2021) ve kan kolesterol seviyelerini düşürme (Mustafa ve diğ. 2022) gibi terapötik özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle, çeşitli polisakkaritlerin ve polisakkarit konjugatlarının ticarileştirilmesi, hastaların bu tür antikanser tedavisinden



faydalanmalarını sağlamıştır. Bunlar şizofilan, lentinan, grifolan, PSP (polisakkarit-peptid kompleksi) ve krestin (polisakkarit-protein kompleksi)'dir (Zhang ve diğ. 2007).

### 1.1.2 Tıbbi Mantarlardan İzole Edilen Polisakkaritler

İstatistiklere göre, tıbbi değeri olan yaklaşık 700 çeşit mantar dahil olmak üzere dünyada 3000'e yakın yenilebilir mantar türü vardır (Kalac 2012). Yenilebilir mantarlar, insanların günlük yaşamındaki önemli besin kaynaklarından biridir ve 21. yüzyılda yetiştiriciliği önemli derecede artmış ve bir endüstri haline gelmiştir. Bu arada, çeşitli aktif bileşenlerin zenginliği nedeniyle, mantarlar besleyici içeriğinden daha çok tıbbi değerleriyle ön plana çıkmaktadır (Roupas ve diğ. 2012).

Mantarlardan izole edilen aktif bileşenlerden özellikle polisakkaritler, biyolojik özellikleri sebebiyle büyük ilgi görmektedir (Vetvicka ve Vetvickova 2012, Zhang ve diğ. 2014, Zeng ve diğ. 2019). Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda mantar polisakkaritlerinin güçlü antikanser ajanlar olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, polisakkaritler ve glikokonjugatları, diyet takviyeleri ve oksidatif stres kaynaklı bozuklukların tedavisi için yeni ilaç adayları haline gelmiştir. Polisakkaritler ayrıca lipid peroksidasyonunu, gastrointestinal kanserleri ve oksidatif stresten kaynaklanan enflamatuvar bağırsak hastalığı gibi çeşitli gastrointestinal hastalıkların patogenezi önlemeye yardımcı olmaktadır (Chang ve diğ. 2017, Jayachandran ve diğ. 2018, Murphy ve diğ. 2020).

Mantardan izole edilen, bazıları daha güçlü antitümör aktiviteleri gösteren polisakkarit-protein veya polisakkarit-peptid kompleksi gibi protein veya peptid kalıntılarına sahip kompleks yapılar vardır. Mantar türevli polisakkaritler genellikle  $\alpha$ -veya  $\beta$ -omurgalarında ve dallarında glukoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, riboz, arabinoz ve glukuronik asit içerir. Farklı kombinasyonları nedeniyle, polisakkaritlerin yapısı birçok yönden birbirinden farklı olabilir.  $\beta$ -1,6 bağlantılı glikoz dalları ile  $\beta$ -1,3 glukopiranozid ana zincirinden oluşan *Basidiomycetes* türlerinden elde edilen polisakkaritler, antitümör aktivitelere sahiptir. Ayrıca polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerini sudaki çözünürlükleri, moleküler ağırlıkları ve yapılarındaki dallanma

oranı özelliklerine göre değişiklik gösterdiği de iyi bilinmektedir (Zaidman ve diğ. 2005).

Biyolojik olarak aktif polisakkaritlerdeki ana bileşen,  $\beta$ -D-glukan olarak tanımlanmıştır. Bu  $\beta$ -D-glukanın iyi bilinen kimyasal yapısının (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glukosil dallı (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukopiran olduğu ve  $[\alpha]$  spesifik rotasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir.  $\beta$ -D-glukanların antitümör aktiviteleri ve yapısal özellikleri arasında tipik bir yapı-fonksiyon ilişkisi bulunmaktadır. Bunun sebebi, farklı  $\beta$ -D-glukan formlarının biyolojik aktivitelerinin yapılarından (moleküler ağırlık, suda çözünürlük, dallanma derecesi ve konformasyon) kaynaklı oldukça farklı antitümör etkiler gösterebilmesidir (Mizuno ve diğ. 1995). Ekstraksiyonlar sırasında  $1 \times 10^4$  ila  $1 \times 10^6$  kDa arasında değişen farklı moleküler kütlelere sahip çok çeşitli polisakkaritler izole edilebilmektedir. Moleküler ağırlıktaki bu fark, çeşitli immünomodülatör etkilere neden olmaktadır ve genellikle daha yüksek moleküler ağırlığa ( $1 \times 10^5$  kDa veya üzeri) sahip olan polisakkaritlerin daha güçlü antitümör etkileri ve daha yüksek immünomodülatör aktiviteler sergilediği bulunmuştur (Tada ve diğ. 2007, Kim ve diğ. 2013). Mantar polisakkaritlerinin yüksek moleküler ağırlığı nedeniyle, tümör hücrelerine karşı doğrudan sitotoksik bir etki göstermemektedir. Bunun yerine, bir immünomodülatör yanıt vasıtasıyla bağışıklık sistemini harekete geçirerek antitümör aktivite göstermektedir (Wasser ve Weis 1999).

### **1.1.2.1 Antikanser Ajanlar Olarak Mantar Polisakkaritleri**

Kanser, dünya genelinde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Avrupa Birliği'nde en sık görülen kanser tipleri meme, prostat, akciğer ve kolorektal olanlardır. Akciğer kanseri erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni iken kadınlarda bu meme kanseridir. Az gelişmiş ülkelerde hem erkeklerde hem de kadınlarda kolorektal kanser, ikinci en yaygın iken erkeklerde akciğer kanseri, kadınlarda meme kanseri kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin diğer önde gelen nedenleri arasında genel olarak kolorektal kanseri, erkekler özelinde ise prostat kanseri yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, erkeklerde karaciğer ve mide kanseri sık görülürken, kadınlarda rahim ağzı kanseri başlıca kanser türlerindedir. Hem erkek hem de kadınlarda tüm

kanserlerin yaygınlığı gelişmiş ülkelerde az gelişmiş ülkelere kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksek olmasına rağmen, gelişmiş ülkelerde ölüm oranları sadece %8 ila %15 daha yüksektir (Torre ve diğ. 2015). Bu durum, risk faktörleri ve tespit uygulamalarından uygulanabilir tedavi seçeneklerine kadar farklı etmenler sebebiyle farklılaşmaktadır. Kanser sebebiyle ölümlerin önde gelen nedenleri arasında tütün kullanımı (akciğer, mide ve karaciğer kanseri), obezite ve fiziksel hareketsizlik (meme ve kolorektal kanser) ve enfeksiyon kaynaklı kanserler (karaciğer, mide ve rahim ağzı kanseri) yer almaktadır. Geleneksel olarak; cerrahi uygulamalar, kemoterapi ve radyoterapi, kanser için başlıca tedavilerdir. Ancak bu tedavilerin yan etkiler, pahalı tanı ve tedavi gibi dezavantajları vardır (Cho 2010). Bu nedenle, tıbbi bitkiler, bu dezavantajların bazılarını hafiflettiklerinden, anti-kanser araştırmalarında önemli derecede ilgi kaynağı olmuştur.

Kanserin en yaygın tedavisi, genellikle yan etkileri olan kemoterapidir. Bu nedenle, daha etkili ve toksik olmayan alternatif bir yöntem bulmak gerekmektedir. Son yıllarda mantarlar, tıbbi değerlerinden dolayı fonksiyonel gıda ve ilaç kaynağı olarak büyük ilgi görmüştür. Mantarlardan elde edilen polisakkaritler ve polisakkarit-protein kompleksleri gibi biyoaktif bileşikler terapötik özelliklere sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin vücuda herhangi bir zarar vermediği, ek stres oluşturmadığı, bunun yanı sıra çevresel ve biyolojik strese vücudun uyum sağlamasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Kanser araştırmalarının temel hedefi de daha az yan etkisi olan etkili tedavilerdir.

Mantar polisakkaritleri, antitümör etkilerini esas olarak organizmanın bağışıklık tepkisinin aktivasyonu yoluyla gerçekleştirir. Bu maddeler biyolojik tepki değiştiriciler olarak kabul edilir (Wasser ve Weis 1999, Liao ve diğ. 2013). Temel olarak, bu şunu gösterir: (1) vücuda zarar vermezler ve vücut üzerinde ek bir stres oluşturmazlar; (2) vücudun çeşitli çevresel ve biyolojik strese uyum sağlamasına yardımcı olurlar ve (3) sinir, hormon veya bağışıklık sistemini uyararak düzenleyici işlevleri desteklemektedir. (Brekman 1980). Bağışıklık sistemi ile etkileşime girebilen maddeler, enflamatuvar yanıtın inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Bir maddenin, bağışıklık tepkisini artırıp artırmadığı veya baskıladığı, söz konusu maddenin dozu, uygulama yolu ve uygulama zamanlaması gibi birçok faktöre bağlıdır (Tzianabos 2000).

Çeşitli çalışmalar, farklı mantar türlerinden elde edilen ekstraktların ve bileşiklerin antitümör potansiyelini doğrulamıştır (Lindequist ve diğ. 2005, Ferreira ve diğ. 2010, Lemieszek ve Rzeski 2012). Bu nedenle, tümör hücrelerinde apoptozu indükleyen mantar ekstraktlarının tanımlanması, kimyasal karakterizasyonu ve yapılarının aydınlatılması kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılabilir yeni bileşiklerin keşfedilmesini sağlayabilecektir.

Çeşitli glikozidik bağlara sahip, farklı yapıda monosakkaritler içeren, heterojen polisakkaritlerin ekstraksiyonu bir karışım olarak elde edilebilmektedir. Bunlar; genellikle  $\beta$ -glukan'lar yani  $\beta$ -1,6 ve  $\beta$ -1,3 karışımıdır ve antikarsinojenik aktiviteden en çok sorumlu olan  $\beta$ -glukanlar bunlardır. Genel olarak, daha fazla 1,6-bağlantısı olan  $\beta$ -glukanlar daha az aktiviteye sahiptir (Franz 1989). Aynı zamanda, ana zincir ve yan dalların bağlantılarından ayrı olarak, dallanma derecesi de polisakkaritlerin immünoterapötik etkilerine büyük ölçüde katkı sağlamaktadır (Yadomae ve Ohno 1996).

Lentinan, makrofajlardan tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  üretimini tetikleyebilen ve en iyi bilinen immünomodülatörlerden biridir (Abel ve diğ. 1989). Lentinan'ın, tümör büyümesinin baskılanması yanında sitotoksik T lenfositlerinin ve makrofajların üretimini ve diğer spesifik olmayan bağışıklık tepkilerinin indüklenmesini sağladığı gösterilmiştir (Chihara ve diğ. 1986, Wasser ve Weis 1999).

Örneğin, Japonya gibi bazı ülkelerde bazı mantar fraksiyonları ve bileşiklerinin kanser tedavisinde kullanılması onaylanmıştır. PSP ve PSK (polisakkarit-K) (Zaidman ve diğ. 2005), lentinan (Ina ve diğ. 2013) ve şizofilan (Sullivan ve diğ. 2006) bunlardan bazılarıdır. Bu nedenle, biyoaktiviteden sorumlu bileşiklerin tanımlanması, farmasötik formülasyonların geliştirilmesi için çok önemlidir.

### 1.1.2.2 Polisakkaritlerin Antioksidan ve Antienflamatuvar Etkileri

İnsan vücudunda hücrel metabolizma sırasında (diğer aerobik organizmalarda da olduğu gibi) serbest radikaller ve reaktif türleri üretilmektedir. Bu, elektron taşıma zincirinden elektronların sızması, hücre sinyalizasyonu, homeostazinin düzenlenmesi veya patojenlere karşı savunma gibi metabolik süreçlerde farklı şekillerde meydana gelebilmektedir (Halliwell 2011). Reaktifler çok kararsızdır ve vücudun bunlara maruz kalması, onları yok etmek için endojen savunma mekanizmalarının (enzimatik veya enzimatik olmayan) gelişmesine yol açmaktadır (Ferreira ve diğ. 2009). Bu nedenle normal fizyolojik koşullarda reaktif türlerin üretimi, antioksidan savunma mekanizmaları tarafından dengede tutulur. Bununla birlikte, bu denge antioksidan üretimindeki değişiklikler, yüksek oksijen seviyelerine maruz kalma, UV ve kimyasallara maruz kalma gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu durum serbest radikal üretimini artırma eğiliminde olduğunda (antioksidanların kapasitesinin üzerinde) vücut oksidatif stres altına girmektedir (Valko ve diğ. 2007, Halliwell ve Gutteridge 2015).

Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektronları olan atom veya moleküller olarak adlandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2015). Bu radikaller çok kararsızdır ve kararlı hale gelebilmek için diğer moleküllerden elektron yakalama eğilimindedir. Serbest radikaller (oksijen kaynaklı) ROS ve nitrojen kaynaklı (RNS) olabilmektedirler. Bunlar, “birincil ROS” olarak kabul edilen süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), lipid peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ) ve “ikincil ROS” olarak tanımlanan hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) içermektedir (Pham-Huy ve diğ. 2008).

Daha önce de belirtildiği gibi, insanlarda savunma sistemi karmaşıktır ve bir anlamda da birbirini tamamlayan rollere sahip birçok hücre tipini içermektedir. Enflamatuvar yanıtla ilgili hücreler, doğal bağışıklık elemanlarından nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi fagositlerdir (Janeway ve Medzhitov 2002). Makrofajlar, savunmanın ilk basamağıdır. Ek olarak, makrofajlar, adaptif bağışıklığı da modüle etmek için T lenfositleri ile etkileşime girebilmektedir (Dalmo ve Bogwald 2008, Brown ve Gordon 2008).

Makrofajlar, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler (natural killer; NK) ve dendritik hücreler (DC) içeren doğal bağışıklık sistemi, sitokinler tarafından aktive

olarak düzenlenmektedir (Chijioke ve Münz 2013). Mononükleer fagosit sistemi (örneğin, makrofajlar ve monositler), DC'ler ve belirli lenfositler (örneğin, NK hücreleri), anormal hücrelerin tanınmasını ve yok edilmesini içeren çok sayıda önemli işlevi yerine getirmektedir. Anormal hücrelere veya dokulara karşı spesifik bağışıklık, hümoral (örneğin, antikolar) ve hücre aracılı bağışıklık (aynı zamanda enflamatuvar tepkileri artırmakta) süreçlerini içermektedir. Bu nedenle, yeterince işlevsel bir bağışıklık tepkisi, tümör hücrelerinin tanınması ve yok edilmesi için kritik öneme sahiptir (Moradali ve diğ. 2007). Örneğin, aktive edilmiş fagositler, fagositöz yoluyla patojenleri ortadan kaldırmaktadır. Makrofajlar, ölü hücreleri ve hücre içi patojenleri hedeflemekte ve uzaklaştırmaktadır (Munz ve diğ. 2005).

Çok sayıda çalışma, bitkilerden elde edilen polisakkaritlerin yüksek antioksidan ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Kardosova ve Machova 2006, Zhang ve diğ. 2012, Boudjeko ve diğ. 2015). Bu bileşiklerin, bağışıklık hücreleri ile etkileşime girerek bir dizi tepki ürettiği gösterilmiştir. Bu tür tepkiler şunları içermektedir: (1) tümör hücrelerine ve mikroorganizmalara karşı makrofaj aktivitesinin indüklenmesi, (2) fagositik aktivitenin artması ve tümör nekroz faktörü (TNF-a), interlökin (IL) gibi sitokinler ve kemokinlerin (IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  ve IFN- $\beta$ ) üretimini artırması (Schepetkin ve Quinn 2006).

Son çalışmalar, mantar ekstraktlarının tümör büyümesini engelleyerek bağışıklık fonksiyonu üzerindeki etkisini göstermiştir. Tıbbi ve yenilebilir mantarlar tarafından immün sistemin uyarılması, doğal bağışıklık yoluyla meydana gelmekte ve tipik olarak fagositik hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu hücreler patojenler ile karşılaştıklarında sitokin ve kemokinlerin üretilmesiyle bağışıklığın daha fazla uyarılması için biyoaktif elementlerle etkileşime girmektedir (Hetland ve diğ. 2008).

Mantarlar, NK hücrelerini, makrofajları ve T hücrelerini ve bunların sitokin üretimini etkileyerek bağışıklık sisteminin uyarılması için 1,6- ve 1,3- $\beta$ -glukanlar gibi etkili bileşikler içermektedir (Roupas ve diğ. 2012). İstiridye mantarı (Kayın mantarı) (*Pleurotus* türleri), immün yanıtı başlatan biyoaktif bileşikler içermektedir. İçerdiği polisakkarit-peptid kompleksleri, ubikuitin benzeri proteinler,  $\beta$ -glukanlar ve glikoprotein gibi biyoaktif elementler ile bağışıklık sistemini uyararak, mekanizmanın güçlenmesinde görev almaktadır (Adebayo ve diğ. 2012<sup>a,b</sup>). Yenilebilir ve tıbbi bir mantar olarak tanımlanan *Agaricus blazei* Murill'in de immün sistemi uyarıcı bir etkiye

sahip olduğu bildirilmiştir (Hetland 2008, Lima ve diğ. 2011). Öyle ki, birkaç gün %0,5-5 oranında oral yoldan tüketilmesinin, kanda sitokin üretimini artırdığı raporlanmıştır. *Pleurotus* spp., *Pleurotus florida* (Mont.) Singer, *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat, *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer ve *Lentinus edodes* (Berkeley) Pegler türlerinin de içerdikleri interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ve lipopolisakkaritler (LPS) ile antienflamatuvar aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Pandimeena ve diğ. 2015, Drori ve diğ. 2016).

LPS, makrofajları aktive ederek antienflamatuvar etki göstermektedir. Öte yandan, mantarlar antienflamatuvar özellik göstermektedir ve tüketilmeleri vücutta Nitrik oksit (NO) üretimini engellemektedir (Gunawardena ve diğ. 2014). *P. ostreatus*'tan saflaştırılan sekonder bir metabolit olan lektin, hücrel ve hümorale bağışıklık yoluyla enflamatuvar yanıtı indüklemektedir (Gao ve diğ. 2013). *Agaricus blazei*'nin, transgenik farelerde hepatit B virüsü (HBV)-DNA aşısı için bir koruyucu olarak çalıştığı (Chen ve diğ. 2004) ve sulu ekstraktının oral uygulanmasının, bir antifungal ilaç olan nistatin'in neden olduğu ödemi inhibe ettiği raporlanmıştır (Padilha ve diğ. 2009).

“Ölümsüzlük mantarı” olarak kabul edilen *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, Çin ve Japonya'da insanlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Shiao 2003). Ana bileşen olarak  $\beta$ -D-glukan ile *G. lucidum*'dan elde edilen ekstraktının, T hücrelerinin IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 gibi sitokinleri üretmesi için uyarılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Tang ve diğ. 2004, Watanabe ve diğ. 2011).

$\beta$ -D-glukan dışında, *Trametes versicolor*'dan elde edilen polisakkarit-protein komplekslerinin, makrofajlar gibi T hücrelerine ve antijen sunan hücrelere özgü immüno-uyarıcılar olarak işlev gördüğü saptanmıştır (Tzianabos 2000). Yine polisakkarit-protein komplekslerinin, yardımcı T hücrelerinin uyarılmasında ve dolayısıyla CD4+/CD8+ oranını arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir (Liang ve Wang 1996).

Bileşiklerin, özellikle  $\beta$ -D-glukan türevlerinin, bağışıklık sisteminin hücrel ve hümorale bileşenlerini tetiklediği ve böylece makrofajların, mononükleer hücrelerin ve nötrofillerin fonksiyonel aktivitesini arttırdığı çok sayıda çalışma rapor edilmiştir

(Zimmerman ve diğ. 1998, Wakshull ve diğ. 1999, Iwabuchi ve diğ. 2022).  $\beta$ -D-glukanlar, insanlar tarafından sentezlenmedikleri için insan bağışıklık sistemleri tarafından yabancı moleküller olarak tanınmaktadır. Bu bileşikler hem doğuştan gelen hem de adaptif (edinilmiş) bağışıklık tepkilere neden olabilmektedir (Brown ve Gordon 2005). Vücudun patojene veya patojen kaynaklı moleküllere ve kendiliğinden oluşan kötü huylu tümör hücrelerine karşı savunması, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık tepkilerinin etkileşiminden oluşmaktadır (Dunn ve diğ. 2002, Janeway ve Medzhitov 2002, Trinchieri 2003).

*Pleurotus* spp. çeşitli polisakkaritlere, özellikle de heteropolisakkaritlere ve glukanlara sahiptir (Kanagasabapathy ve diğ. 2012, Ruthes ve diğ. 2016, Baeva ve diğ. 2019). Bunların anti-tümör, antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Barbosa ve diğ. 2020). Yine *Phallus atrovovatus*'un, ağırlıklı olarak  $\beta$ -glukan ve  $\alpha$ -glukan fraksiyonları olmak üzere bol miktarda polisakkaritlere sahip olduğu bilinmektedir. Bu polisakkaritler, bağışıklık sistemi modüle edici aktivite ve yüksek antiinflamatuvar aktivite sergilemiştir (Varaporn ve diğ. 2020, Barbosa ve Carvalho 2021).

### 1.1.2.3 Polisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Yerel topluluklarda mantarların öksürük, kızamık tedavisi veya ağrı kesici olarak etnobotanik kullanımı raporlanmıştır (Garibay-Orijel ve diğ. 2007, Linnakoski ve diğ. 2018, Yasin ve diğ. 2019, Carvalho ve Barata 2019). Mantarların, genellikle hücre duvarı ile ilişkili olan, biyolojik olarak aktif bileşikler ürettiği gösterilmiştir ve bunların, bağışıklık sisteminin indüklenmesi ve tümör gelişiminin inhibisyonuna katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Guerra ve diğ. 2007, Kim ve diğ. 2007, Zhang ve diğ. 2007, Ribeiro ve diğ. 2009, Synytsya ve diğ. 2009, Hetland ve diğ. 2011). Ek olarak mantarlar, antibakteriyel ilaçların potansiyel kaynaklarıdır, çünkü antibiyotik araştırmaları ilk olarak mantarlarda başlamış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Opige ve diğ. 2006).

Son yıllarda, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel kullanımı nedeniyle insan patojenik



mikroorganizmalarında direnç yaygınlaşmıştır (Gallo ve Puglia 2013, Wang ve diğ. 2021, WHO 2022). Bu durum bilim insanlarını yeni antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmak üzere çeşitli kaynaklar aramaya zorlamıştır. Bilim insanları, yeni terapötik alternatifler ararken, birçok mantar türü üzerinde çalışmış ve içerdikleri biyoaktif bileşiklerin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkileri *in vitro* çalışmalarla doğrulanmıştır (Turkoglu ve diğ. 2007, Kalyoncu ve diğ. 2010, Kosanic ve diğ. 2012, Castillo ve diğ. 2018, Berteli ve diğ. 2021).

Antimikrobiyal terimi, antibakteriyal, antifungal, antiviral ve anti-parazit ilaçları içeren çok çeşitli farmasötik ajanı içermektedir (Leekha ve diğ. 2011). Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi son derece önemlidir. Mevcut antibiyotikler çok çeşitli olmasına rağmen (örneğin, aminoglikozitler,  $\beta$ -laktamlar, oksazolidinonlar, linkozamidler, kinolonlar), bakteriyel enfeksiyonların tedavisi, bakteriyel direncin gelişmesi nedeniyle giderek daha karmaşık hale gelmiştir (Gualerzi ve diğ. 2013). Antibiyotikler, bakteri hücre duvarının sentezini engelleyerek, protein veya nükleik asit sentezini inhibe ederek, metabolizmayı inhibe ederek veya plazma zarını degrade ederek etki göstermektedir (Gallo ve Puglia 2013).

Bakteriyel direnç, bakteri türlerinin belirli antibiyotik sınıflarına dirençli olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca direnç kazanılabilmekte, bu da başlangıçta duyarlı olan popülasyonların bir maddeye karşı dirençli hale geldiği ve onun varlığında çoğalabildiği anlamına gelmektedir (Russell 1999).

Bu direnç durumu, antibakteriyel ajanların henüz etkisini göstermeden onları yok eden enzimleri kodlayan genlerin edinilmesiyle geliştirilebilmektedir. Ayrıca bakteriler, antimikrobiyal ajanların hücre içi hedeflere erişimini kısıtlayan mutasyonlara da uğrayabilmektedir (Tenover 2006). Tüm bu nedenlerle antibiyotiklerin geliştirilmesi son yılların en önemli bilimsel zorluklarından biri olmuştur. Direnç olgusu nedeniyle daha önce tedavi edilen bakteriyel hastalıklar günümüzde ciddi problemler oluşturabilmektedir. Örneğin, *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* türleri antibiyotiklere karşı direnç geliştiren mikroorganizmalardan bazılarıdır. Bu bakteri türleri hem hastanelerde hem de toplumda sık karşılaşılan türlerdir (Alcon ve diğ. 2003, Peralta ve diğ. 2012). Bu mikroorganizmalar,

penisilinler, monobaktamlar ve çoğu sefalosporin gibi beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna direnç oluşturan genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) üretmektedir. Çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu bilinen enfeksiyonların tedavisi için, karbapenemler gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması önerilmektedir (Peralta ve diğ. 2012). Çoklu antibiyotik direnci geliştirdiği iyi bilinen bir diğer Gram negatif bakteri grubu *Pseudomonas* cinsidir. Bu cins, içme suyu da dahil olmak üzere sulu ortamlarda yaygın olmasına rağmen, hayvanları ve insanları enfekte eden fırsatçı patojenler olarak kabul edilen türleri içermektedir.

*Pseudomonas aeruginosa* bu cinsin en çok çalışılan patojenidir ve hem sağlıklı hem de bağışıklığı baskılanmış kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Mena ve Gerba 2009). *Pseudomonas* cinsi aminoglikozitlere, karbapenemlere ve sefalosporinlere karşı dirençlidir (Jacome ve diğ. 2012). Gram-pozitif bakterilerle ilgili olarak, MRSA (Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*), vankomisine dirençli Enterokoklar ile hastane vakalarında ve diğer enfeksiyonların yaygın bir nedeni olarak bilinmektedir (Barrett ve diğ. 1968, Aires de Sousa ve de Lancastre 2003, Alcoceba ve diğ. 2007, Jacome ve diğ. 2012).

Bazı araştırmalar, mantarların mikotoksin üretiminin inhibitörleri olduğunu öne sürmektedir. *L. edodes* ve *Trametes versicolor* (L.) Lloyd'dan elde edilen kültür ekstraktları, umut verici aflatoksin inhibe edici etkiler ortaya çıkarmıştır (Reverberi ve diğ. 2005). Özellikle *L. edodes* ve *Phellinus linteus* (Berkeley & M. A. Curtis) Teng'ten elde edilen bazı mantar ekstraktlarının MRSA gibi yüksek dirençli bakterilere karşı dahi etkili olduğu bildirilmiştir (Hearst ve diğ. 2009).

Mantarlardan izole edilen  $\beta$ -D-glukan'ların *in-vivo* olarak *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. ve *Candida* spp. gibi bazı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlarda immün yanıtı uyarak koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Kokoshis 1978, Rasmussen ve Seljelid 1991). Yine *P. ostreatus*'tan izole edilen  $\beta$ -glukan'ın sporcuları solunum yolu enfeksiyonlarından koruduğu bildirilmiştir (Bergendiova ve diğ. 2011).

Manna ve ark. çalışmasında, bir *Lentinus squarrosulus* (Mont.) mantarından ekstrakte edilen hetero-polisakaritlerden izole edilen nanopartikül yapılarının *E. coli* ve diğer bakterilere karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Manna ve diğ. 2015). Bu

nanopartiküllerin, bakteri ve virüsleri inhibe etmede normal partiküllerden daha etkili olduğu raporlanmıştır. Mantar polisakkaritleri, fareleri LPS kaynaklı septik şoka karşı koruduğu ile ilgili in-vivo çalışmalar da bulunmaktadır (Kim ve diğ. 2003, Yang ve diğ. 2019). *L. edodes* ekstraktlarının da oral patojenlere karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Papetti ve diğ. 2018).

*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.'ten elde edilen polisakkaritler, antioksidan aktivitelerinden dolayı büyük ilgi görmektedir (Han ve diğ. 2013, Cheng ve diğ. 2016, Wang ve diğ. 2017). *H. erinaceus* türünden elde edilen polisakkaritlerin, önemli ölçüde antioksidan ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olmasının yanında, insanlarda ülser ve kansere neden olan *Helicobacter pylori*'yi de inhibe edebildiği raporlanmıştır (Chen ve diğ. 2019, Zhu ve diğ. 2014).

## 1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Mantarlar

Çalışmada ülkemizde doğal olarak bulunan dört farklı mantar türü kullanılmıştır. Bu mantar türlerinden; *G. esculante*, *L. decastes* ve *A. flettii* Doç. Dr. Ilgaz Akata, *L. chrysorrhoeus* ise Doç. Dr. Hakan Allı tarafından teşhis edilmiştir. Polisakkarit ekstreleri Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Doğal Ürünler Araştırma laboratuvarlarında elde edilmiştir.

### 1.2.1 *Gyromitra esculante* Pers. ex Fr.

Türkiye'de doğal olarak yetişen, çiğ tüketildiğinde zehirli olan ancak pişirildiğinde tüketilebilen ve lezzetli bir gıda olan *G. esculante* (Pers.) Fr. (Kuzu göbeği ebesi ve Yalancı kuzu göbeği olarak da bilinmektedir) Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunmaktadır (Michelot ve Toth 1991, Dart 2004). Yüksek rakımlı ve iğne yapraklı ağaçların altında ilkbahar mevsiminde meyve veren *G. esculente*'nin pişirilmeden tüketimi önerilmemekle birlikte halk tarafından toplanıp tüketilmekte ve özellikle bahar aylarında Türkiye'nin batısındaki halk pazarlarında ticari olarak satılmaktadır (Sahin ve diğ. 2021). Bu çalışma için, mantarlar Muğla,

Fethiye'nin Yeşil Üzümlü beldesindeki ormanlık alandan toplanmıştır ve Doç. Dr. Ilgaz Akata (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Türkiye) tarafından morfolojik olarak tanımlanmış. Akata 6998 koduyla Ankara Üniversitesi Herbariyumu'nda (ANK) saklanmaktadır.

### **1.2.2 *Lyophyllum decastes* (Fr.) Singer**

Çürümekte olan döküntüler üzerinde yoğun hatta devasa kümeler halinde yetişen *L. decastes* (Fr.) Singer (Tavuk mantarı olarak da bilinir), genellikle yol yatakları, ormanlık alanlar ve peyzaj alanlarında bulunmaktadır. Yaz aylarında ve ilkbaharın sonuna kadar yetişen *L. decastes* yenilebilir bir mantar türüdür (Breitenbach ve Kränzlin 1991). Bu çalışma için, mantarlar Ankara Üniversitesi Beşevler 10. Yıl Yerleşkesi'nden toplanmıştır ve Doç. Dr. Ilgaz Akata (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Türkiye) tarafından morfolojik olarak tanımlanmıştır. Akata 586 koduyla Ankara Üniversitesi Herbariyumu'nda (ANK) saklanmaktadır (Akata ve diğ. 2019).

### **1.2.3 *Albatrellopsis flettii* (Morse ex Pouzar) Audet**

*A. flettii*, Albatrellaceae familyasına ait bir mantar türüdür ve iğne yapraklı ormanlarda yetişmektedir. Cins kaydı Türkiye için yakın zaman önce yapılmıştır (Altuntas 2021). Bu çalışma için, mantarlar Balıkesir, Kazdağı Milli Parkı'ndaki Karaçam altı mevkiinden toplanmıştır ve Doç. Dr. Ilgaz Akata (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Türkiye) tarafından morfolojik olarak tanımlanmıştır. Akata 7268 koduyla Ankara Üniversitesi Herbariyumu'nda (ANK) saklanmaktadır (Akata ve diğ. 2021).

### **1.2.4 *Lactarius chrysorrheus* Fr.**

*L. chrysorrheus* Fr., Russulaceae familyasındadır. Yaygın olarak sarı sütlü mantar olarak bilinen ve birçok üyesi olan *Lactarius* cinsinin üyesidir. Meşe gibi geniş yapraklı ağaçların altında yaygın olarak bulunur (Verbeken 2001, Lamaison ve Polese 2008). Ülkemizde Ege bölgesinde yoğun olarak bulunur (Alli ve diğ. 2007). Bu

Çalışma için, mantarlar Muğla, Mentefe'deki *Pinus brutia* ormanından toplanmıştır. toplanmıştır ve Doç. Dr. Hakan Allı (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Türkiye) tarafından morfolojik olarak tanımlanmıştır. A. 6881 koduyla Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Herbariumu'nda saklanmaktadır.

## 2. YÖNTEM

### 2.1 Malzemeler

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Sodyum Klorür (NaCl, Sigma 7647-14-5), Maya Ekstresi (NEOGEN MC001), Tripton (CDH 91079-40-2), Agar (Liofilchem 611001), Agaroz (Biomax 9012-36-6), Bakteriyolojik Pepton (Oxoid LP0037), Gliserol (Merck 56-81-5), Tris Base (Sigma 77-86-1), Kristal Viyole (Merck 548-62-9), Etanol (%99,8 Sigma 51976), Metanol (%99,8 Sigma 322415), Proteaz İnhibitör Kokteyli (BioVision K271-500), Dimetil sülfoksit (DMSO, Carlo Erba 445106), Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS, Biowest L0616), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma D1145), RPMI-1640 (Sigma R8758), Penisilin (Capricorn PS-B), Tripsin-EDTA (Sigma T3924), L-glutamin (Gibco 25030081), Fetal Sığır Serumu (FBS, Biowest S1810), Tripkan Blue (Biological Industries 2041813).

#### 2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Etüv (Nüve EN055), CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Nüve EC160), Biyogüvenlik Kabini (Nüve MN 120), Santrifüj (Zentrifugen Mikro 200R), Mini Santrifüj (Zentrifugen EBA20), Otoklav (Nüve OT40L), -80°C Derin Dondurucu (Nüve DF290), Dikey Jel Sistemi (OmniPAGE, Cleaver Scientific), Yatay Jel Elektroforez Sistemi (Major Science ME20), Jel Görüntüleme Cihazı (gelLite, Cleaver Scientific), Güç Kaynağı (Major Science MP-30V), pH Metre (WTW InoLab PH720), Floresan Hücre Sayıcı (Arthur, NanoEntek), Vorteks (Dragon Lab MX-F), Spektrofotometre (Epoch, BioTek), Take 3 NanoDrop Aparatı (Epoch, BioTek), Hassas Terazî (Denver Instrument SI-234), Çalkalamalı İnkübatör (Comecta WY-100), Sonikatör (BANDELIN SonoPlus HD 2070), Manyetik Karıştırıcı (DAIHAN WiseStir MSH 20A), Işık Mikroskobu (Olympus CX21), Floresan Mikroskobu (Olympus BX53F), StepOnePlus Gerçek Zamanlı-PZR Sistemi (Applied Biosystems, Thermo), PCR (Optimus 96G), Saf Su Cihazı (New Human Power I S-UV).

## 2.2 Mantar Türlerinin Toplanması ve Teşhisi

Çalışmada kullanılan makrofungus örnekleri Balıkesir, Muğla ve Ankara yörelerinden 2018-2019 tarihlerinde toplanmıştır. Gerçekleştirilen arazi çalışmalarında toplanan örneklerin fotoğrafı çekilmiş, morfolojik özelliklerinin yanı sıra ekolojisi, lokalite özellikleri, koordinatları ve substrat tipi kayıt altına alınmıştır. Toplanan örnekler için gelişmenin tüm evrelerine ait bireylerin bulunmasına özen gösterilmiştir. Mantar örneklerinin teşhisinde stereo ve binoküler mikroskop kullanılmıştır. Sporlar incelenirken mantarın himenyum tabakasından ince kesitler alınarak, lamın üzerinde potasyum hidroksit (%2, %3, %5), %10'luk amonyum hidroksit ve %5'lik melzer ayırıcı veya kongo kırmızısı çözeltisinden oluşan preparatlar hazırlanmıştır. Sporların enleri ve boyları mikrometrik oküler ile ölçülerek, 10-20 ölçümün en küçük ve en yüksek değeri arasındaki aralık belirlenmiş, sporların boyutları tespit edilmiş ve elde edilen sporların şekli, rengi, çeper kalınlığı, yüzey görünümü, por varlığı, çeşitli kimyasal ayıraçlara verdiği reaksiyonlar, askus içinde veya bazidyum üzerinde kaç tane spor bulunduğu teşhiste veri olarak kullanılmak üzere not alınmıştır. Bunun yanında himenyumda bulunan askus, bazidyum, sistid ve seta gibi yapıların şekil ve boyutları belirlenmiştir (Ergonul ve diğ. 2012).

## 2.3 Ekstraksiyon İşlemleri

Çiğ haldeki mantar örnekleri iki parçaya bölünerek parçalardan bir kısmı kurutma aparatı yardımıyla kurutulurken, diğer kısmı etüvde 200°C'de 20 dakika inkübe edilerek kurutulmuştur. Kurutma işlemlerinin ardından örnekleri öğütülerek toz haline getirilmiştir. Su ekstralarının elde edilmesi amacıyla, organik çözücü ekstraksiyonundan geri kalan mantar örnekleri 80°C'de sıcak su ile ekstre edilmiştir. Su ekstraları süzölmüş ve üzerine hacminin 3 katı kadar etanol ilave edilerek molekül ağırlığı yüksek olan polisakkaritlerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken polisakkarit peleti santrifüjlenerek alınmış ve alkolde çöken polisakkarit örneklerine "HWEP" kodu verilmiştir. Süpernatant kısmı ise [etanol:su, (3:1) karışımı] döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır ve alkolde çözünen polisakkaritlere ise "HWES" kodu verilmiştir. Bu yöntemle elde edilen su ekstraları etanolde çözünen ve çözünmeyenler olarak büyük ölçüde ayrılmıştır (Tel ve diğ. 2015).

## 2.4 Memeli Hücre Kültürü ve Sitotoksitenin Belirlenmesi

Tez çalışması için kullanılmak üzere mantarlardan izole edilen polisakkarit ekstraktların antienflamatuvar etkileri; mürin makrofaj (RAW264.7) hücre hattı, sitotoksik aktiviteleri; insan meme (MDA-MB-231), karaciğer (HepG2), kolon (HT-29), pankreas (PANC-1 ve MIA PaCa-2), serviks (HeLa), endometrial (Ishikawa), medüller tiroid (TT) kanser hücre hatları ve sağlıklı embriyonik böbrek (HEK293) hücre hattı üzerinde test edilmiştir. Kullanılacak hücre hatları 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde ve %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren RPMI veya DMEM besiyerinde çoğaltılarak, yaklaşık %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. Özetle, %0,25'lik Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılan hücreler, taze besiyeri yardımıyla falkona toplanmış ve ardından 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve elde edilen pelet taze besiyeri ile çözülmüştür. Süspansiyondaki hücre yoğunluğu Tripan mavisi boyası ve Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskobu altında sayılarak belirlenmiştir. Pasajlama işleminin ardından, polisakkaritlerin hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] kimyasalı kullanılarak tespit edilmiştir. Özetle, serum fizyolojik (%0,9 sodyum klorür) solüsyonu ile çözülen polisakkaritler değişik konsantrasyonlarda hazırlanarak, 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş hücrelere (her kuyucukta ortalama  $2 \times 10^3$  hücre olacak şekilde) uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan plakalardan süre sonunda besiyeri dikkatlice uzaklaştırılarak 100 µL taze besiyeri ortamı ile 10 µL MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklenmiştir. 37°C'de 3 saat inkübasyonun ardından ortaya çıkan formazon kristalleri 50 µL DMSO yardımıyla çözülmüştür. Absorbans, bir mikropilaka spektrofotometre okuyucu kullanılarak 590nm'de ölçülmüştür. Hücre canlılığı yüzdesi, örneklerin absorbansının kontrol grubu absorbansına bölünmesi ve 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Yüzde hesap kullanılarak elde edilen EC50 (hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyon) değeri her örnek için sonraki çalışmalarda kullanılmıştır (Sahin ve diğ. 2021).



## 2.5 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

Koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları için her kuyuda  $1 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübe edildikten sonra sitotoksik aktivite göstermiş ve EC50 dozları bilinen polisakkaritler uygulanmıştır. Hücrelerin her 2-3 günde bir besiyeri ortamları yenilenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. Koloni gelişimi inverted mikroskop ile gözlenmiş ve yaklaşık 10 gün sonunda gelişen koloniler önce soğuk metanolla fikse edilmiş, daha sonra 0,4 mg/ml konsantrasyondaki kristal violet ile boyanmıştır. Ardından ortamdaki fazla boyayı uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapılmış ve boyanmış olan koloniler gece boyu kuruması için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Guzmán ve diğ. 2014). Doz grupları ve kontrol grubu fotoğraflanarak ImageJ programı yardımıyla koloniler sayılmıştır (Schneider ve diğ. 2012).

## 2.6 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

Sitotoksik etki gösteren polisakkaritlerin hücreler üzerinde invazyon kapasitesini nasıl etkilediği, İnvazyon kapları (Trans-well matrigel invasion chamber) kullanılarak 24 kuyucuklu mikropalakalarda geręekleřtirilmiřtir. Özetle, invazyon kuyucuğuna serum (%20 FBS) içeren kùltür ortamı, matrigel membranın (8  $\mu\text{m}$  por genişliğine sahip) üst kısmına ise, gece boyunca ilgili polisakkaritin EC50 dozunu içeren serumsuz kùltür ortamına hücreler ekilmiştir. Gece boyunca inkübasyona bırakılan plakada, membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler pamuk yardımıyla silinerek temizlenmiştir. Membranın alt yüzeyine göç etmiş hücre miktarı ise kristal violet ile boyanarak ışık mikroskobu altında sayılarak değerlendirilmiştir (Zeng ve diğ. 2018).

## 2.7 Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

Sitotoksik etki gösteren polisakkaritlerin migrasyon üzerine etkisini belirlemek amacıyla ilgili hücreler 6 kuyucuklu mikropalakalara ( $2 \times 10^5$  hücre/kuyu) ekilmiş ve %80-90 yoğunluğa ulaştığında hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştıtarak fosfat

tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile ortam nazikçe yıkanmıştır. 200 µL steril pipet ucu kullanılarak kuyunun zemini düz bir şekilde çizilmiş ve bu işlemden sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak kazınan hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu sadece serumlu besiyerinde kültüre edilmiş, doz uygulanan grup ise ilgili polisakkaritin EC50 konsantrasyonunu içeren besiyerinde kültüre edilmiştir. İlk olarak 0. saatte hücreler fotoğraflanmış, kontrol grubu kapanana kadar tüm kuyular 12 saatte bir fotoğraflanmıştır (Jonkman ve diğ. 2014). Son olarak, kontrol ve polisakkarit uygulanan gruptaki yara kapatma kapasiteleri, fotoğrafların ImageJ programı ile analiz edilmesiyle belirlenmiştir.

## 2.8 Antienflamatuvar Etkilerin Belirlenmesi

Mürin makrofaj (RAW 264.7) hücre hattında inflamasyon oluşturmak amacıyla Lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır. Bu kapsamda, RAW264.7 hücreleri %10 FBS içeren DMEM besiyerinde, 12 kuyucuklu kültür plakasına  $1 \times 10^5$  hücre (kuyu başına) ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde polisakkarit örnekleri ve 1 µg/mL konsantrasyonunda LPS uygulanmıştır (1 saat sonra). 24 saat inkübasyonun ardından besiyerleri Nitrik oksit (NO) ölçümleri için RIPA tamponu içinde toplanarak parçalanmıştır. Tez çalışması kapsamında nikrik oksit miktarı düzeyleri Griess metoduna (Griess 1879) göre belirlenmiştir. NO miktarı RAW264.7 hücrelerinde LPS uygulaması ile inflamasyon oluşturulması sonunda toplanan besiyerinde saptanmıştır. Bu kapsamda, 100 µL Griess reaktifi (%5 fosforik asit içinde hazırlanmış %1 sülfanilamid ve %0,1 naftiletilediamin) ve toplanan besiyerinden 100 µL karıştırılarak 96 kuyucuklu plakada 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve bu süre sonunda oluşan renk 540 nm'de ( $OD_{540}$ ) ölçülmüştür. NO değerini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda sodyum nitrit ( $NaNO_2$ ) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi hesaplamada kullanılmıştır (Hwang ve diğ. 2016).

Ek olarak, aynı uygulama tekrar edilerek Tablo 2.1'de verilen inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir. Bu amaçla, Total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Gerçek zamanlı PZR işlemleri "Apoptozda görev alan genlerin mRNA

düzeyinde ekspresyonlarının analizi” başlığı altındaki materyal ve yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada GAPDH geni kontrol (house keeping) gen olarak kullanılmıştır ve veriler GAPDH geniyle normalize edilmiştir. Tüm genler için primer dizileri NCBI veri tabanında kontrol edilmiş ve Sentebiolab (Sentegen, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Veriler, GeneGlobe Veri Analiz Merkezi (Qiagen) üzerindeki araçlar kullanılarak analiz edilmiştir.

**Tablo 2.1:** İnflamasyon ilişkili genlerin primer dizileri.

Gen	Primer Dizisi
<b>GAPDH</b>	<b>F:</b> CATCACTGCCACCCAGAAGACTG <b>R:</b> ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<b>iNOS(NOS2)</b>	<b>F:</b> GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC <b>R:</b> CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
<b>COX-2</b>	<b>F:</b> GCGACATACTCAAGCAGGAGCA <b>R:</b> AGTGGTAACCGCTCAGGTGTTG

## 2.9 Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS)’nin Belirlenmesi

Bu çalışmada, en iyi aktiviteyi gösteren polisakkaritlerin ilgili hücre hatları üzerindeki Total oksidan ve total antioksidan düzeyine etkisini araştırmak amacıyla TAS ve TOS kiti (Rel Assay, TÜRKİYE) üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamış, doz grubu için MTT yöntemiyle sitotoksitenin belirlenmesi sonucu belirlenen EC50 konsantrasyonu uygulanmıştır. 72 saat uygulamanın ardından hücreler RIPA tamponu yardımıyla toplanarak sonike edilmiş ve 30 dakika buzda inkübe edilmiştir. TOS testi için, 96 kuyucuklu plakaya 200 µL TOS Reaktifi 1 eklenmiş ardından toplanan hücre lizatı ve TOS standartından 30 µL ilave edilmiştir. 530 nm’de birinci okuma yapıldıktan sonra kuyucukların üzerine TOS Reaktifi 2 eklenmiş ve 37°C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından orbital shaker yardımıyla çalkalanan plakalar 530 nm’de ikinci kez okunmuştur. TAS testi için ise, 96 kuyucuklu plakaya 200 µL TAS Reaktifi 1 eklenmiş ardından toplanan hücre lizatı ve TAS standartından 15 µL ilave edilmiştir. 660 nm’de birinci okuma yapıldıktan sonra kuyucukların üzerine 30 µL TAS Reaktifi 2 eklenmiş ve 37°C’de 5 dakika

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından orbital shaker yardımıyla çalkalanan plakalar 660 nm’de ikinci kez okunmuştur. Oksidatif stres indeksi (OSI), TAS’ın TOS’a bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır (Sevindik ve Bal 2021).

## 2.10 Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi için Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti (BioVision) üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. En iyi aktiviteye sahip polisakkaritlerin EC50 değerleri kullanılarak 6 kuyucuklu plakalarda 72 saat uygulama yapılmıştır. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanarak Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılmıştır. 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen hücreler, PBS ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve temiz pelet kitte yer alan bağlanma tamponu ile çözülmüştür. Hücre süspansiyonu üzerine 5 µL Annexin V ve 2 µL PI boya eklenerek tekrar karıştırılmıştır. Örnekler 20 dakika süreyle karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 20 µL hacimde slayta yüklenen örnekler floresans imaj sitometri cihazında (Arthur, NanoEntek) görüntülenerek canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri elde edilmiştir (Sahin ve diğ. 2021).

## 2.11 Toplam RNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Total RNA izolasyonu Analytik Jena markasının innuPREP RNA Mini Kit’i kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 6 kuyucuklu plakaya ekilen  $3 \times 10^5$  hücreler 72 saat etkili polisakkarit ekstraktlarının EC50 dozuyla muamele edilmiştir. Daha sonra, kitte yer alan parçalama tamponu ile toplanan hücre lizatı 2 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bir alıcı tüpün içerisine yerleştirilen D çevirme filtresi üzerine aktarılan lizat 11.000g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın üzerine +4°C’de bekletilen %70’lik ethanol’dan 400 µL eklenerek karıştırılmış ve başka bir alıcı tüpün içerisine yerleştirilen R çevirme filtresine aktarılmıştır. 11.000g’de 2 dakika santrifüj işlemi tekrar edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, filtre yeni bir alıcı tüp üzerine aktarılarak üzerine 500 µL HS yıkama solüsyonu eklenmiştir. 11.000g’de

2 dakika santrifüj işleminin ardından süpernatant tekrar uzaklaştırılmış ve filtre yeni bir alıcı tüpe aktarılmıştır. Üzerine 700 µL LS yıkama solüsyonu eklenmiş ve 11.000g'de 2 dakika santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Bu işlemin ardından, süpernatant uzaklaştırılmış ve filtre 11.000g'de 3 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Son olarak, filtre steril ependorf üzerine aktarılarak üzerine 45 µL RNaz içermeyen steril su eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen filtre 11.000g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen toplam RNA'lar -80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlenmiş ve Epoch Mikropilaka Okuyuculu Spektrofotometre (BioTek)'de Take 3 aparatı yardımıyla 260/280nm dalga boylarında ölçülerek miktarı ve kalitesi belirlenmiştir. cDNA sentezi sırasında 2,5 µg RNA kullanılmıştır.

İzole edilen RNA'ların görüntülenmesi için yatay jel elektroforezi kullanılmıştır. %1'lik agaroz jel ile Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan jel mikrodalga fırında kontrollü olarak ısıtılmış ve agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş olan agaroz çözeltisi soğutulmuş 0,75 µL EtBr eklenmiştir ve elektroforez tablasına dökülerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklara yüklenen DNA marker ve RNA'lar elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirilerek, güç kaynağına bağlanmıştır. Elektroforez tankı 1x TAE tamponu ile jelin üstü kapanana kadar doldurulmuştur. Sistem, 90 Volt, 500 mA'de 45 dakika yürütülmüştür. Son olarak, jel gelLite jel görüntüleme cihazı (Clever Scientific) yardımıyla görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Kuyucuklara yüklenen miktarlar Tablo 2.2'de belirtilmiştir.

**Tablo 2.2:** Kuyucuklara yüklenen RNA ve marker konsantrasyonları

**RNA için;**

**Marker için;**

5 µL RNA örneği	<b>Yüklenen hacim:</b> 8 µL	6 µL kb DNA ladder marker	<b>Yüklenen hacim:</b> 5 µL
2 µL boya (6x loading dye)		2 µL boya (6xloading dye)	
1µL DNase/RNase free water		2 µL DNase/RNase free water	

## 2.12 Apoptozda Görev Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Analizi

Tablo 2.3'te verilen apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir.

Epoch Mikropilaka Okuyucu Spektrofotometre (BioTek) ile miktarları belirlen RNA'lardan cDNA sentezi ABM markasının OneScript cDNA Sentez Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, her örnek için 1 µL Oligo(dT) ve 1 µL dNTP ve RNaz içermeyen steril su karıştırılarak blok ısıtıcıda 65°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, her örnek için 4 µL 5X RT Buffer, 0,5 µL RNaseOFF Ribonükleaz İnhibitörü ve 1 µL OneScript Plus RTase olacak şekilde hazırlanan karışım tüplere dağıtılmış ve 50°C'de 60 dakika, ardından 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, Gerçek zamanlı RT-PZR yapmak üzere -20°C muhafaza edilmiştir.

Tablo 2.3'te belirtilen proteinlerin gen ifade düzeylerine etkisini saptamak için, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptanmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemi KiloGreen MasterMix kiti (abm) kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 2,5 µL cDNA (1:1 seyreltilmiş), 7 µL KiloGreen floresan boya ve primer karışımı ve 1,5 µL steril su 96 kuyulu plakanın kuyularına yüklenerek PZR cihazına konulmuştur. Her gen için bu optimizasyon yapılarak uygun koşullar belirlenmiştir. Çalışmada GAPDH geni kontrol (house keeping) gen olarak kullanılmıştır ve veriler GAPDH geniyle normalize edilmiştir. Tüm genler için primer dizileri NCBI veri tabanında kontrol edilmiş ve Sentebiolab (Sentegen, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Veriler, GeneGlobe Veri Analiz Merkezi (Qiagen) üzerindeki araçlar kullanılarak analiz edilmiştir (Sahin ve diğ. 2021).

**Tablo 2.3.** Apoptoz ilişkili genlerin primer dizileri.

<b>Gen</b>	<b>Primer Dizileri</b>
<b>GAPDH</b>	<b>F:</b> GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG <b>R:</b> ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<b>P53</b>	<b>F:</b> CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG <b>R:</b> GGATGGTGGTACAGTCAGAGC
<b>BAX</b>	<b>F:</b> TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG <b>R:</b> TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
<b>BCL2</b>	<b>F:</b> ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT <b>R:</b> GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<b>CASP3</b>	<b>F:</b> GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG <b>R:</b> GCATCGACATCTGTACCAGACC
<b>CASP8</b>	<b>F:</b> AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA <b>R:</b> TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
<b>CASP9</b>	<b>F:</b> GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT <b>R:</b> CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

### **2.13 Protein Tayini**

Sitotoksik etkisi tespit edilen polisakkaritlerin EC50 dozları, 100 mm petri kaplarına ekilen hücreler üzerine 96 saat uygulanmış ve polisakkarit uygulanmayan kontrol hücreleri ile çalışma grubundaki tüm örneklerin besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. RIPA (%0,1 Proteaz inhibitör kokteyli içeren) tamponu yardımıyla toplanan hücreler sonike edilerek 30 dakika buzda inkübe edilmiştir. Ardından 4°C’de ve 10.000g’de 15 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı alınmıştır.

Örneklerin protein konsantrasyonu, BCA Protein Assay kiti (BioVision) üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılarak tespit edilmiştir. Kısaca, BCA standardı (10 mg/mL) ile protein örnekleri 96 kuyulu plakaya dağıtılan BCA çalışma reaktifi (bikinkoninik asit, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, sodyum tartarat ve bakır(II)sülfat pentahidrat içeren) üzerine eklenmiş ve 37°C’de 30 dakika inkübe

edilmiştir. Daha sonra, plaka oda sıcaklığında 5 dakika soğumaya bırakılmış ve bir mikrolaka spektrofotometre okuyucu kullanılarak 562 nm’de ( $OD_{562}$ ) absorbans değerleri ölçülmüştür.

## 2.14 Protein Ekspresyon Düzeylerinin Tespit Edilmesi

Protein ekspresyon düzeylerinin tespit edilmesi için OmniPAGE Dikey Jel Sistemi (Cleaver Scientific) kullanılmıştır. Elektroforez, iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirildi. Bu amaçla %8,5’luk ayrışma jeli ve %4’lük yükleme jeli, Tablo 2.4’te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (Laemmli 1970).

**Tablo 2.4.** Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması

Jel içeriği		Ayrıştırma jeli (%8,5)	Yükleme jeli (%4)
Akrilamid/ Bisakrilamid		2,85 ml	0,75 ml
Distile su		4,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl Tamponu	pH 8,8	2,5 ml	1,25 ml
	pH 6,8		
% 10 SDS		0,15 ml	0,1 ml
APS		0,05 ml	0,025 ml
TEMED		0,0065 ml	0,005 ml

Cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirilip plakalar arasına önce ayrıştırma jeli dökülmüş, polimerleşmesinin ardından yükleme jeli dökülerek oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra, molekül ağırlıkları bilinen proteinleri içeren Opti-Protein Marker (ABM) ve BCA yöntemiyle konsantrasyonları eşit miktara getirilen örnekler (200  $\mu$ g/30  $\mu$ L) jele yüklenerek elektroforez başlatılmıştır. 1x elektroforez tamponu varlığında, numunelerin ayrışma jeline kadar beraber ilerlemesi için sistemin akımı önce 20 mA’e (200 Volt), daha sonra ayrışma için 25 mA’e ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez sonunda cam plakalardan ayrılan jel, 1x transfer tamponu içerisinde nitroselüloz membran ile sandviçlenmiştir. Bu amaçla kullanılacak olan nitroselüloz membran, süngerler ve filtre kağıtları soğuk 1x transfer tamponu ile iyice ıslatılmıştır. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, filtre kâğıdı, jel, nitroselüloz membran, filtre kâğıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üst üste



gelecek şekilde yerleştirilmiş ve aparat kapatılmıştır. Hazırlanan sandviç transfer tankına yerleştirilmiştir. Transfer işlemi, 1x tampon içerisinde +4°C’de 90 Volt ve 400 mA’de 90 dakika gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra sandviç aparatının içerisinde bulunan membranlar, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi için %5’lik bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, membranlar primer antikora alınarak 4°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından sekonder antikorlarla 1 saat inkübe edilen membranlar görüntüleme için, Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Alkalen Fosfataz (ALP) substrat çözeltisi (1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, Dietanolamin, NBT (Nitroblue tetrazolium), PMS ve BCIP (5-bromo-4-kloro-indol-fosfat) ile yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot kurutularak karanlık ortamda folyo içerisinde saklanmıştır.

Protein ekspresyon düzeyleri, membranların çekilen fotoğrafları kullanılarak ImageJ uygulaması yardımıyla densitometrik olarak analiz edilmiştir.

## 2.15 Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi

Polisakkaritlerin antibiyofilm etkisini belirlemek için kullanılan insan patojeni maya ve bakteri türleri Tablo 2.5’te verilmiştir. Maya türlerinden *Candida glabrata* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, *Candida albicans*, *Candida krusei* ve *Candida tropicalis* türleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Doç. Dr. Özlem Abacı Günyar) ve patojen bakteriler ise Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bakterioloji Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir.

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Pseudomonas aeruginosa* Luria-Bertani (LB) besiyerinde, *Streptococcus mutans* ise Todd-Hewitt Broth (THB) besi ortamında 37°C’de kültürlenmiştir. Maya türleri ise Sabouraud Dextrose Broth (BD Difco) besi ortamında 37°C’de inkübatörde geliştirilmiştir. Antibiyofilm aktivite tayini, hücre yoğunluğu McFarland 0,5 olacak şekilde, polisakkaritlerin farklı konsantrasyonları (10-50

mg/mL) uygulanan 96 kuyulu plakalarda XTT kiti (SKU: 20-300-1000, Biological Industries) yardımıyla değerlendirilmiştir.

**Tablo 2.5.** Çalışmada kullanılan bakteri ve maya türleri.

<b>Bakteri türleri</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536
<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863
<i>Bacillus pumilus</i> NRRL-BD-142
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 2517
<b>Maya türleri</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC 64548
<i>Candida tropicalis</i> RSKK 665
<i>Candida glabrata</i> (klinik izolat)
<i>Candida krusei</i> ATCC 22019

Bu amaçla, 96 kuyulu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışılan ve polisakkaritlerin farklı dozları uygulanan kuyular 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 37°C’de inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra kuyular PBS ile yıkanarak planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır. Ardından, 45 dakika 37°C’de kurumaya bırakılan plakalara 50 µL XTT reaktifi eklenerek 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan turuncu rengin absorbansı bir mikropilaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla okunmuştur. Spesifik absorbans, 450 nm absorbans değerinden 630 nm absorbans değerinin çıkarılması ile elde edilmiş ve hücre canlılığı yüzdesi, örneklerin absorbansının kontrol grubu absorbansına bölünmesi ve 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Tüm çalışmalarda kontrol grubu olarak polisakkarit içermeyen hücre kültürü kullanılmıştır (Daikh ve diğ. 2020).

## **2.16 Antibiyofilm Aktivitenin Floresan Görüntüleme ile Analizi**

Maksimum antibiyofilm etkisi gösteren polisakkaritlerin etkili dozları ve hücre kültürü içeren kuyulara 14 mm`lik steril yuvarlak lameller ilave edilmiştir. Lamel yüzeyinde biyofilm oluşumu için örnekler 96 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda lamel yüzeyine tutunmayan hücreler dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha

sonra lameller KiloGreen ve Propidyum iyodür (PI) boya karışımı (1:3) içeren steril su ile muamele edilerek karanlık ortamda 15 dakika bekletilmiştir. Kontrol grubu ve polisakkarit uygulanan örnekler floresan mikroskopta 100x büyütmede incelenmiştir (Daikh ve diğ. 2020).

## **2.17 İstatistiksel Analiz**

Tüm veriler üç tekrar halinde ölçülmüş ve sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak sunulmuştur. Kontrol ve doz uygulanan gruplar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar için GraphPad Prism v.9 uygulaması kullanılmıştır ve  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

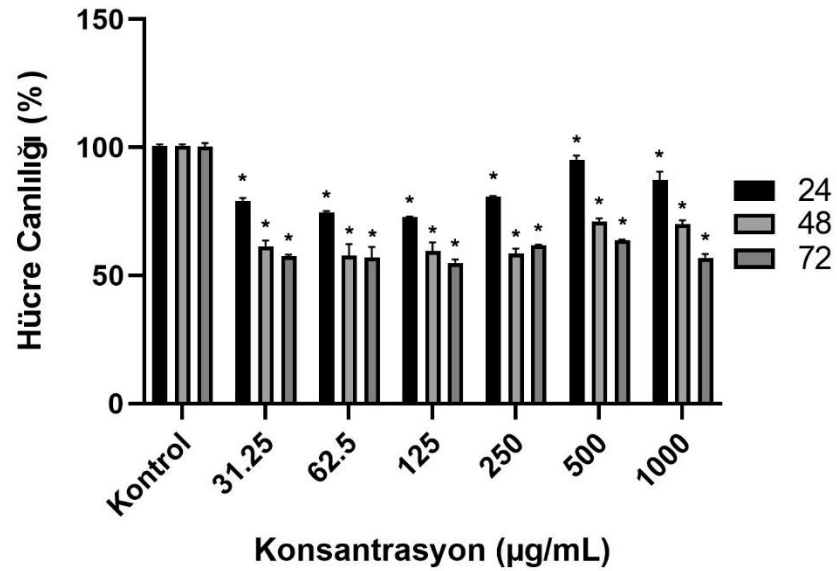
### 3. BULGULAR

#### 3.1 MTT Metoduyla Hücre Canlılığın Belirlenmesi

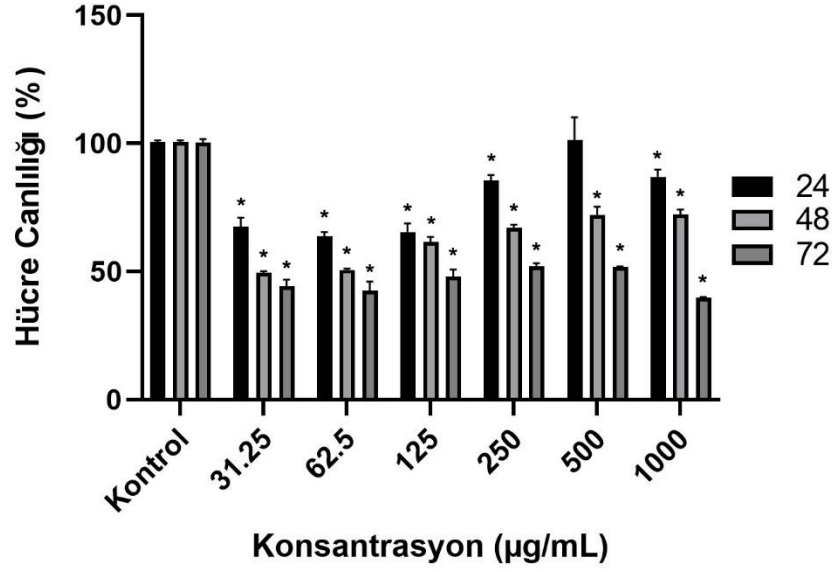
Tez çalışmasında yer alan hücre hatları üzerinde farklı konsantrasyonlarda polisakkarit örneklerinin 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT metodu kullanılmış ve tüm basamaklar yöntem kısmında verilmiştir.

##### 3.1.1 Polisakkaritlerin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

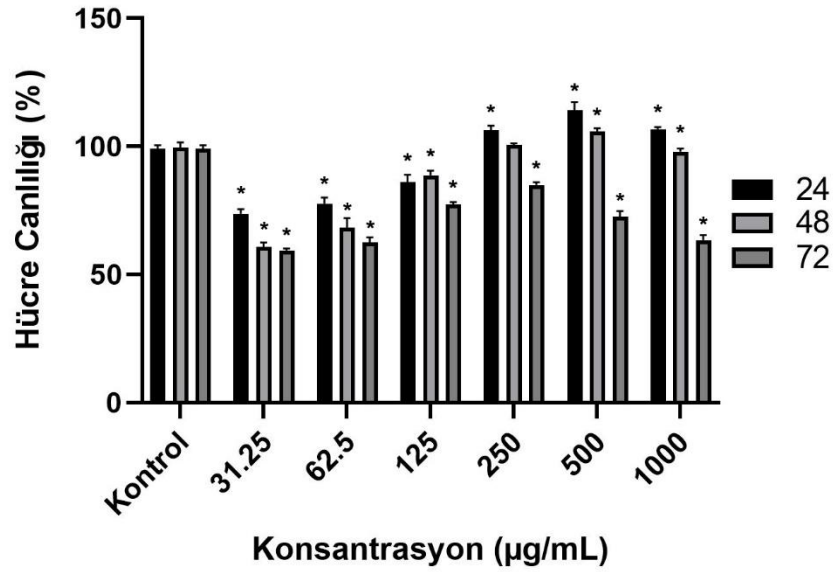
HeLa hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir. (Şekil 3.1-8).



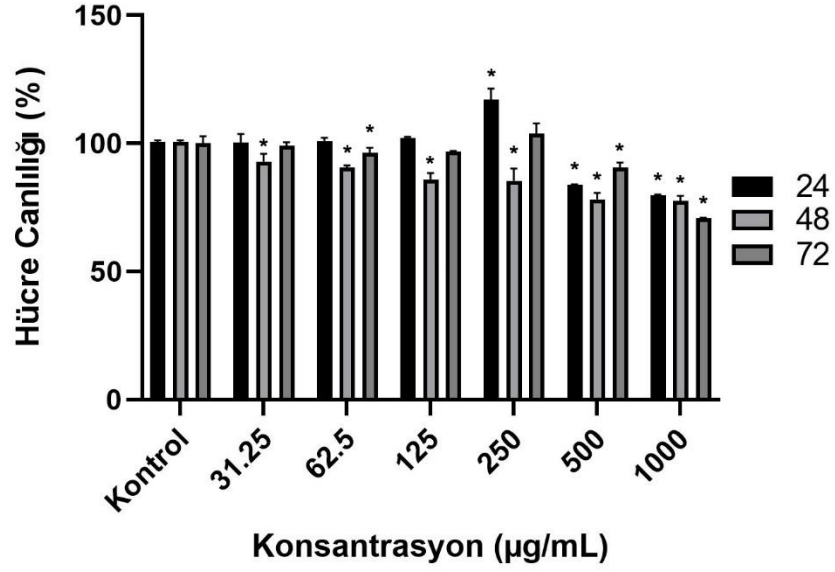
Şekil 3.1: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).



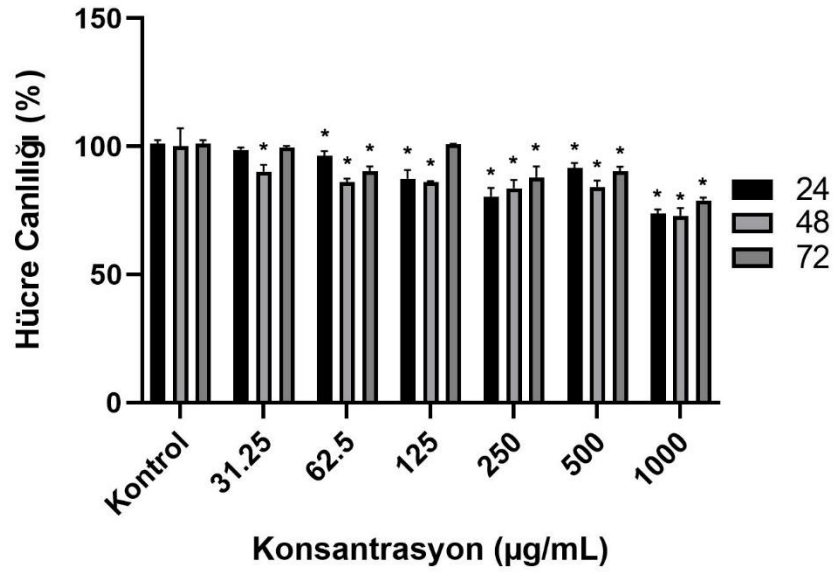
Şekil 3.2: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



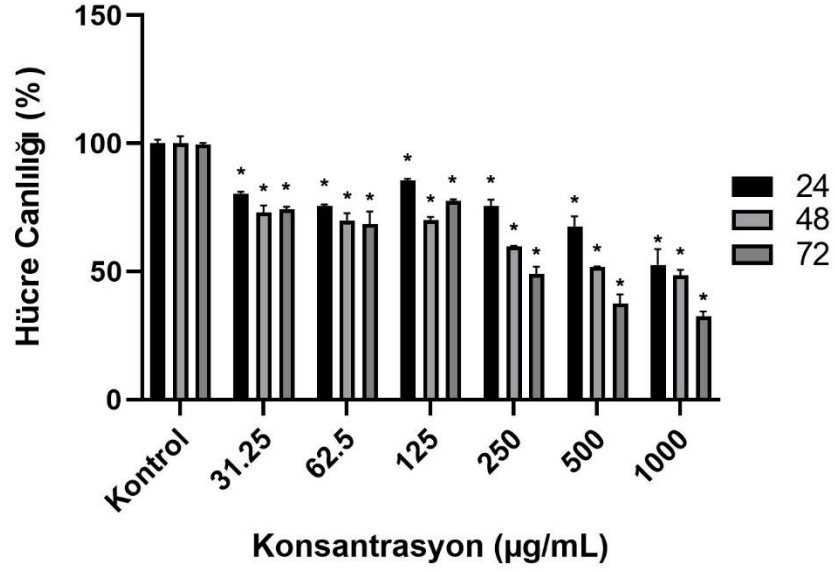
Şekil 3.3: Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



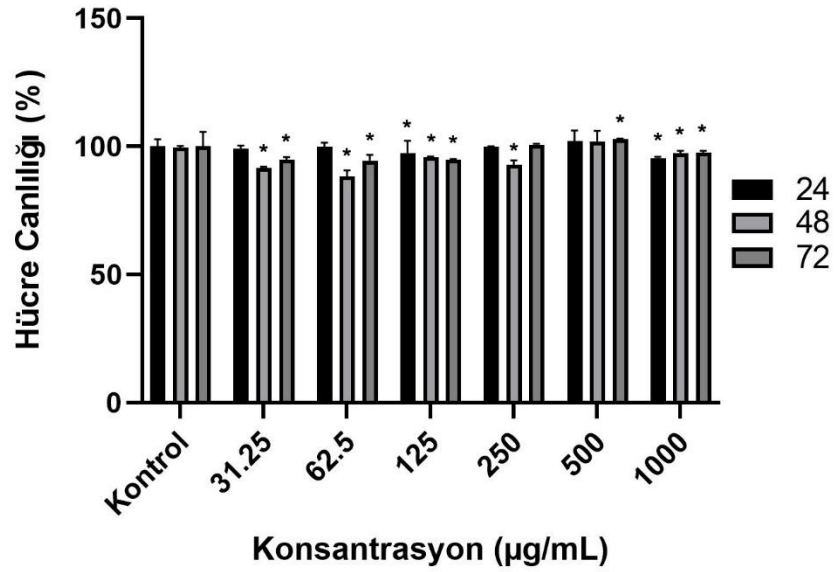
Şekil 3.4: Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



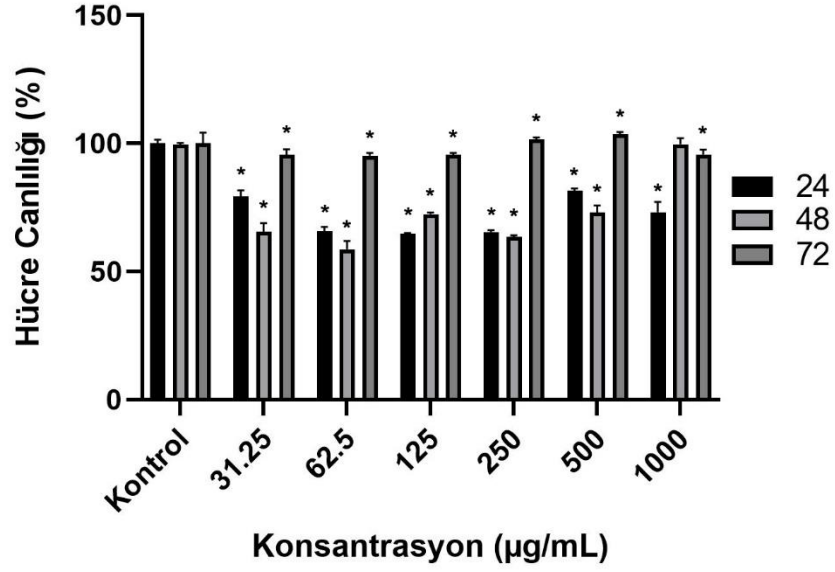
Şekil 3.5: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.6:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.7:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

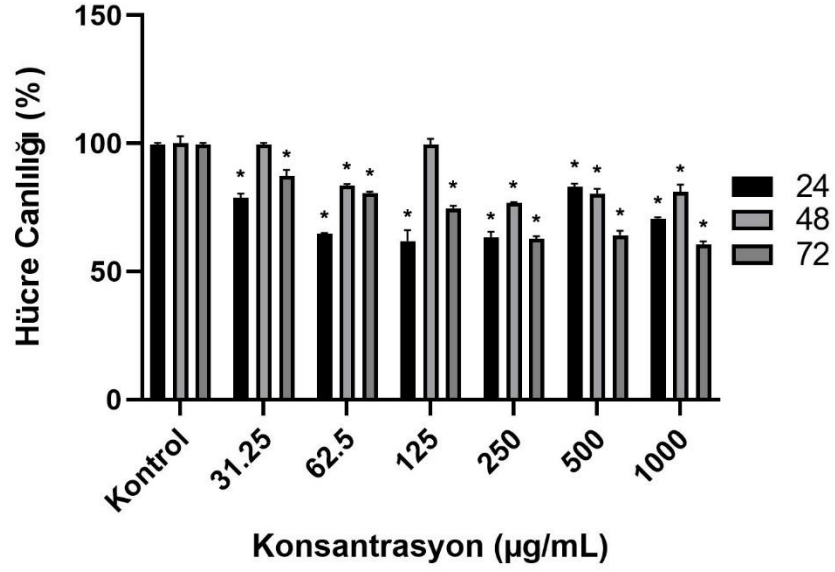


**Şekil 3.8:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoarrheus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HeLa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

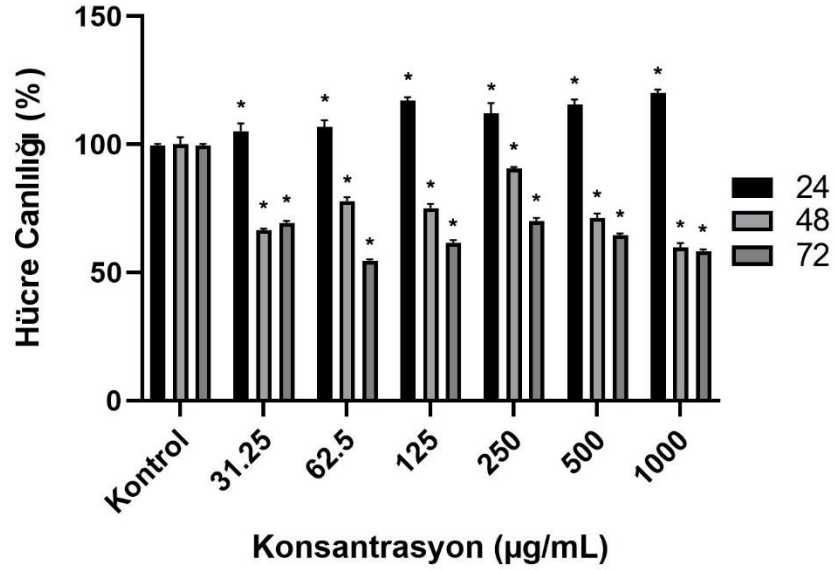
### 3.1.2 Polisakkaritlerin HepG2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

HepG2 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.9-16).

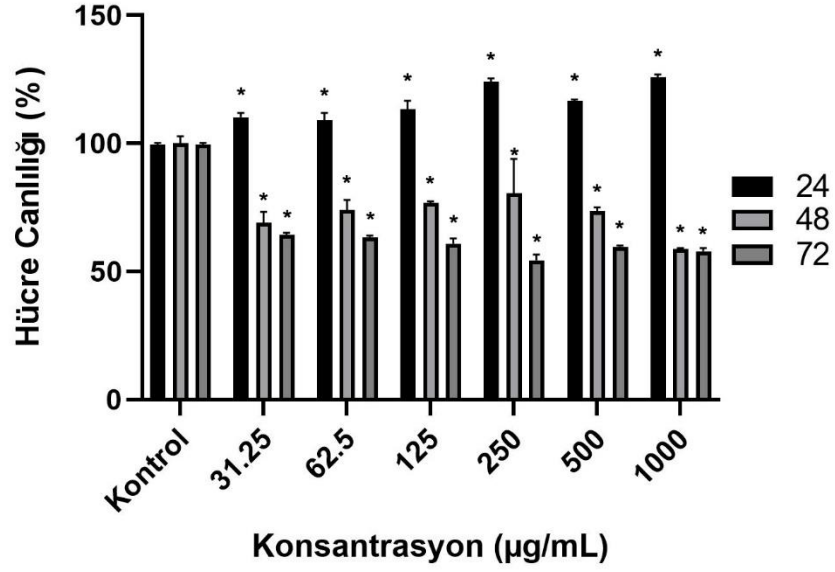




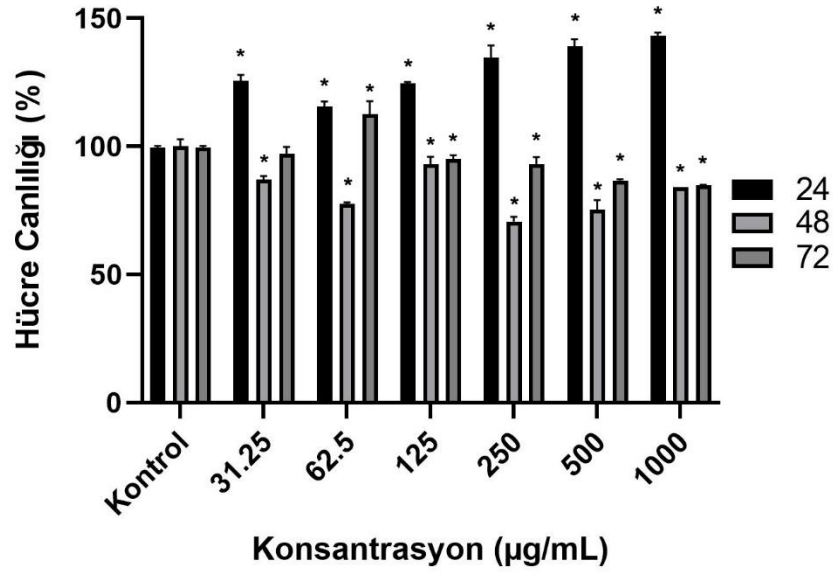
**Şekil 3.9:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



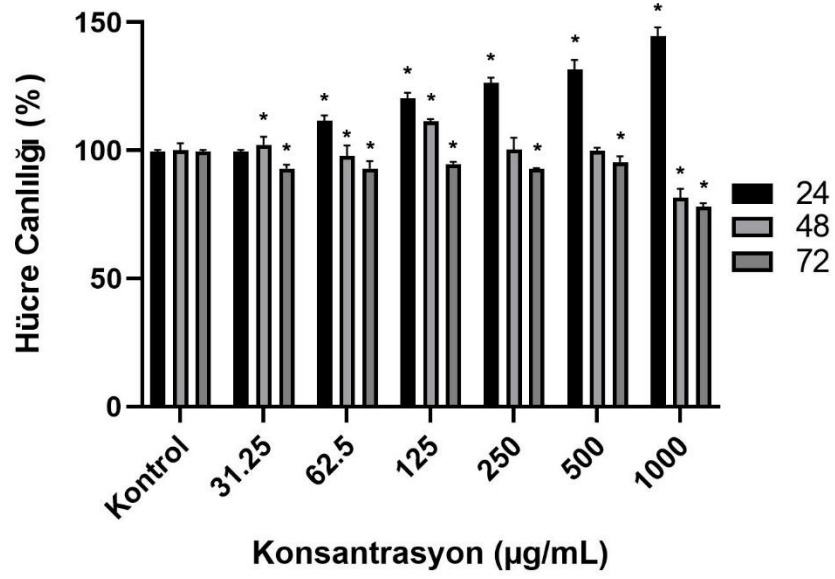
**Şekil 3.10:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



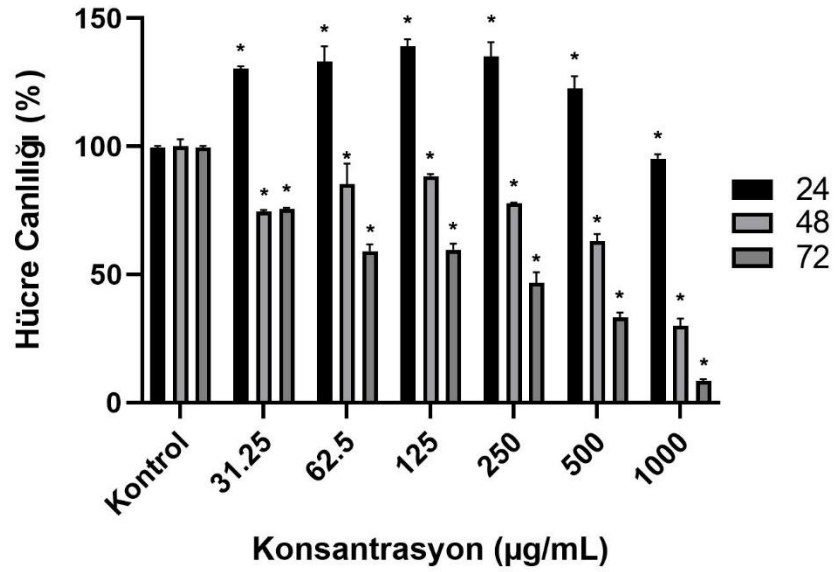
**Şekil 3.11:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



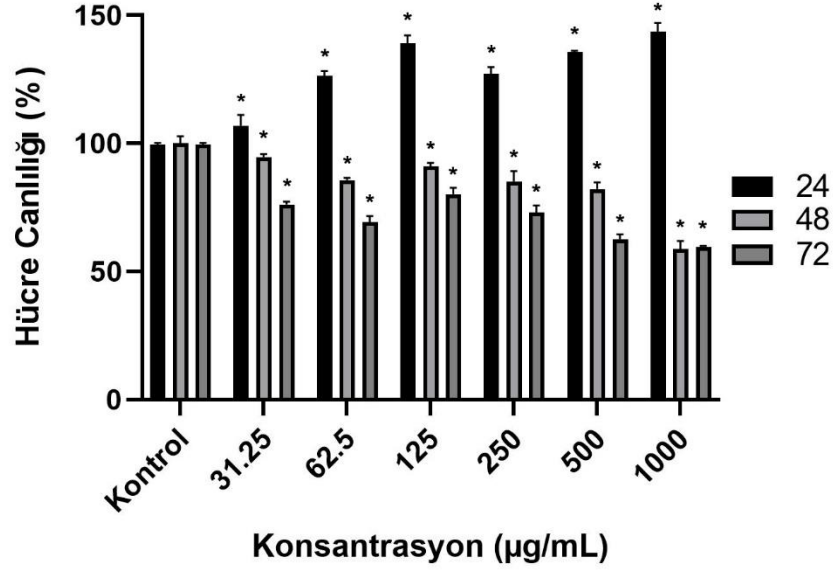
**Şekil 3.12:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



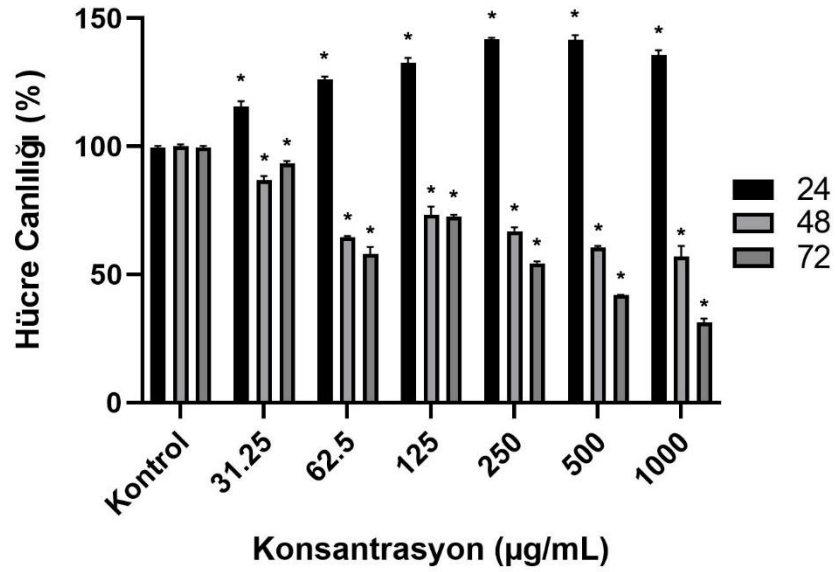
**Şekil 3.13:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.14:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



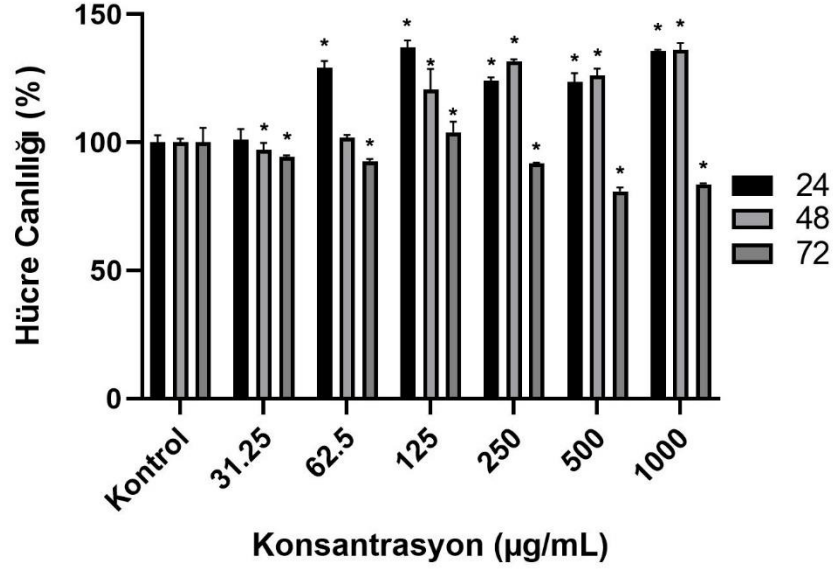
**Şekil 3.15:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoarrheus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).



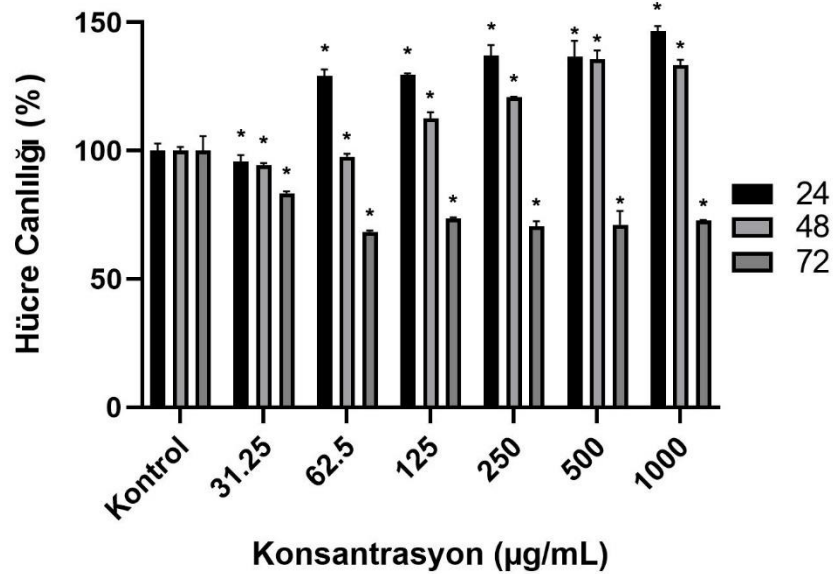
**Şekil 3.16:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoarrheus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HepG2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).

### 3.1.3 Polisakkaritlerin HT-29 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

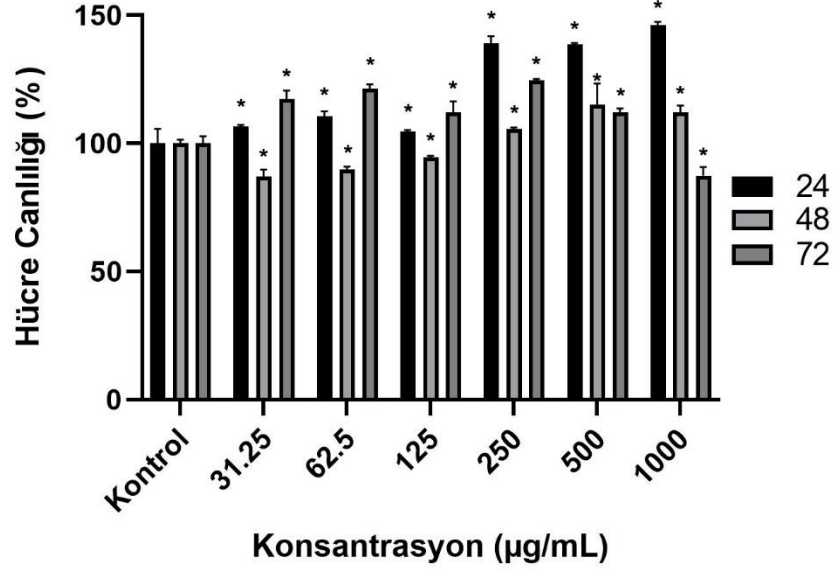
HT-29 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.17-24).



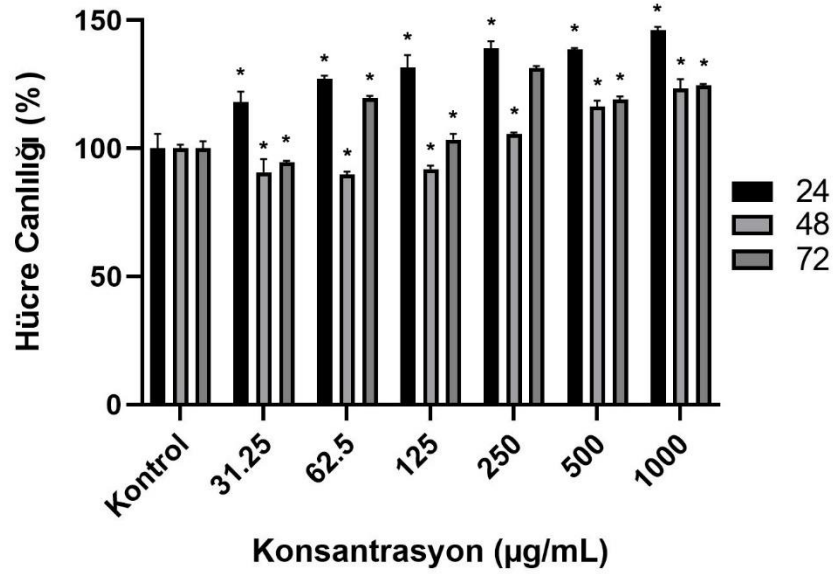
Şekil 3.17: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



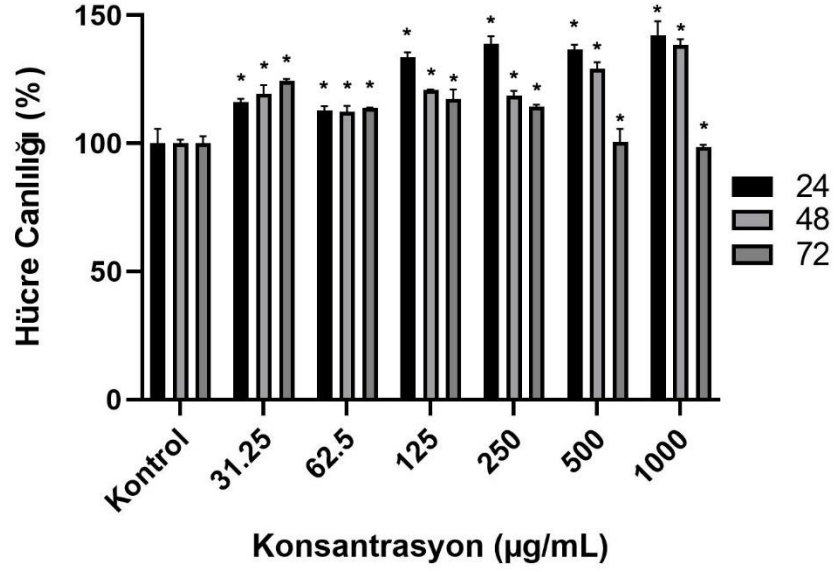
Şekil 3.18: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



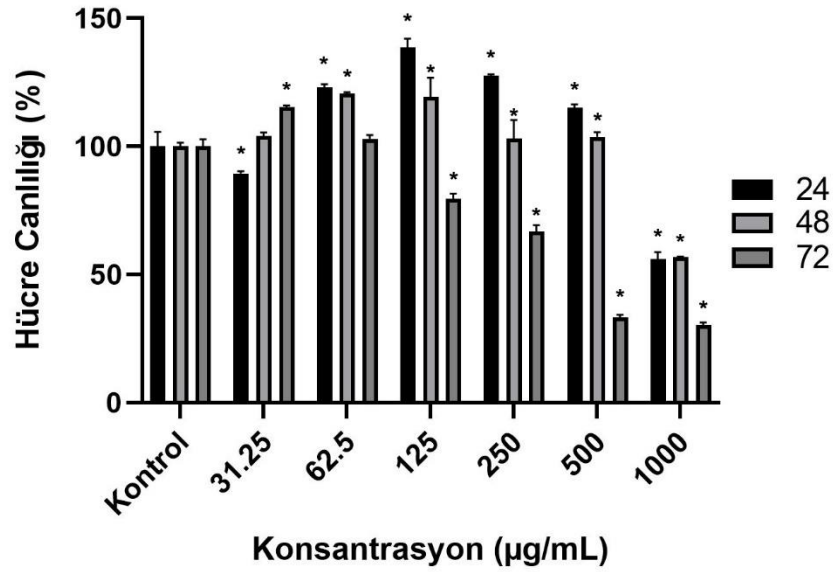
**Şekil 3.19:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



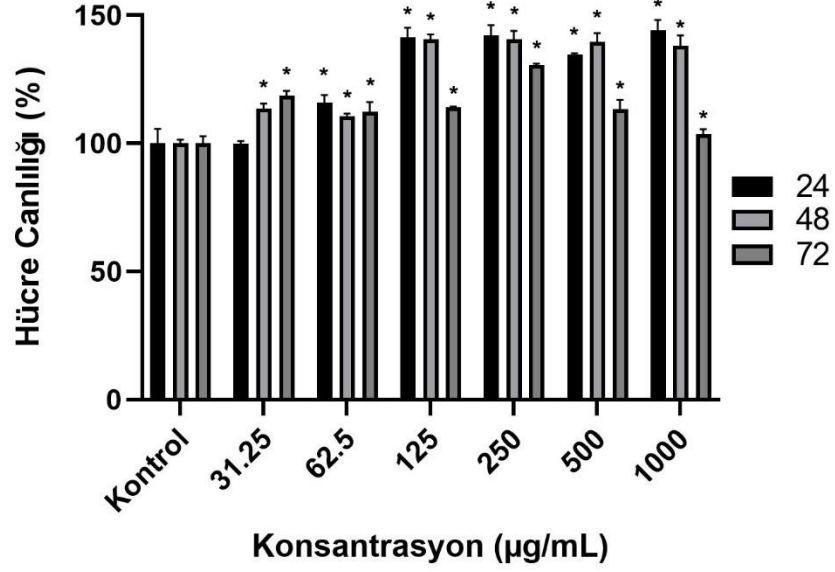
**Şekil 3.20:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



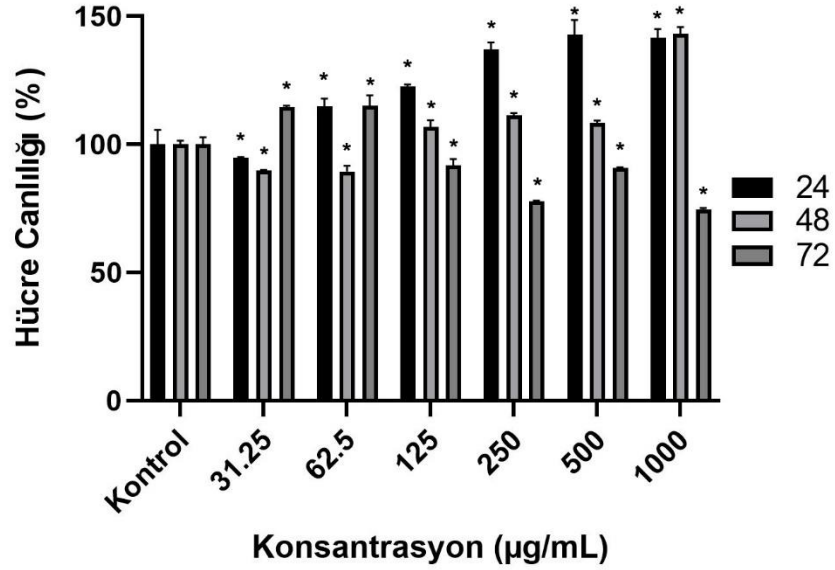
**Şekil 3.21:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.22:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.23:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

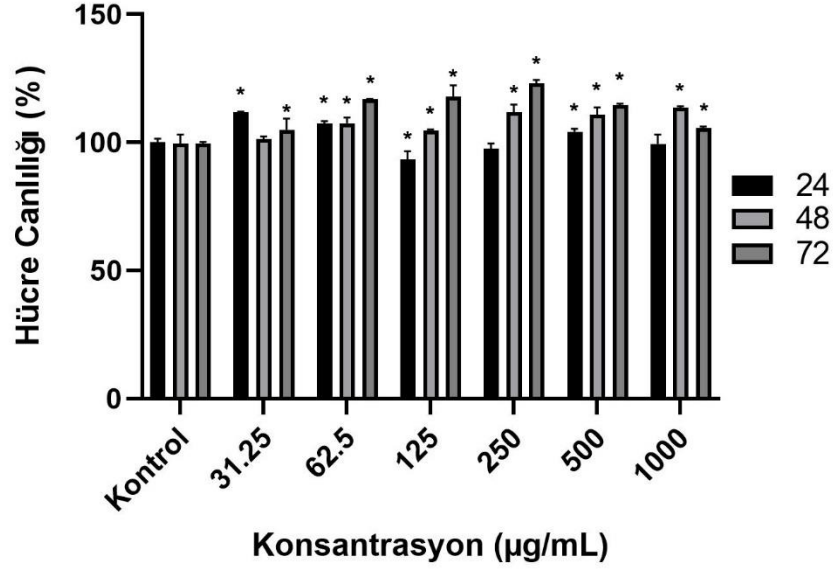


**Şekil 3.24:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HT-29 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

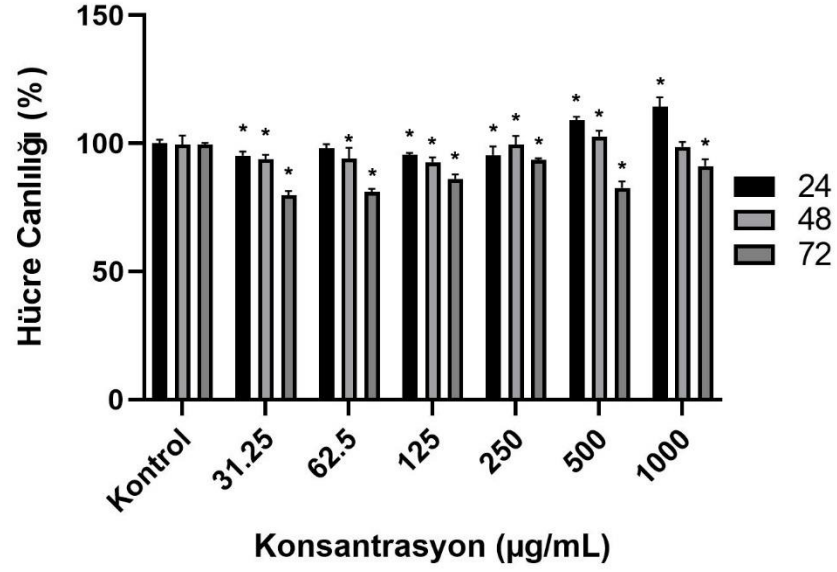


### 3.1.4 Polisakkaritlerin Ishikawa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

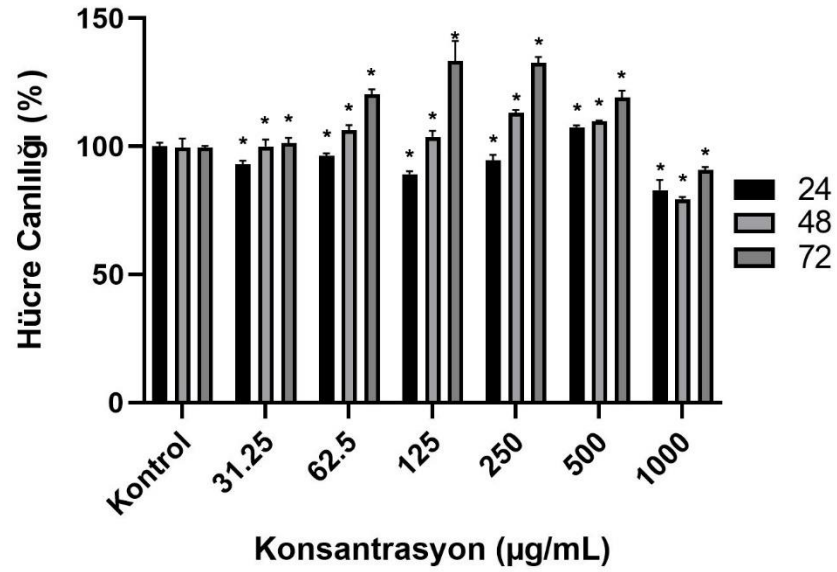
Ishikawa hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.25-32).



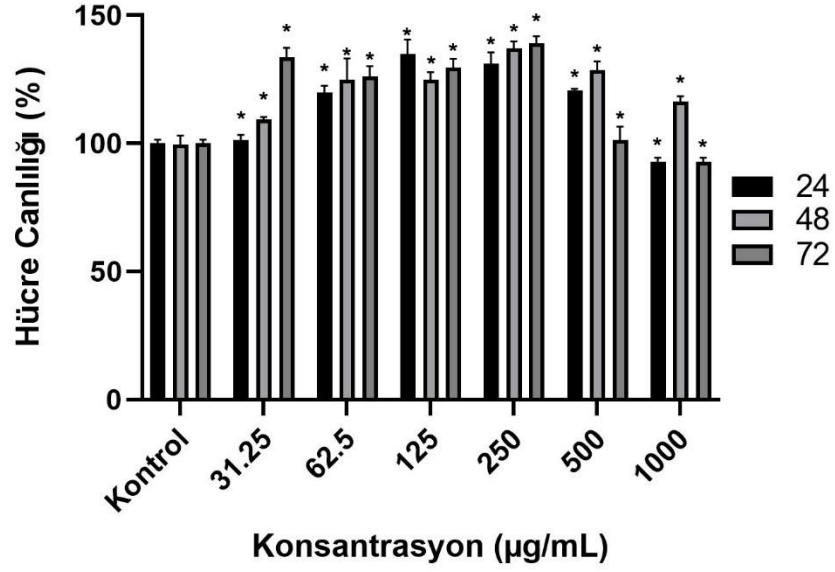
**Şekil 3.25:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



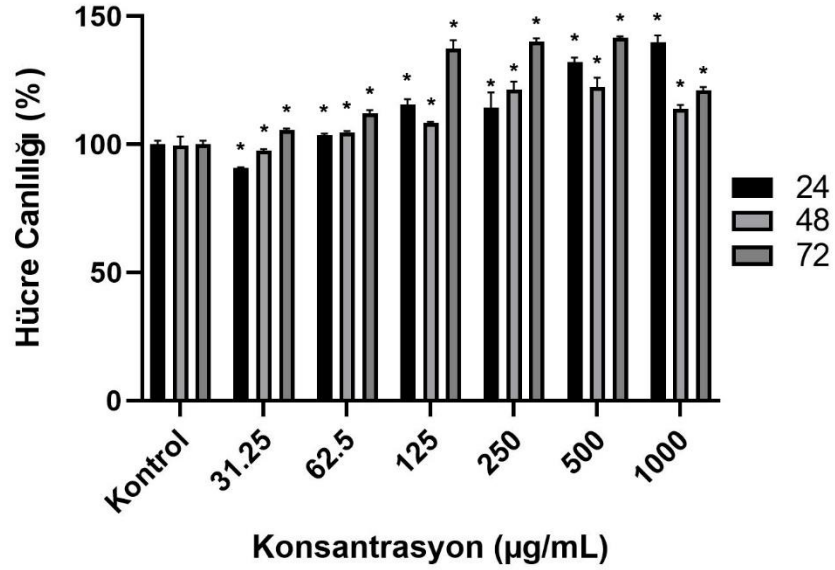
**Şekil 3.26:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



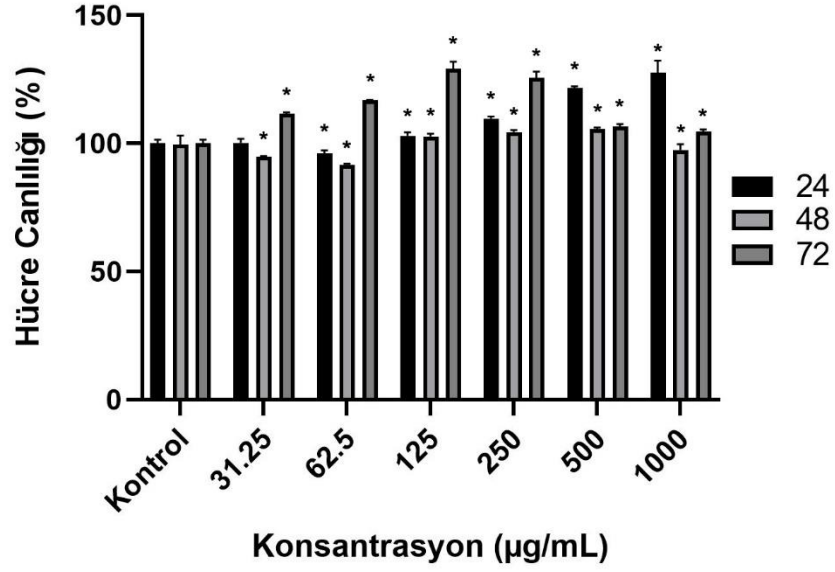
**Şekil 3.27:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



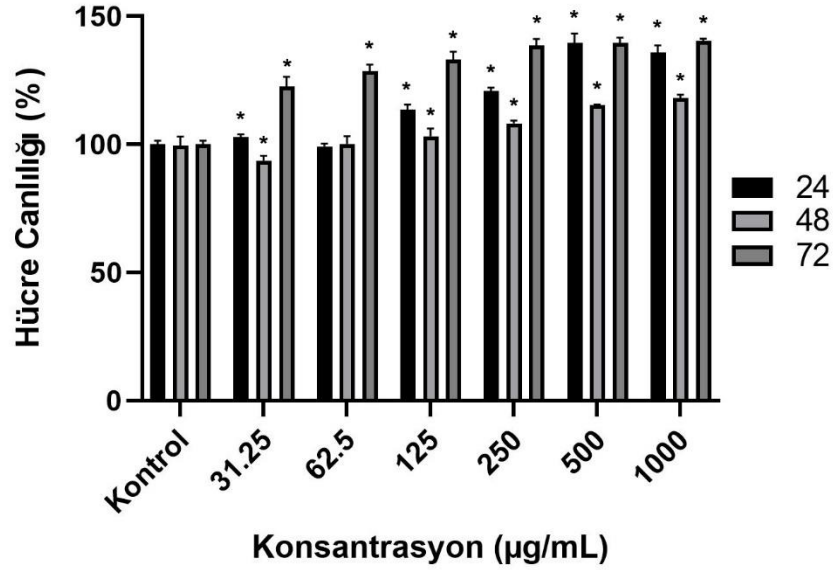
**Şekil 3.28:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



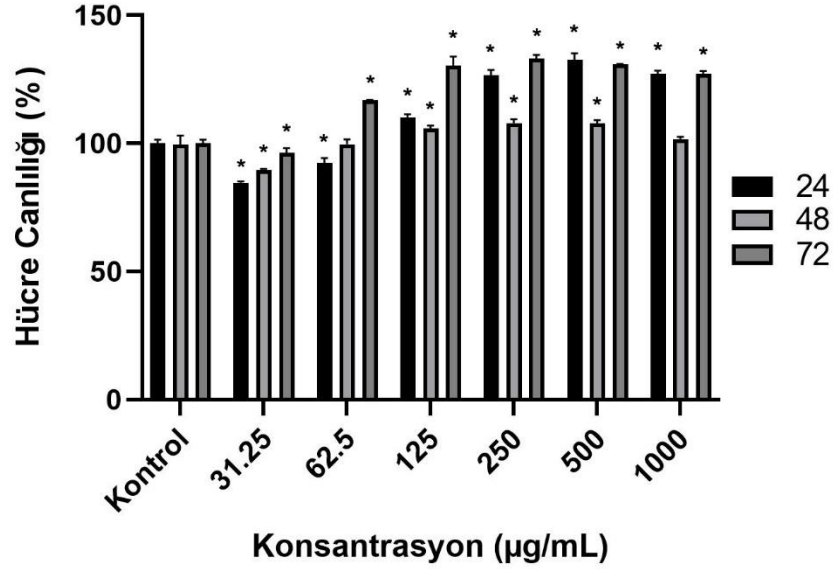
**Şekil 3.29:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



Şekil 3.30: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



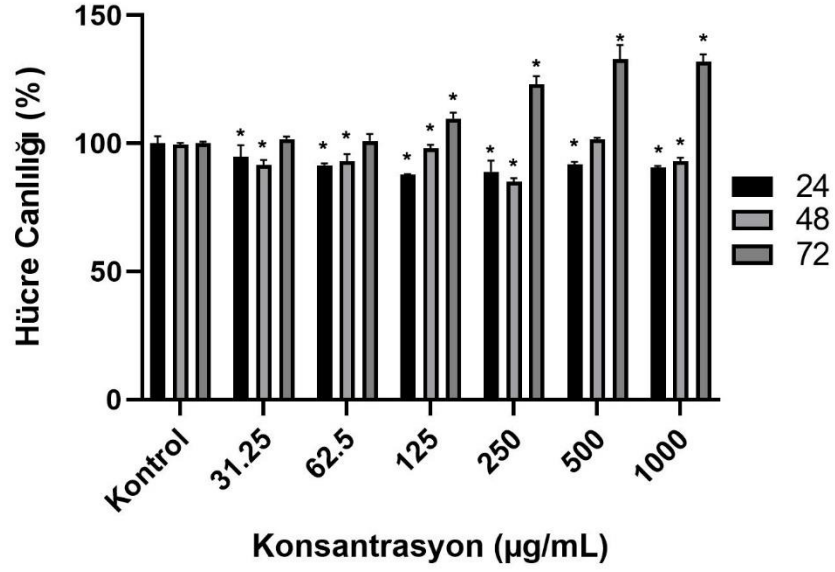
Şekil 3.31: Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoerheus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



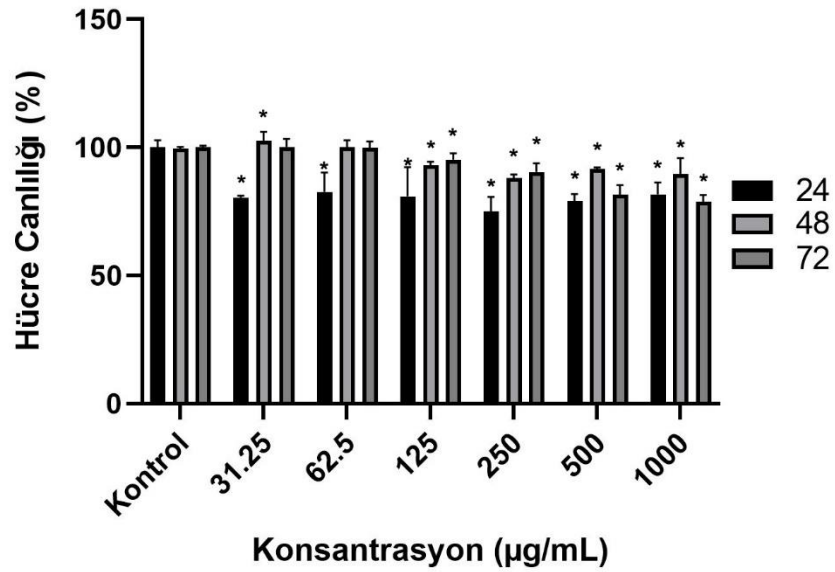
**Şekil 3.32:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu Ishikawa hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.5 Polisakkaritlerin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

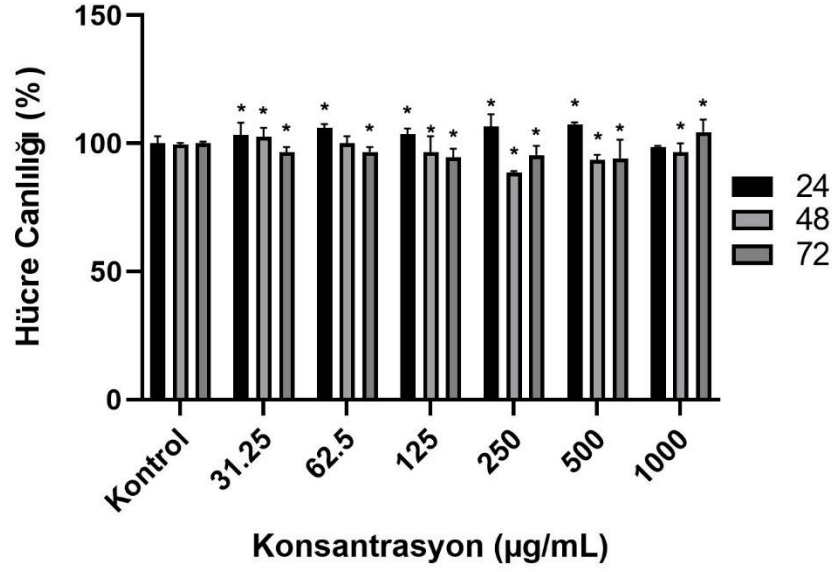
MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.33-40).



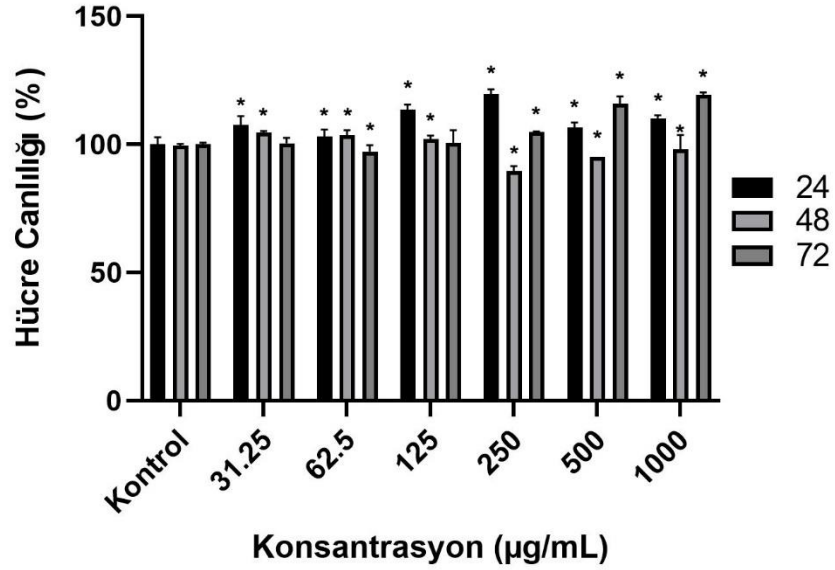
**Şekil 3.33:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



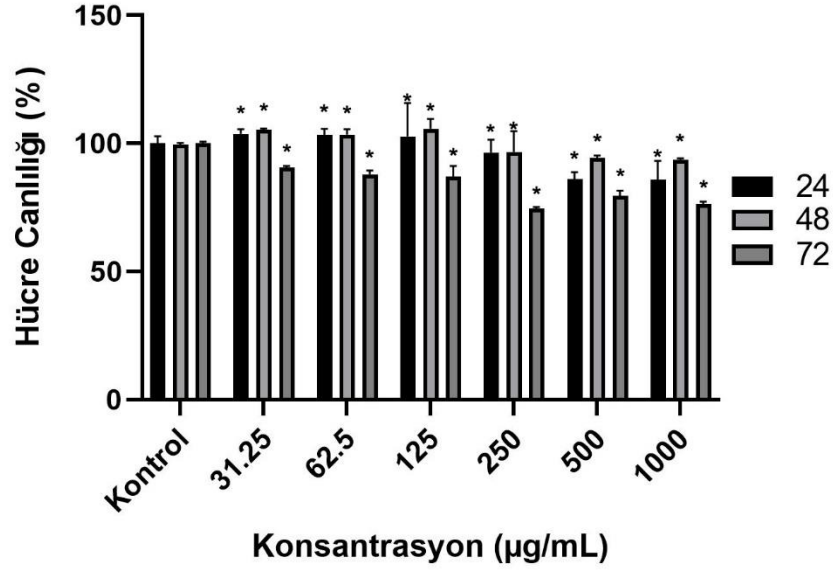
**Şekil 3.34:** Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



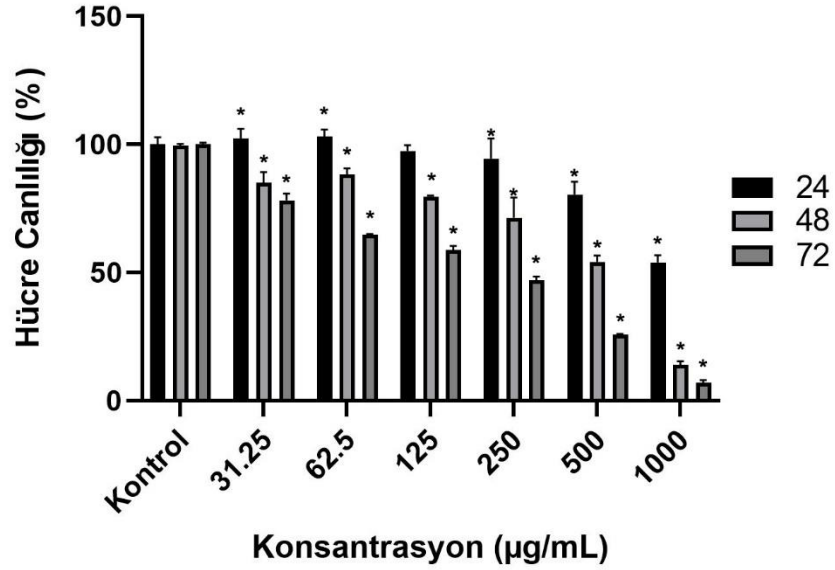
**Şekil 3.35:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.36:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

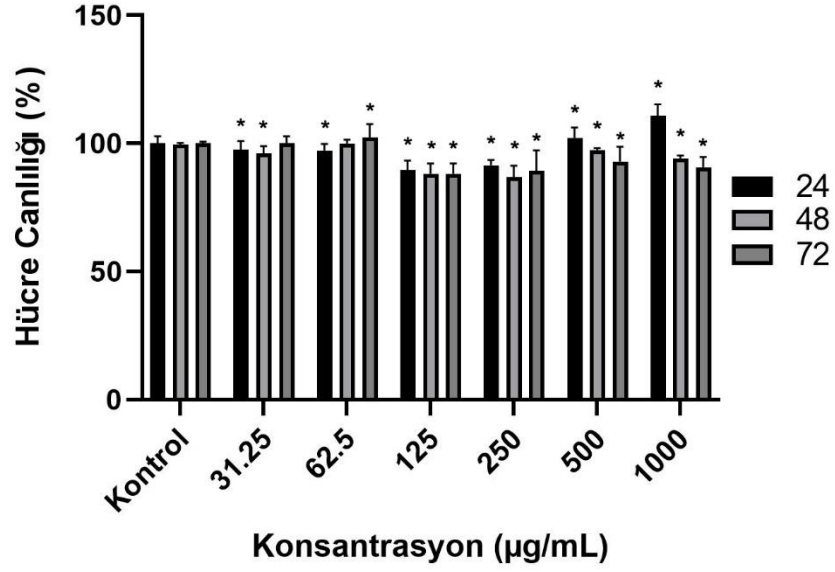


Şekil 3.37: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

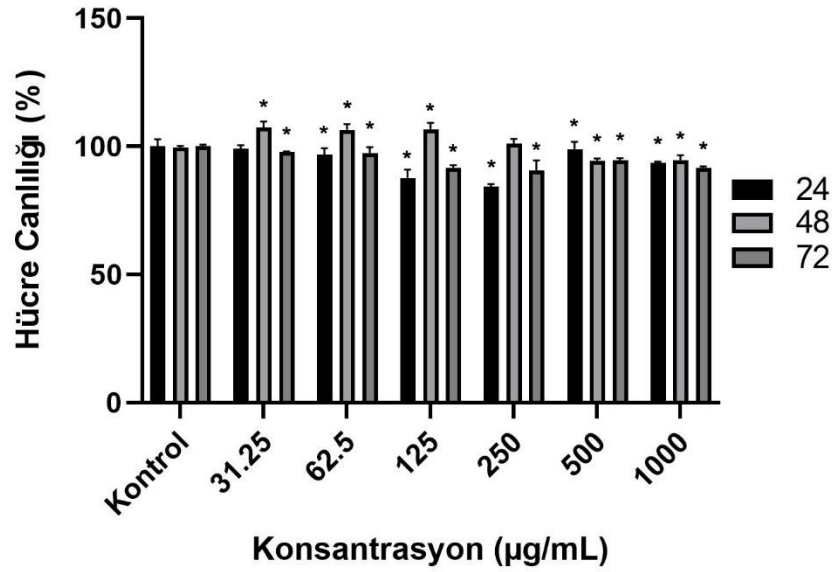


Şekil 3.38: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).





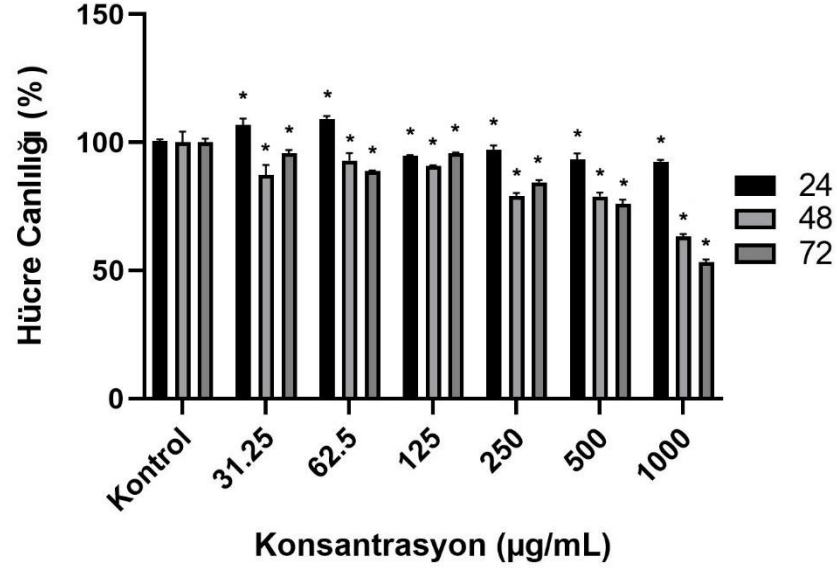
**Şekil 3.39:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



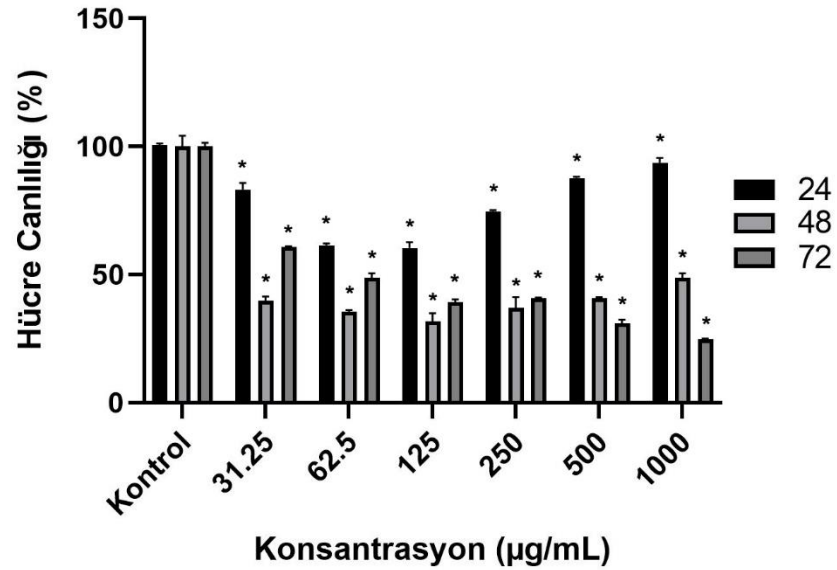
**Şekil 3.40:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MDA-MB-231 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.6 Polisakkaritlerin MIA PaCa-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

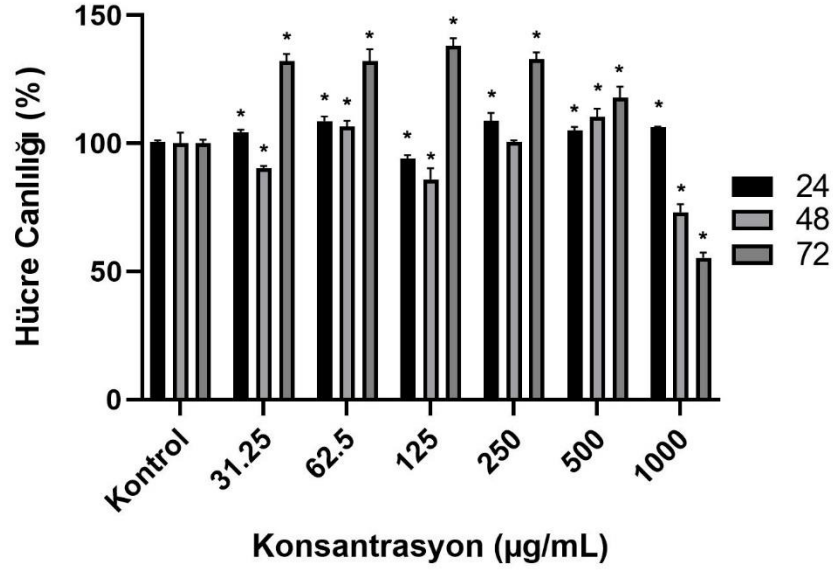
MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.41-48).



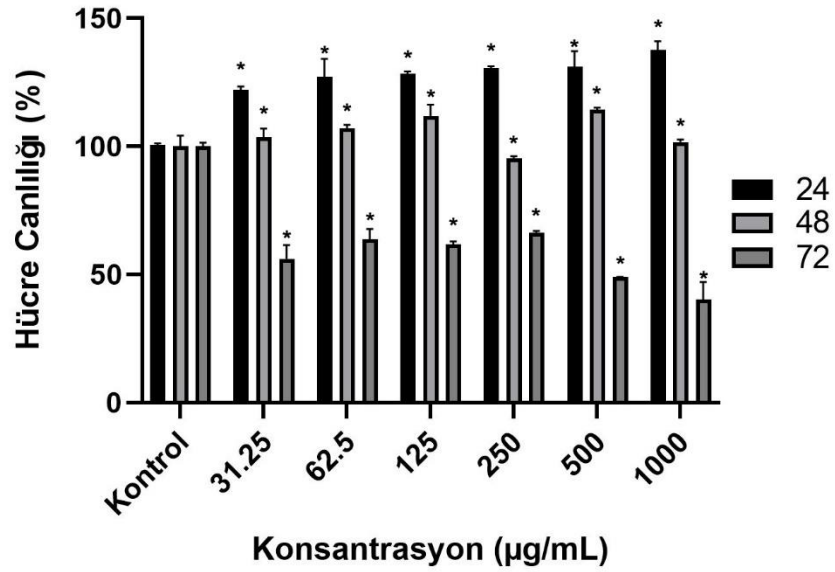
Şekil 3.41: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



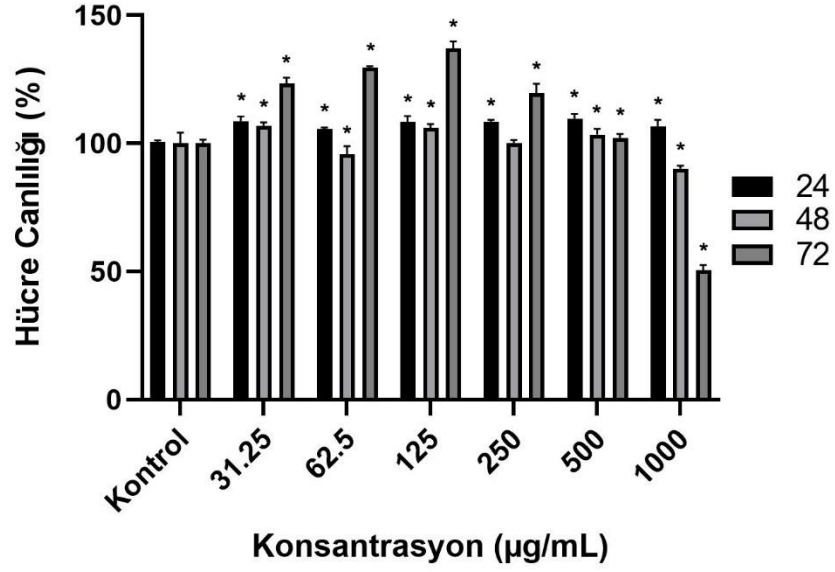
Şekil 3.42: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



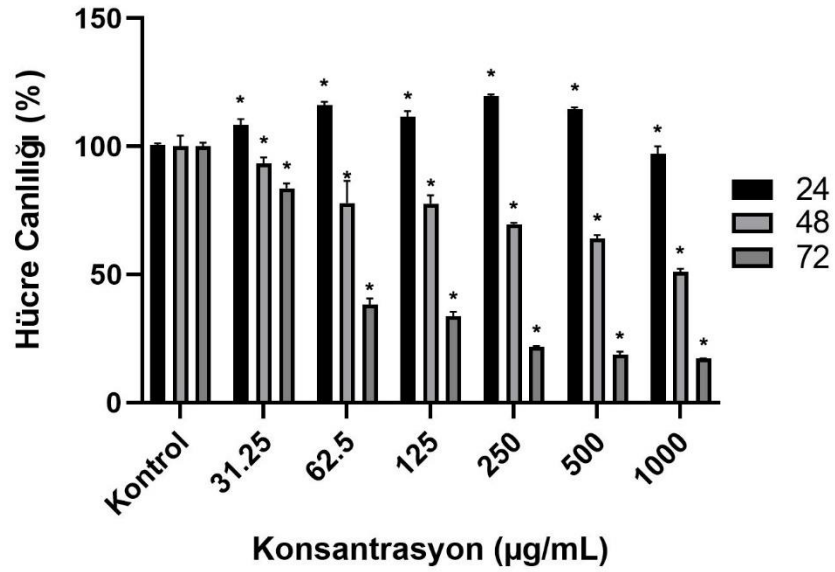
Şekil 3.43: Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



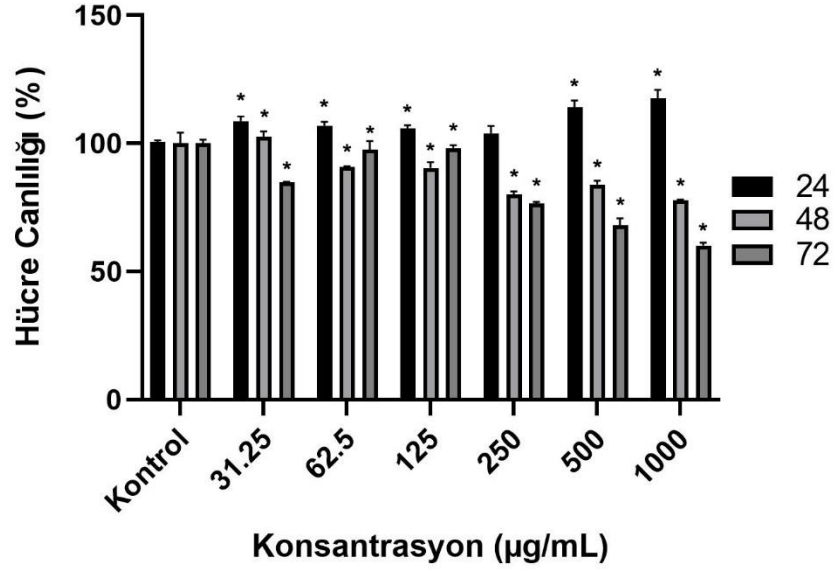
Şekil 3.44: Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



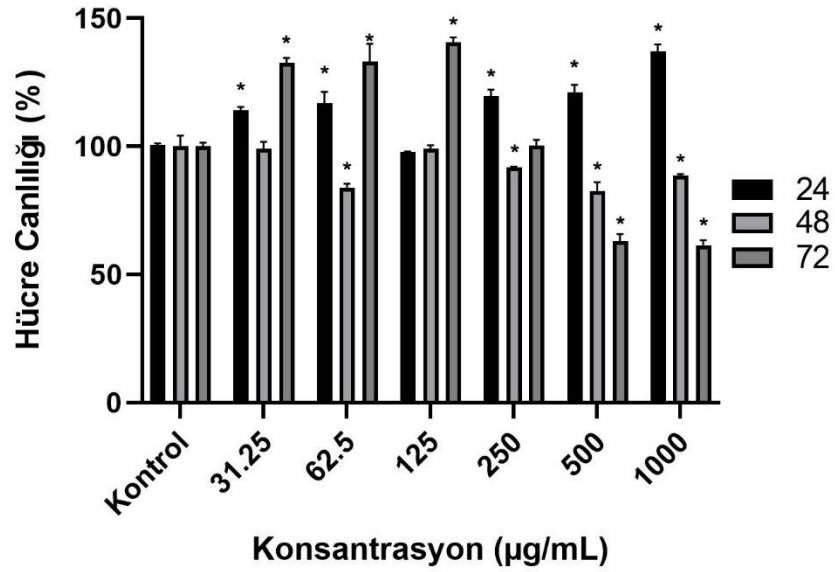
Şekil 3.45: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



Şekil 3.46: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



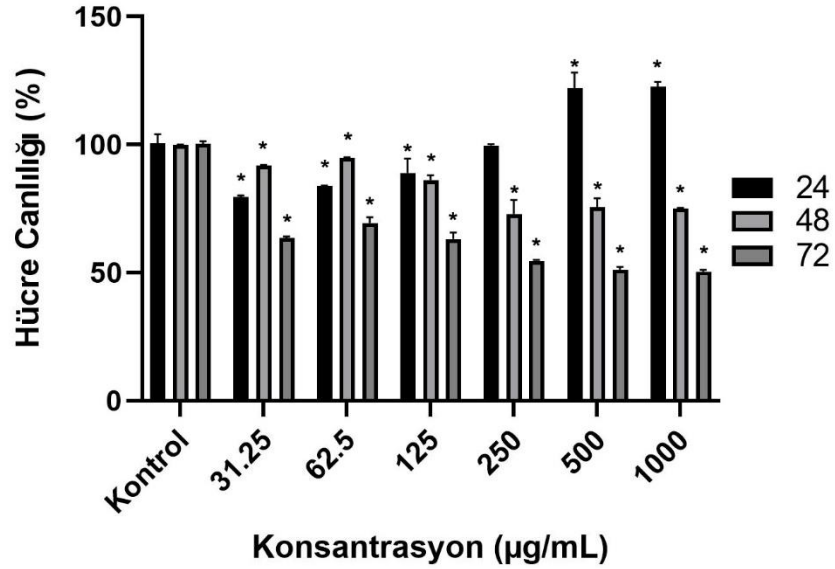
**Şekil 3.47:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoerheus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



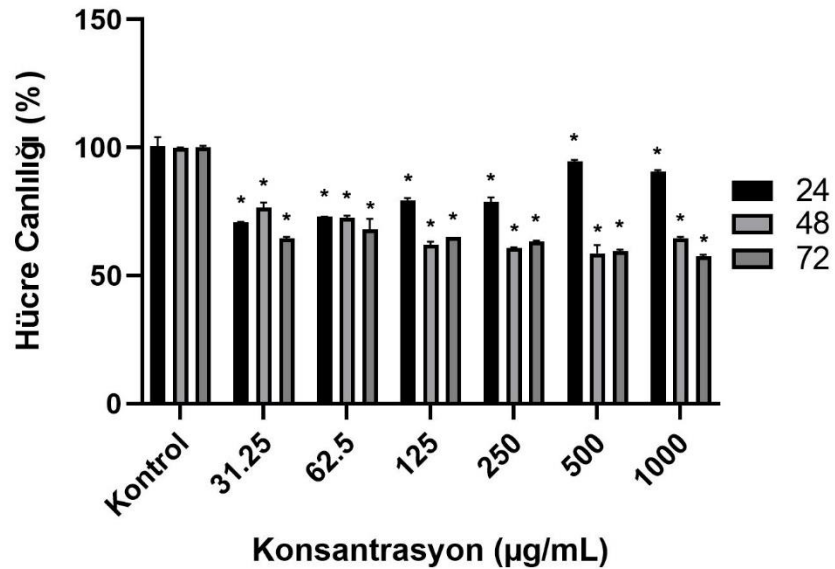
**Şekil 3.48:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoerheus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MIA PaCa-2 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.7 Polisakkaritlerin PANC-1 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

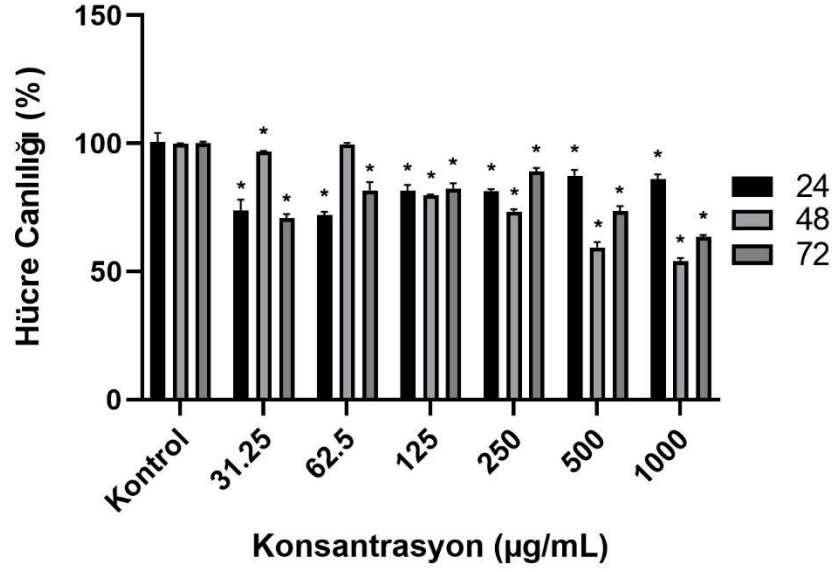
PANC-1 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.49-56).



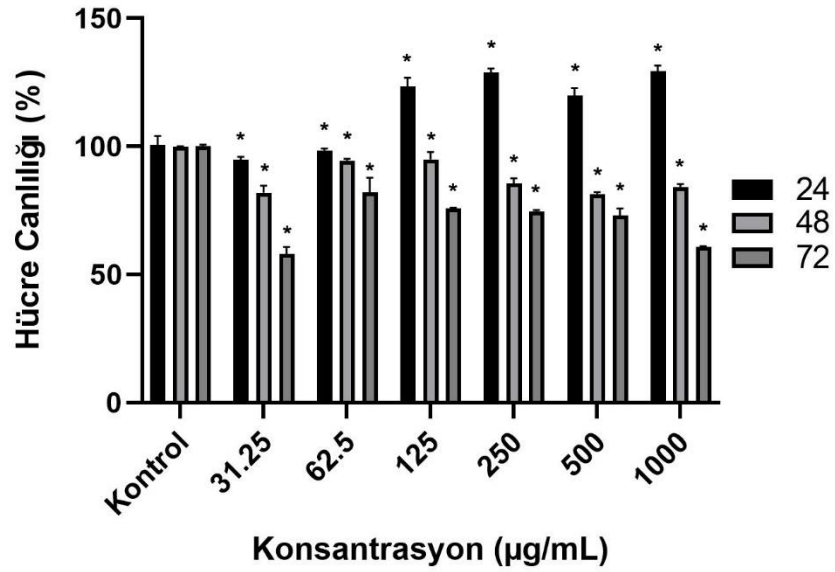
Şekil 3.49: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



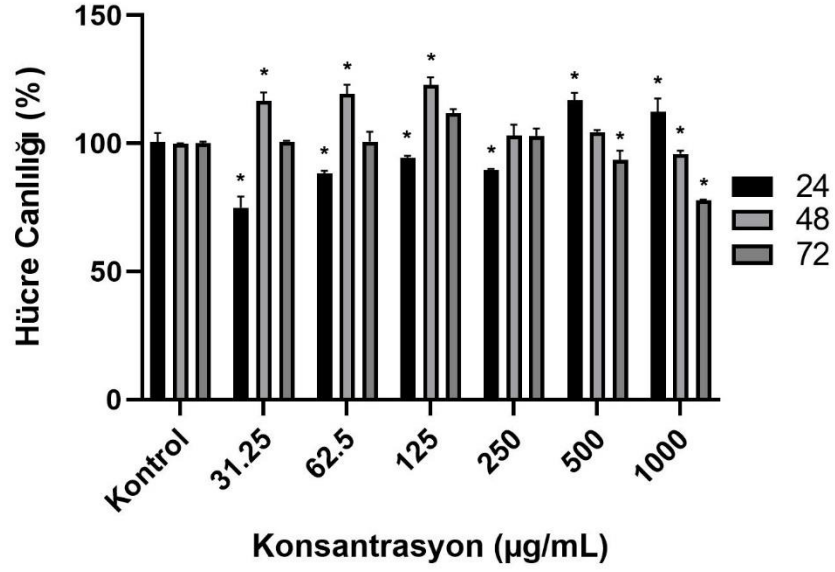
Şekil 3.50: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



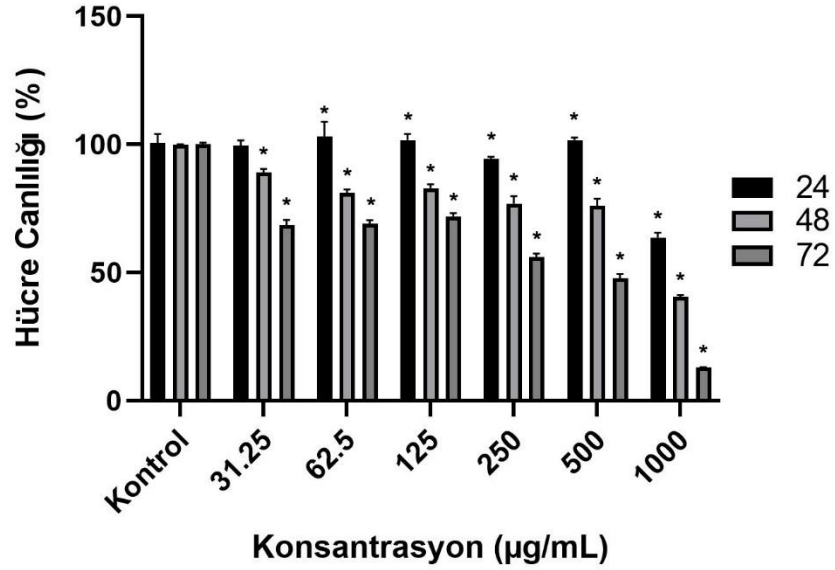
**Şekil 3.51:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.52:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

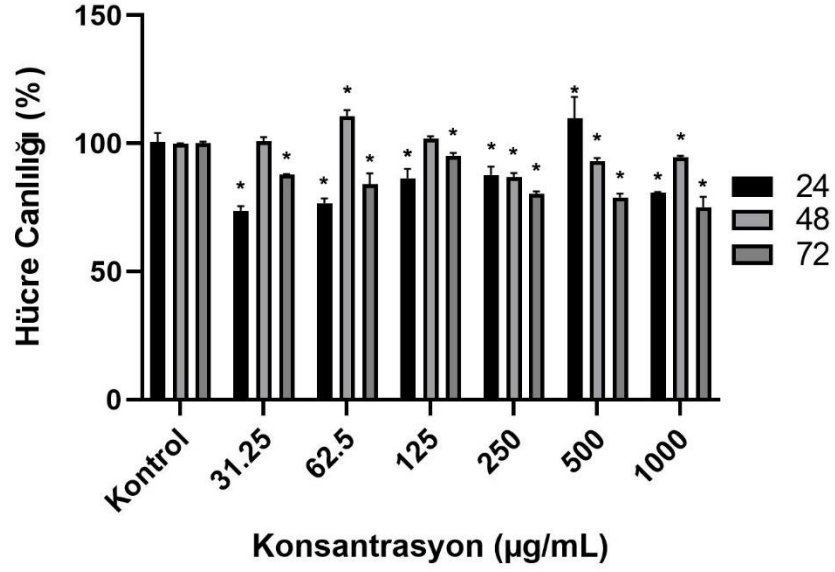


Şekil 3.53: Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

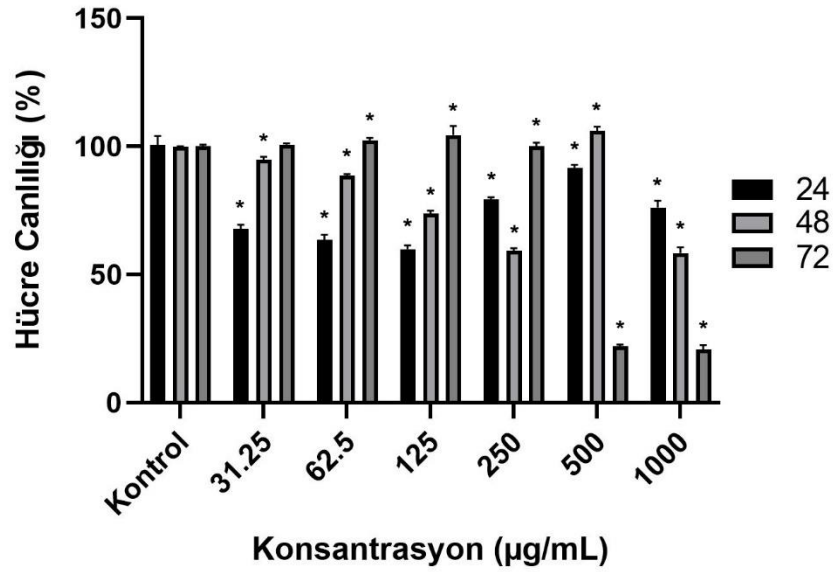


Şekil 3.54: Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).





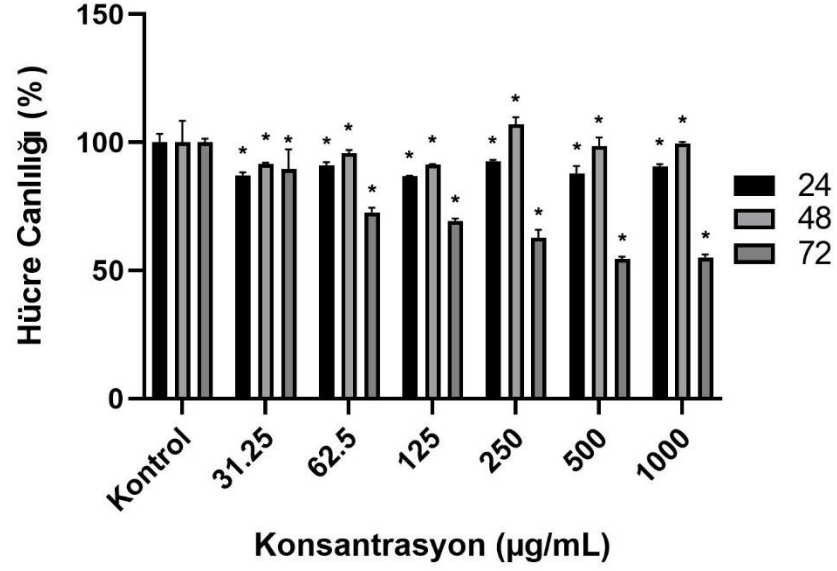
**Şekil 3.55:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).



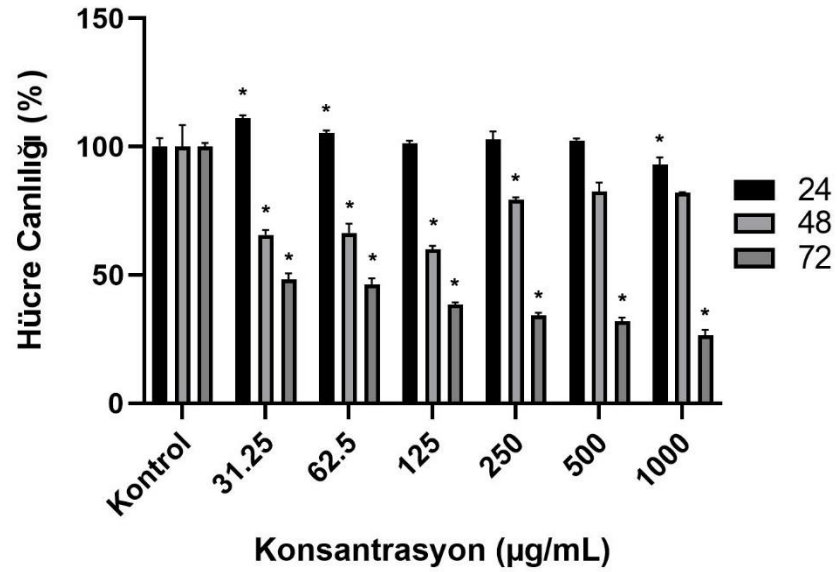
**Şekil 3.56:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu PANC-1 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).

### 3.1.8 Polisakkaritlerin TT Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

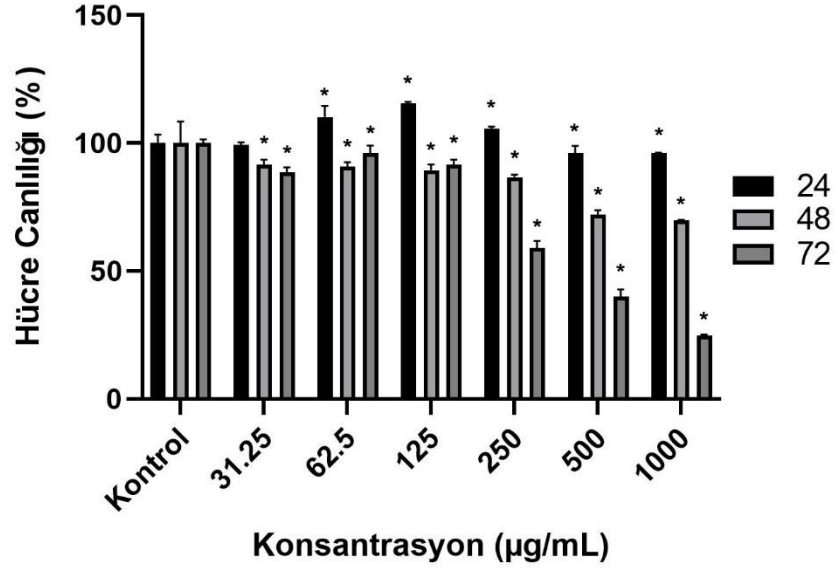
TT hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.57-64).



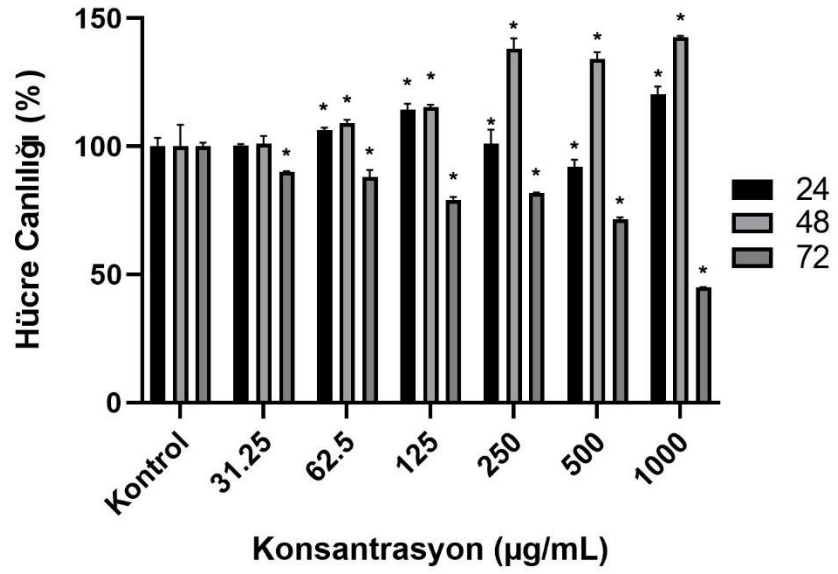
Şekil 3.57: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).



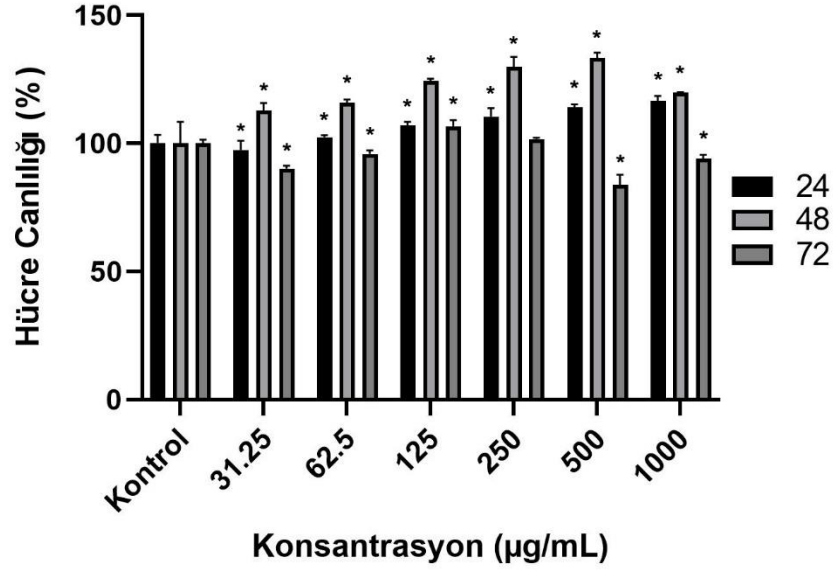
Şekil 3.58: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).



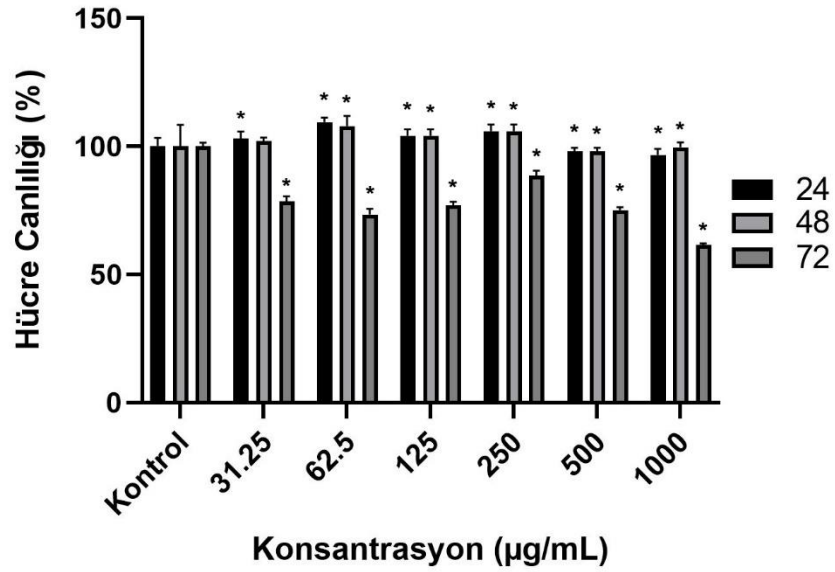
**Şekil 3.59:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



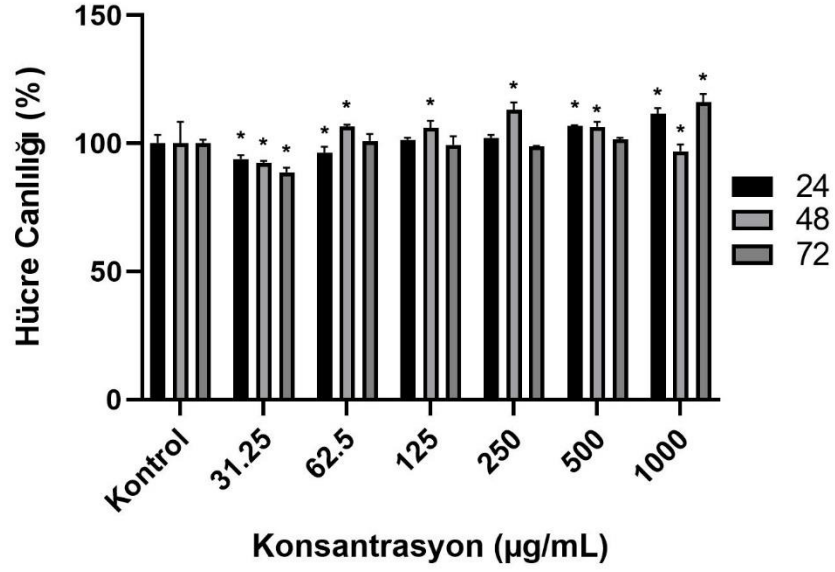
**Şekil 3.60:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



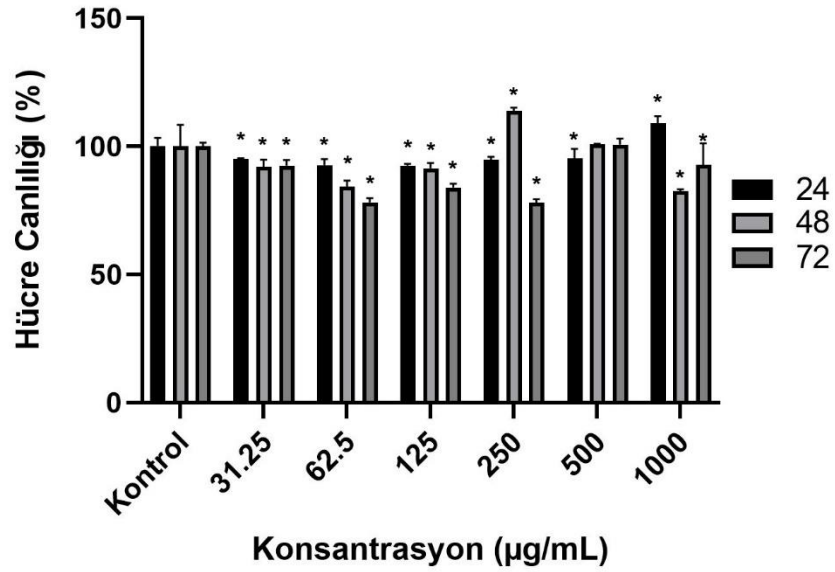
**Şekil 3.61:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.62:** Değişik konsantrasyonlardaki *A. fletii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



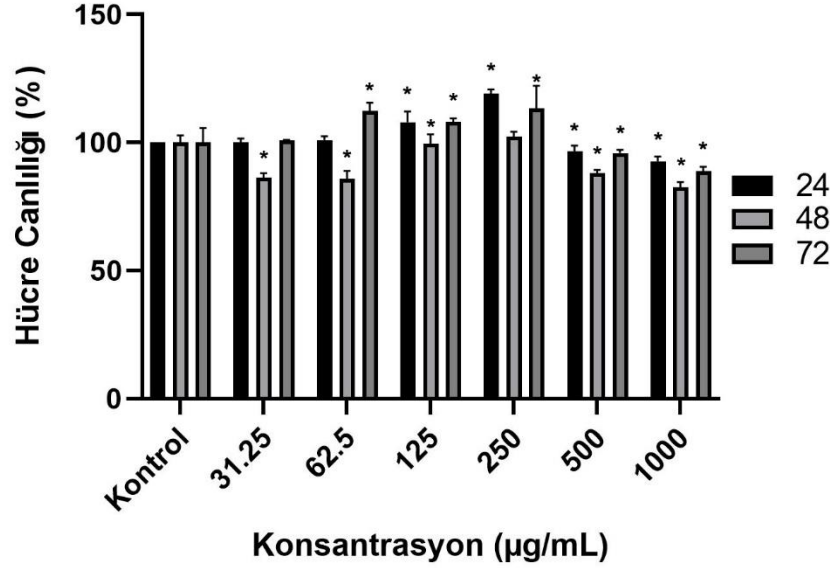
**Şekil 3.63:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoarrheus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



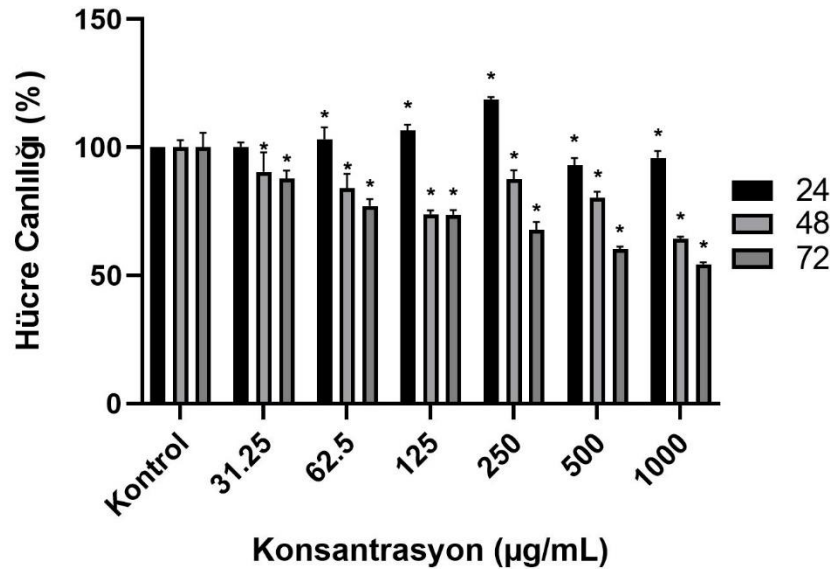
**Şekil 3.64:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysoarrheus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu TT hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.9 Polisakkaritlerin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

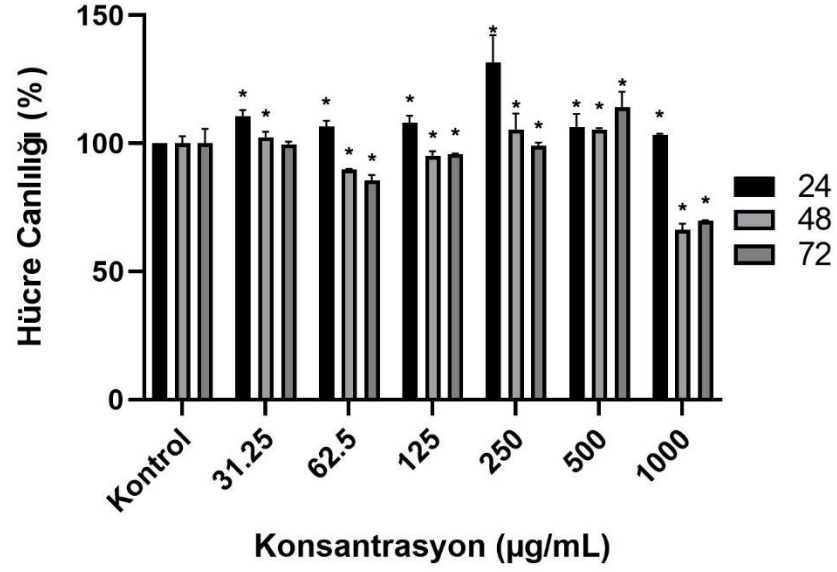
HEK293 hücre hattı üzerinde, farklı konsantrasyonlardaki (31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 µg/mL) polisakkarit örneklerinin uygulanması sonucunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu %100 alınmış ve doz grubu sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler birbirinden bağımsız üç tekrarın ortalama değerleridir (Şekil 3.65-72).



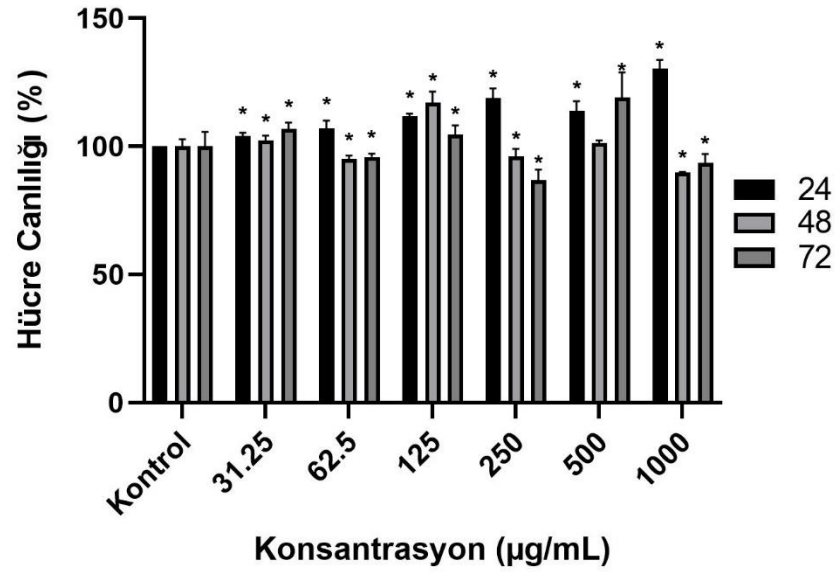
Şekil 3.65: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



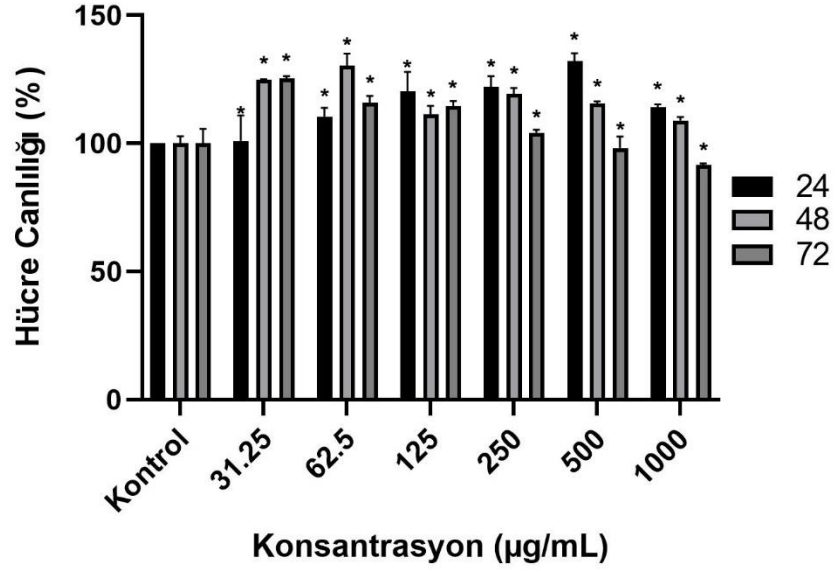
Şekil 3.66: Değişik konsantrasyonlardaki *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



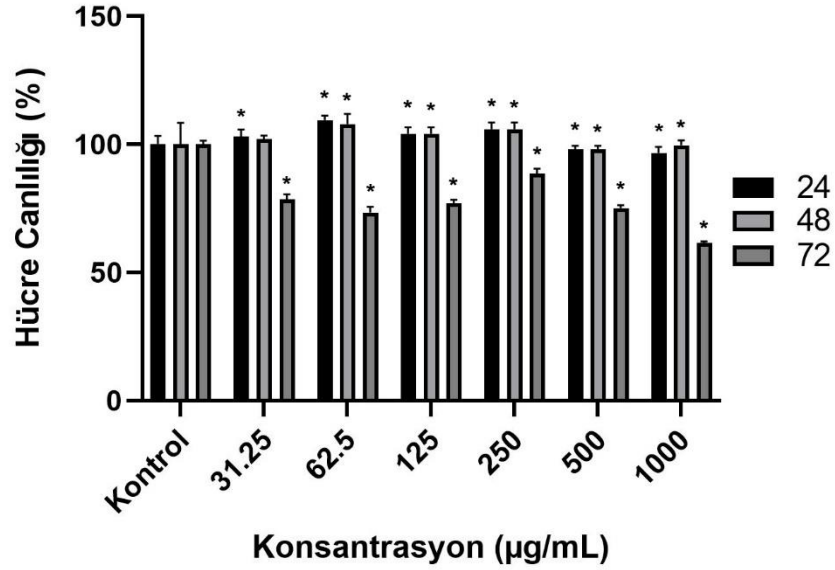
**Şekil 3.67:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.68:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. decastes* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

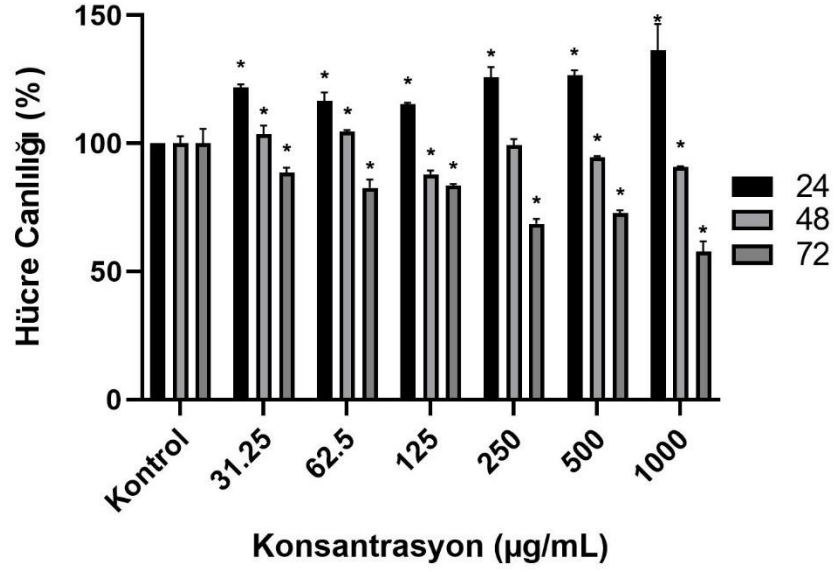


Şekil 3.69: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

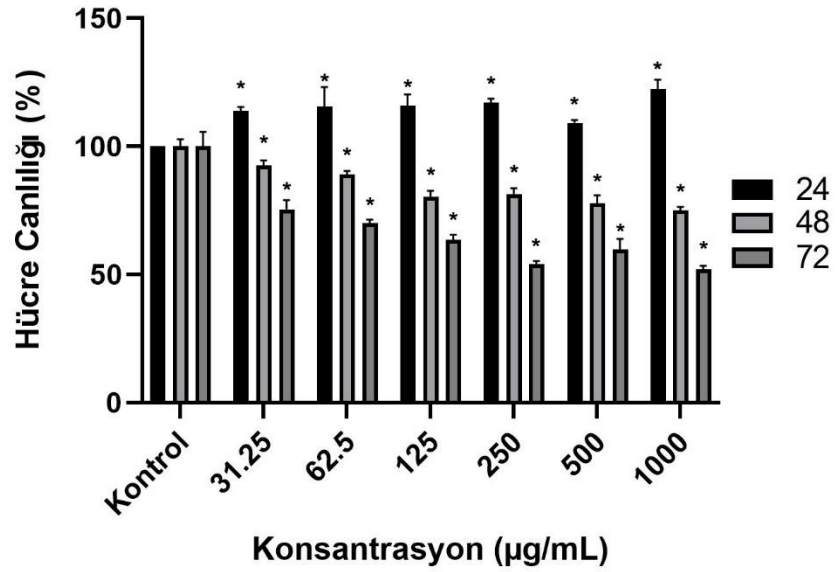


Şekil 3.70: Değişik konsantrasyonlardaki *A. flettii* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).





**Şekil 3.71:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWES polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.72:** Değişik konsantrasyonlardaki *L. chrysorrhoeus* HWEP polisakkarit ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu HEK293 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

Çalışmalar sonucunda elde edilen EC50 değerleri Tablo 3.1’de verilmektedir. Bu sonuçlara göre tüm polisakkaritlerin sonuçları dikkate alınarak çalışmaların devamında diğer deneylerde hesaplanmış EC50 değerleri kullanılmıştır ve ileri deneyler için *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP ile *L. chrysorrheus* HWEP örneklerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Polisakkarit ekstraktlarının 72 saat EC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) değerleri

	MDA-MB-231	PANC-1	MIA PaCa-2	TT	HeLa	HepG2	HT29	Ishikawa	HEK293
<i>Gyromitra esculenta</i> (HWES)	*	698,23	*	*	*	*	*	*	*
<i>Gyromitra esculenta</i> (HWEP)	*	*	59,64	17,21	19,31	*	*	*	*
<i>Lyophyllum decastes</i> (HWES)	*	*	*	337,05	*	*	*	*	*
<i>Lyophyllum decastes</i> (HWEP)	*	*	439,41	*	*	*	*	*	*
<i>Albatrellopsis flettii</i> (HWES)	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Albatrellopsis flettii</i> (HWEP)	153,28	293,14	61,88	*	285,76	166,50	398,62	*	214,60
<i>Lactarius chrysorrheus</i> (HWES)	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Lactarius chrysorrheus</i> (HWEP)	*	444,43	*	*	*	296,42	*	*	*

\*: Toksik etki görülmemiştir.

Çalışmalar neticesinde; farklı hücre hatlarında farklı etki gösteren polisakkarit örnekleri yalnızca insan endometriyal (Ishikawa) hücre hattına karşı sitotoksik etki göstermezken, insan sağlıklı hücre hattı (HEK293) üzerinde 72 saat uygulamanın ardından sadece *A. flettii* HWEP örneği toksik etki göstermiştir. Genel olarak 72 saat inkübasyonun ardından 200  $\mu\text{g/mL}$  ve altındaki polisakkarit konsantrasyonlarında MDA-MB-231, HepG2, MIA-Paca-2, TT ve HeLa hücre hatlarına karşı seçici öldürücü özellik görülmüştür.

Detaylı incelendiğinde, *G. esculenta* HWEP örneği çok daha düşük konsantrasyonlarda etkili olmuş ve daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. *A. flettii* HWEP örneği tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarından sadece TT ve Ishikawa üzerinde etki göstermezken diğer tüm hücre hatlarında farklı dozlarda sitotoksik aktivite göstermiştir. İki örneğinde 62,5 µg/mL'de MIA-PaCa-2 hücre hattına karşı sitotoksikite değerleri çok yakındır. Her iki polisakkarit örneği değerlendirildiğinde *G. esculenta* HWEP örneğinin sağlıklı kontrol hücresi (HEK293) üzerinde toksisitesinin olmadığı, kanser hücreleri üzerinde seçici öldürücü özellik gösterdiği ve düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çok sayıda çalışma, mantarlardan izole edilen aktif bileşiklerin antikanser özelliklerinin çoğunlukla polisakkaritlerle ilişkili olduğu göstermiştir (Mizuno 1996, Mizuno 1999, Wasser 2002). Bununla birlikte, karsinogenez ve tümör lezyonlarının gelişimini inhibe ettiği ve metastazı engelleme yetenekleri rapor edilmiştir (Ikekawa ve diğ. 1969, Chihara ve diğ. 1970)

Çeşitli mantar türlerinden elde edilen farklı ekstraktlar, sitotoksik aktivitelerini incelemek için memeli kanser hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Bunlardan birisi yenilebilir bir mantar türü olan *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer'den izole edilen polisakkarit ekstraktının, fare sarkoma (S-180) hücrelerinin proliferasyonunu ölçüde inhibe ettiği çalışmadır (Tao ve diğ. 2006). Bir başka mantar türü *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.'dan elde edilen polisakkarit fraksiyonunun da insan monositik (U937) hücrelerinin çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (Chen ve diğ. 1997). *L. edodes*'ten elde edilen su ekstraktının, serviks kanseri (HeLa) (Lovy ve diğ. 2000) ve *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer polisakkarit ekstraktının, insan mide kanseri (BGC-823) hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Yang ve diğ. 2012).

Mantar polisakkaritleri kullanılarak kanser hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonu, farklı yollarla gerçekleşebilmekte ve değişik mekanizmaları içermektedir. Örneğin, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. mantarından elde edilen su ekstraktının, insan akciğer kanseri (A549) hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wu ve diğ. 2012). Benzer şekilde, *B. edulis*'ten elde edilen su ekstraktının, insan kolon kanseri (LS180) hücrelerinin hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu raporlanmıştır (Lemieszek ve diğ. 2013).

Bu çalışmada kullanılan bazı mantar türlerinin daha önce kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *G. esculenta* metanol ekstraktının (0,8 mg/mL'de) HeLa hücre hattı üzerinde hücre canlılığını %60'a kadar düşürdüğü raporlanmıştır (Barad 2017).

*A. flettii* etanol ekstraktı ile yapılan bir çalışmada da İnsan kolon kanseri hücre hattı SW480 ve HT29 üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gösterilmiştir. Ayrıca etanol ekstraktından izole edilen grifolin, neogrifolin ve confluentin bileşikleri uygulanarak gerçek zamanlı PZR çalışmasıyla Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu (KRAS) ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Yaqoob ve diğ. 2020).

*L. chrysorrheus* ile yapılan bir çalışmada ise, bu türün methanol ekstraktının L1210 ve 3LL hücre hatlarında sitotoksik etki (>100 µg/mL) gösterdiği bildirilmiştir (Thomasi ve diğ. 2004). Ancak literatürde *L. chrysorrheus*'tan ekstrakte edilen polisakkaritlerin memeli hücreleri üzerinde toksisitesine ilişkin hiçbir bilimsel veri bulunmamaktadır.

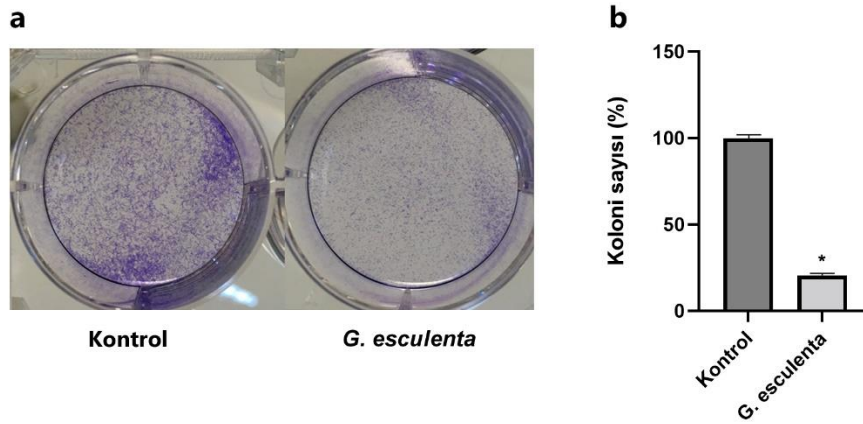
Çalışmada kullanılan bir diğer tür olan *L. decastes*'in sıcak su ekstraktının fare sarkomu (S180) hücre hattı üzerinde çalışmaları olup (Yuuichi ve diğ. 2000), polisakkarit ekstraktının kolon kanseri (CT26.WT) ve fare sarkomu hücre hattı (S180) üzerinde antikanser etkileri olduğu gösterilmiştir (Ding ve diğ. 2022).

Mantarlar, polisakkaritler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktif bileşikler içermekte ve son yıllarda, mantar polisakkaritlerinin izolasyonu, yapısal karakterizasyonu ve antitümör aktivitelerini açıklayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Literatürde belirtilen bulgularla kendi çalışmamızda elde ettiğimiz sitotoksite sonuçları mantar polisakkaritlerinin antikanser potansiyelini ortaya koymakta ve literatürü desteklemektedir.

### 3.2 Koloni Formasyon Metoduyla Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

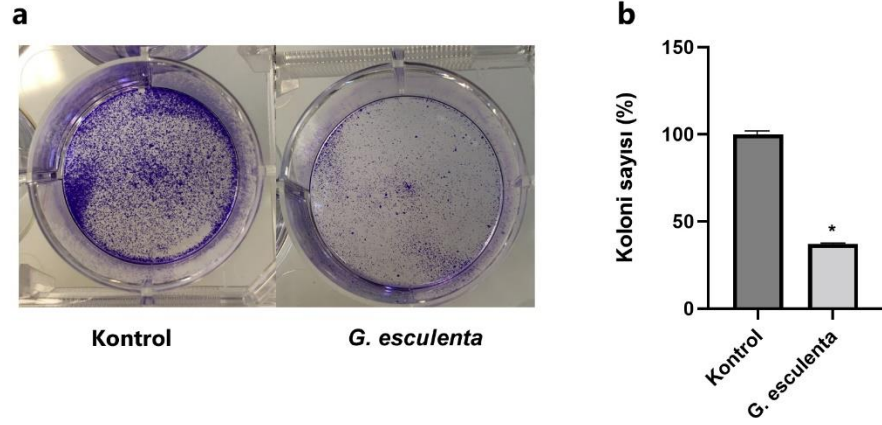
Memeli hücre hatları üzerinde en iyi aktiviteyi gösteren polisakkaritlerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla *Gyromitra esculenta* HWEP, *A. flettii* HWEP ve *L. chrysorrhoeus* HWEP örneklerinin etkili dozları 72 saat boyunca uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir. Uygulama sonrası besiyeri uzaklaştırılmış ve ortam PBS ile yıkanmıştır. Ardından taze besiyeri ilave edilerek 10 gün boyunca 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek 37°C’de, nemli ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve metot kısmında verildiği şekilde hücreler fotoğraflanarak ImageJ uygulaması ile analiz edilmiştir.

*G. esculenta* HWEP örneğinin HeLa hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 80,98 azalmıştır (Şekil 3.73).



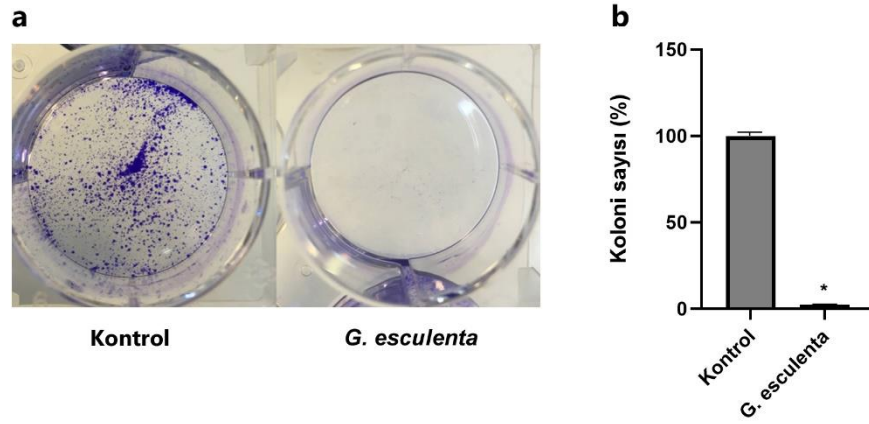
**Şekil 3.73:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin TT hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 61,97 azalmıştır (Şekil 3.74).



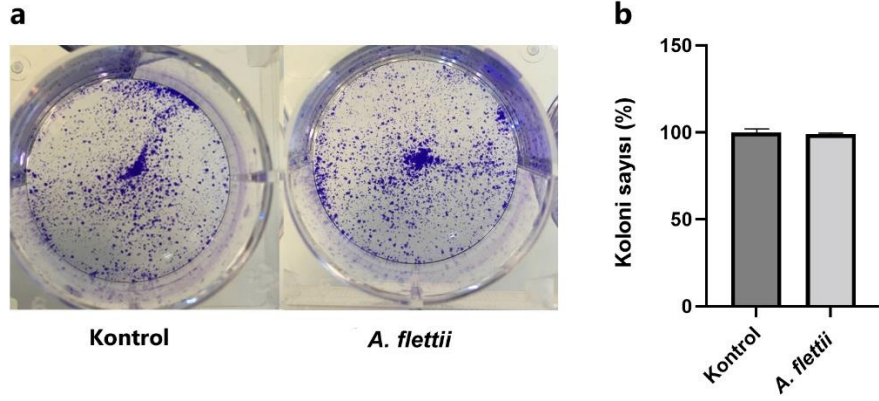
**Şekil 3.74:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 89,62 azaltmıştır (Şekil 3.75).



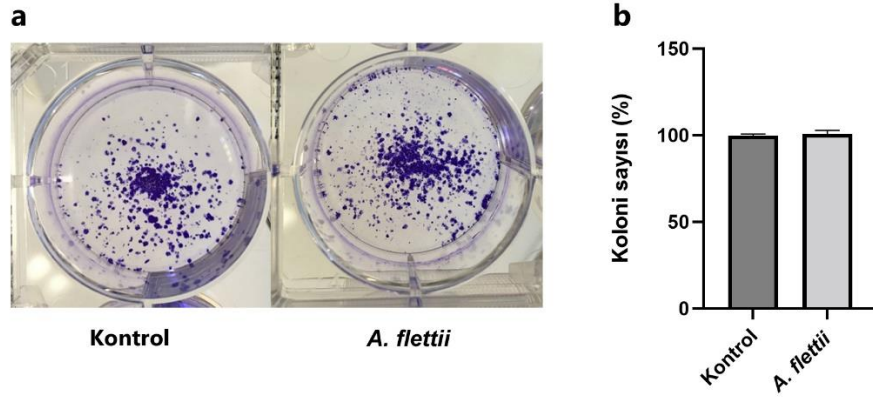
**Şekil 3.75:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubu ile kontrol grubu arasında koloni oluşturma kapasitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 3.76).



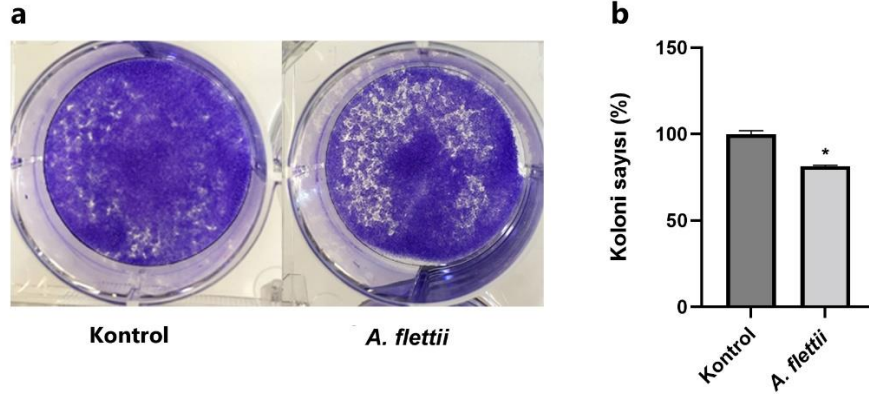
**Şekil 3.76:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı **a)** koloni formasyon kapasitesine etkisi ve **b)** yüzde sütun grafiği.

*A. flettii* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubu ile kontrol grubu arasında koloni oluşturma kapasitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 3.77).



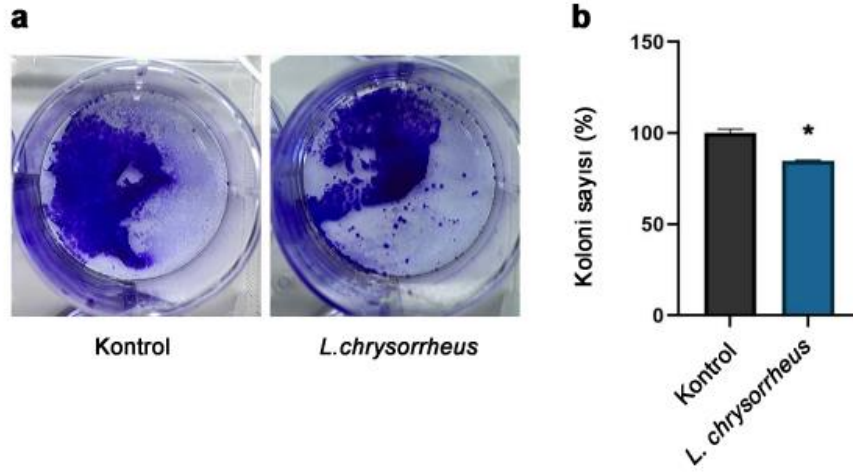
**Şekil 3.77:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı **a)** koloni formasyon kapasitesine etkisi ve **b)** yüzde sütun grafiği.

*A. flettii* HWEP örneğinin MDA-MB-231 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 15,96 azaltmıştır (Şekil 3.78).



**Şekil 3.78:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

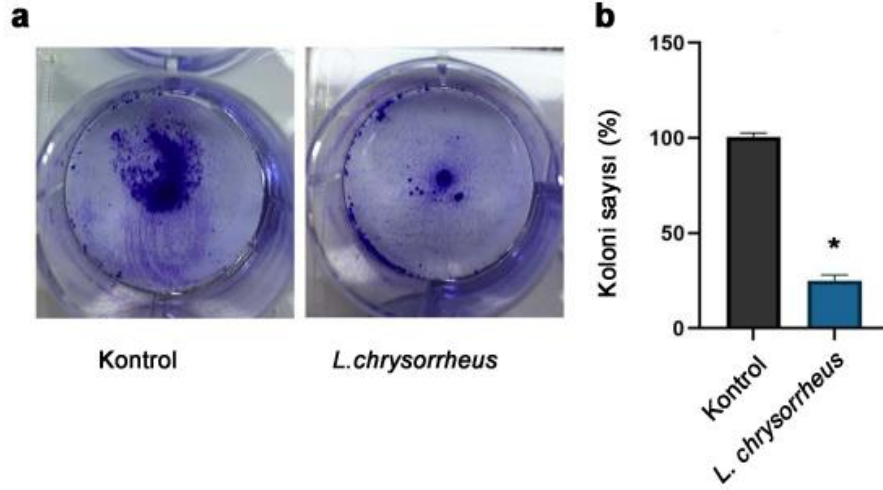
*L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 11 azaltmıştır (Şekil 3.79).



**Şekil 3.79:** *L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin PANC-1 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda koloni oluşturma kapasitesi kontrol grubuna göre yüzde 73 azaltmıştır (Şekil 3.80).





**Şekil 3.80:** *L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı a) koloni formasyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Koloni formasyon deneyi, tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğine dayanmaktadır ve bu deney esas olarak popülasyondaki her bir hücreyi sınırsız bölünme kabiliyeti açısından test etmek için uygulanmaktadır. Sitotoksik ajanların hücre çoğalması üzerindeki etkinliğini belirlemek için tercih edilen koloni formasyon yönteminde ekilen hücrelerin sadece bir kısmı koloni üretme kapasitesini korur (Franken ve diğ. 2006). Koloni oluşumu, tümör oluşturma yetenekleri olan kanser hücrelerinin bir özelliği olduğundan, koloni oluşturma kapasitesi deneyleri kanser araştırmaları alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Takezawa ve diğ. 2012, Lau ve diğ. 2017). İlaç direnci, kısa süreli sitotoksikite deneyleri kullanılarak belirlenemeyeceğinden hedefe yönelik kemoterapötik ajanların terapötik direnci analiz edilirken koloni oluşturma kapasitesi deneyleri özellikle önemlidir (Franken ve diğ. 2006, Quail ve diğ. 2016, Mansoori ve diğ. 2017).

Çalışmalar sonunda, *A. flettii* HWEP polisakkariti uygulanan MIA-PaCa-2 ve HepG2 hücrelerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Sadece MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubuna kıyasla koloni oluşumu %15,96 azalmıştır. Bir diğer polisakkarit örneği olan *G. esculenta* HWEP ise HeLa ve TT hücre hattında koloni oluşumunu sırasıyla %80,98 ve %61,97 azaltırken MIA-PaCa-2 hücrelerinde koloni oluşumunu %89,62 azaltarak önemli derecede etki göstermiştir. *L. chrysoarrheus*'ta ise PANC-1 ve HepG2 hücrelerinde koloni oluşumu sırasıyla %11 ve %73 azalmıştır.

*P. ostreatus* miselinden ekstrakte edilen polisakkaritin mide kanserine karşı antitümör aktivitesinin *in vitro* ve *in vivo* araştırıldığı bir çalışmada, insan gastrik kanser (BGC-823) hücre hattı üzerinde 72 saat polisakkarit uygulamasının kontrol grubuna göre koloni oluşumunu önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (Cao ve diğ. 2015). *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute'den ekstrakte edilen polisakkaritin HepG2 hücreleri üzerinde antikanser potansiyelinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda (100, 200 ve 400 µg/mL) uygulanan polisakkarit ekstraktının doza bağımlı şekilde hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini inhibe ettiği raporlanmıştır (Li ve diğ. 2022). *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow türünden elde edilen polisakkaritin *in vitro* antimelanom etkilerinin araştırıldığı çalışmada, koloni oluşturma kapasitesinin değerlendirildiği tahlilde izole edilen fukomanna galaktonun fare mürin melanom (B16-F10) hücrelerinde 72 saat uygulamasının koloni sayısının her iki grupta da aynı kaldığı, ancak doz grubunda ortalama koloni boyutunu azalttığı tespit edilmiştir (Oliveira ve diğ. 2019).

Literatürde belirtilen bulgularla kendi çalışmamızda yer alan mantar polisakkaritlerinin farklı kanser hücreleri üzerinde araştırılan koloni formasyon sonuçları benzer etkileri ortaya koymuştur ve mantar polisakkaritlerinin koloni oluşumunu inhibe etme potansiyelini desteklemektedir.

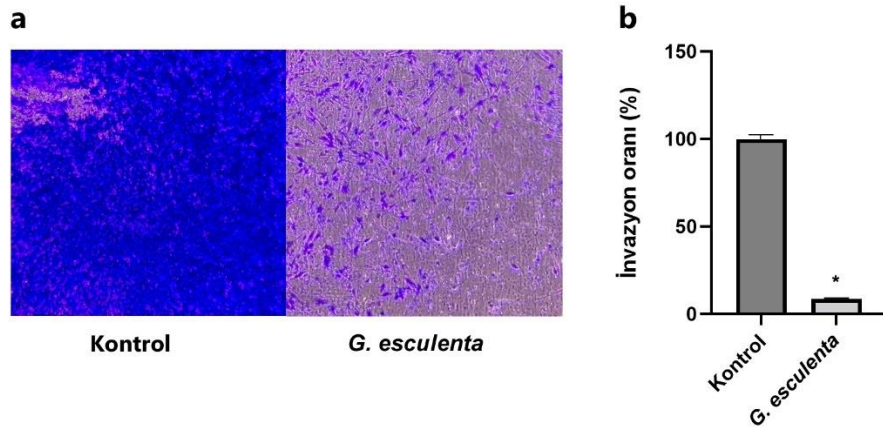
### **3.3 Matrijel-İnvazyon Yöntemiyle İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi**

İnvazyon, hücre dışı bir matrise (ECM) hücrelerin göçünü ifade eder ve tipik olarak kanser hücrelerinin metastazı ile ilişkili bir süreçtir (Friedl ve Bröcker 2000). Hücrelerin göçü başlatmak ve ilerletmek için kullanabileceği çeşitli mekanizmalar vardır ve her biri anti-metastatik tedavilerin geliştirilmesi için farmakolojik hedefler sunmaktadır (Friedl ve Wolf 2003). Tümör hücreleri, kendilerini çevreleyen doku yoluyla metastaz yapmak için, ECM ile ilişkili mekanizmaları kullanmaktadır. Bu nedenle, hücre göçü testleri, *in-vitro* kanser metastazı araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu da ilaçların keşif sürecinde daha etkili tanımlanmasına ve istenmeyen etkilerin daha erken tanınmasına olanak tanımaktadır (Zengel ve diğ. 2010). Matrijel-İnvazyon yöntemi bir bazal membran preperasyonu olan Matrijel ile hücrelerin matrise

bağlanma, istila etme ve bir kemoatraktan (%20 FBS) doğru göç etme yeteneğini ölçmektedir.

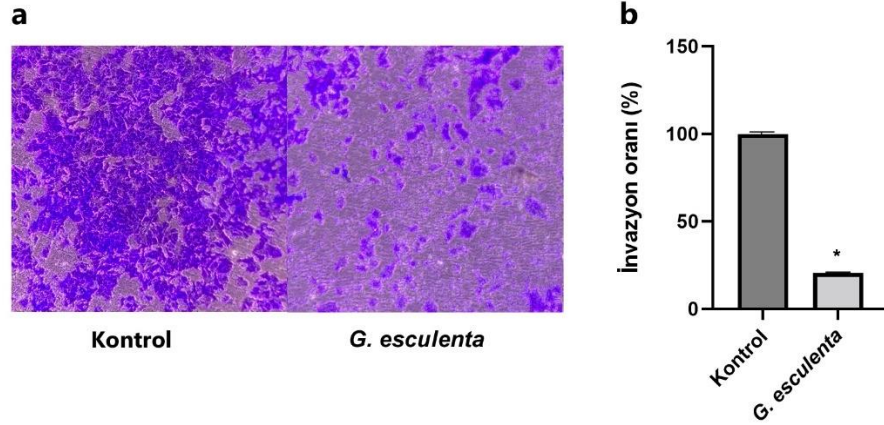
Memeli hücre hatları üzerinde en iyi aktiviteyi gösteren polisakkaritlerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP örneklerinin etkili dozlarını içeren FBS içermeyen besiyeri invazyon kaplarının yükleme kısmına hücre süspansiyonu ile ekilmiştir. İnvazyon kaplarının yerleştirildiği plakalarda ise %20 FBS içeren besiyeri ortamı eklenmiştir. Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir. 24 saat inkübasyona bırakılan invazyon kapları metot kısmında verildiği şekilde lamlara yerleştirilerek mikroskop altında fotoğraflanmış ve ImageJ uygulaması ile analiz edilmiştir.

*G. esculenta* HWEP örneğinin HeLa hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %89 azaltmıştır (Şekil 3.81).



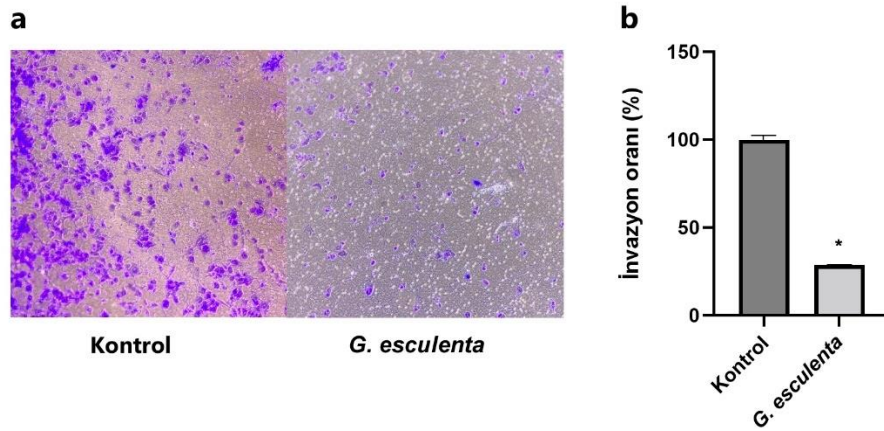
**Şekil 3.81:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin TT hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %78 azaltmıştır (Şekil 3.82).



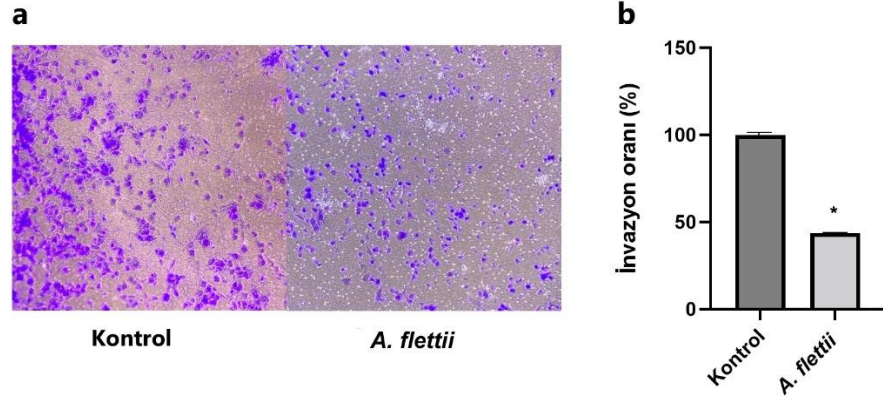
**Şekil 3.82:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %71,18 azaltmıştır (Şekil 3.83).



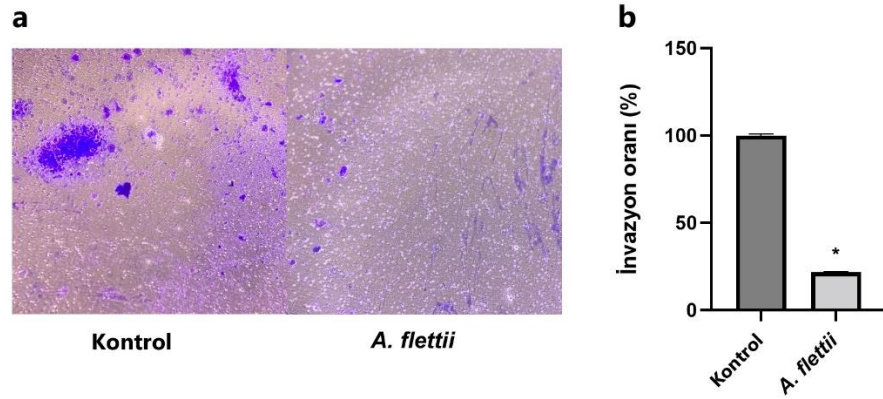
**Şekil 3.83:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %65,4 azaltmıştır (Şekil 3.84).



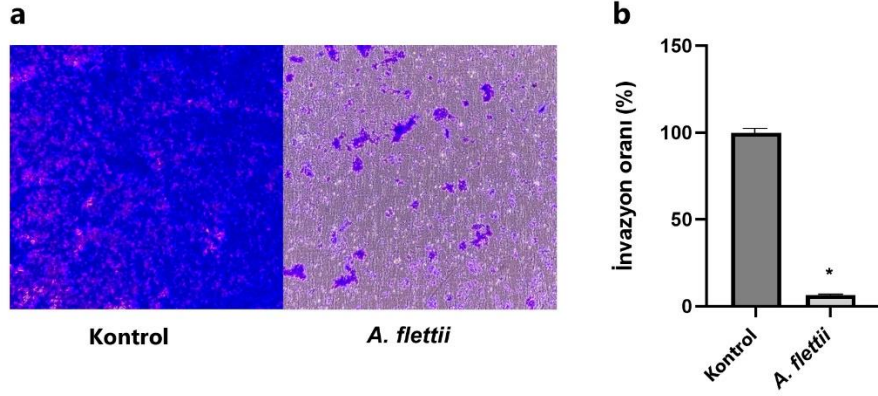
**Şekil 3.84:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %83,2 azaltmıştır (Şekil 3.85).



**Şekil 3.85:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MDA-MB-231 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda invazyon kapasitesi kontrol grubuna göre %90,4 azaltmıştır (Şekil 3.86).



**Şekil 3.86:** *A. flettii* HWPB örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı a) invazyon kapasitesine etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Bazal membran boyunca hücre göçü, kanser metastazında önemli bir adımdır. Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları organın bazal membranından geçip vücudun farklı organlarına yayılarak ikincil tümörler oluşturduklarında meydana gelir (Martin ve diğ. 2013, Justus ve diğ. 2014). Bu sebeple, sitotoksik etki gösteren bileşiklerin hücreler üzerinde invazyon kapasitesini belirlemek için invazyon deneyleri yapılmaktadır.

Yapılan analizler sonucunda, *A. flettii* HWPB polisakkariti uygulanan MIA-PaCa-2, HepG2 ve MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon kapasitesini kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla yüzde 65,4; 83,2 ve 90,4 azaltmıştır. Bir diğer polisakkarit örneği *G. esculenta* HWPB ise HeLa, TT ve MIA-PaCa-2 hücre hattında invazyon kapasitesini sırasıyla yüzde 89, 78 ve 71,18 azaltmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, özellikle MDA-MB-231 ve HeLa hücre hatlarının kontrol grupları yüksek invaziv ve migrasyon kabiliyeti sergilerken, sırasıyla bu hücre hatlarına uygulanan *A. flettii* ve *G. esculenta* polisakkaritlerinin hücre göçünü önemli derecede azalttığı görülmüştür.

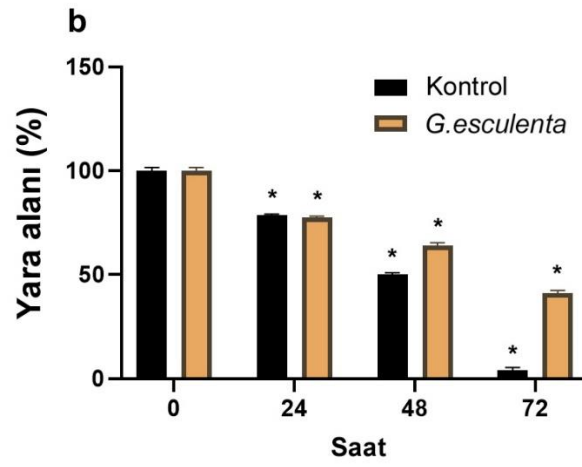
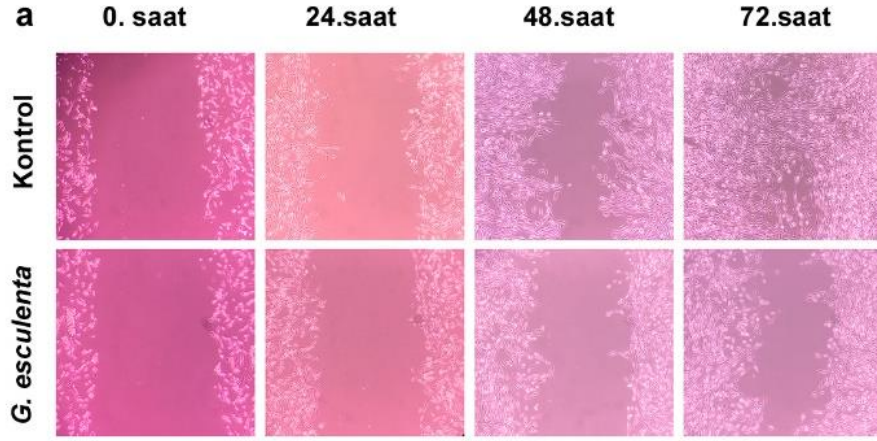
*Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilat'tan izole edilen polisakkaritin, konsantrasyona bağlı olarak fare mürin melanom (B16-F10) hücrelerinin invazyonunu engellediği raporlanmıştır (Lee ve diğ. 2016). Başka bir çalışmada, *P. ostreatus*'tan elde edilen polisakkarit örneğinin insan karaciğer kanseri (HepG2 ve HCCLM3) hücre hatlarının migrasyon yeteneğini doz bağımlı şekilde inhibe ettiği ve invaziv özelliği azalttığı gösterilmiştir (Khinsar ve diğ. 2021). *P. linteus* türünden izole edilen protein bağlı bir polisakkaritin antikanser etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, İnsan kolon

kanseri (SW480) hücrelerinin invazyon yeteneğini inhibe ettiği gösterilmiş ve ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerini doğrudan bozan ve invazyona aracılık eden matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9)'un gen ekspresyonunu azalttığı raporlanmıştır (Song ve diğ. 2011). Tüm bu sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

### 3.4 Yara İyileştirme Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

Yara iyileştirme (Wound healing) yöntemi ile toksik aktivite gösteren polisakkaritlerin migrasyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla hücreler yoğun olarak ekilmiş ve 24 saat sonra 200 µL'lik tip yardımıyla doğrusal olarak çizilmiştir. Ardından plakalar PBS ile yıkanmış, *G. esculenta* HWEP, *A. flettii* HWEP ve *L. chrysorrhoeus* HWEP örneklerinin 72 saat etkili dozları uygulanmış besiyeri ile muamele edilmiştir. Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir. 72 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve kontrol grubunda yara alanı kapanana kadar plakalardaki besiyeri 2-3 günde bir yenilenmiştir. Hücrelerin göç etmesi ile kontrol grubu yara alanı kapandıktan sonra metot kısmında verildiği şekilde hücreler fotoğraflanarak ImageJ uygulaması ile analiz edilmiştir.

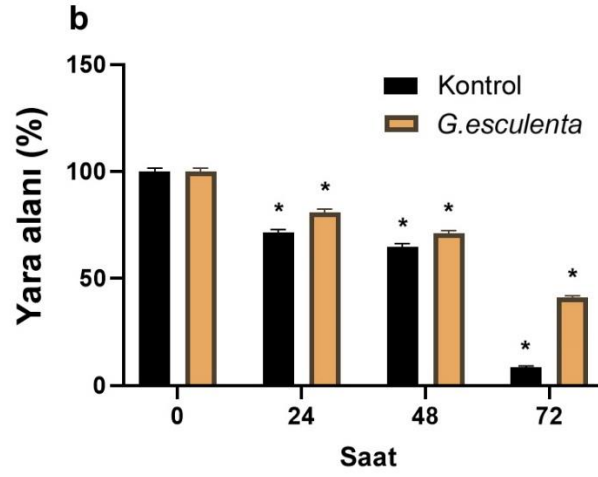
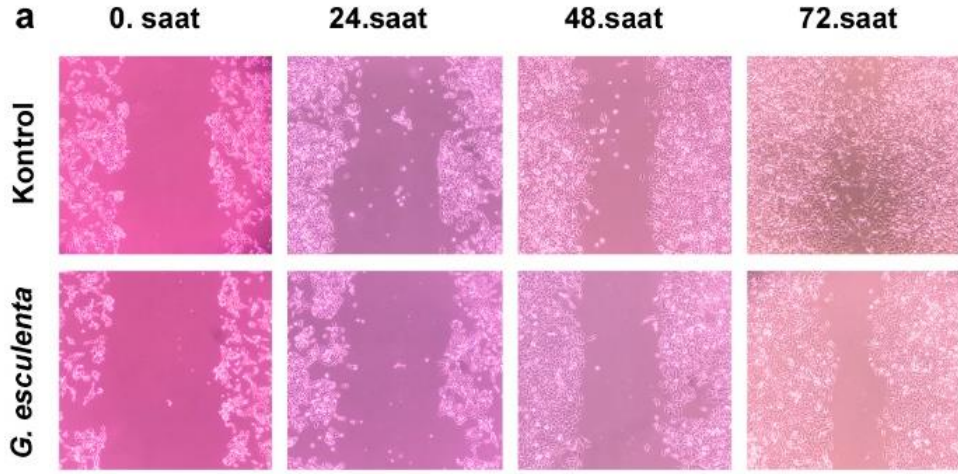
*G. esculenta* HWEP örneğinin HeLa hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla %81 gecikmiştir (Şekil 3.87).



**Şekil 3.87:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

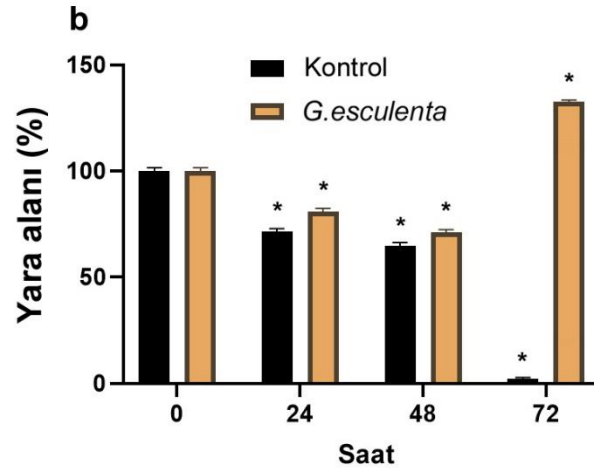
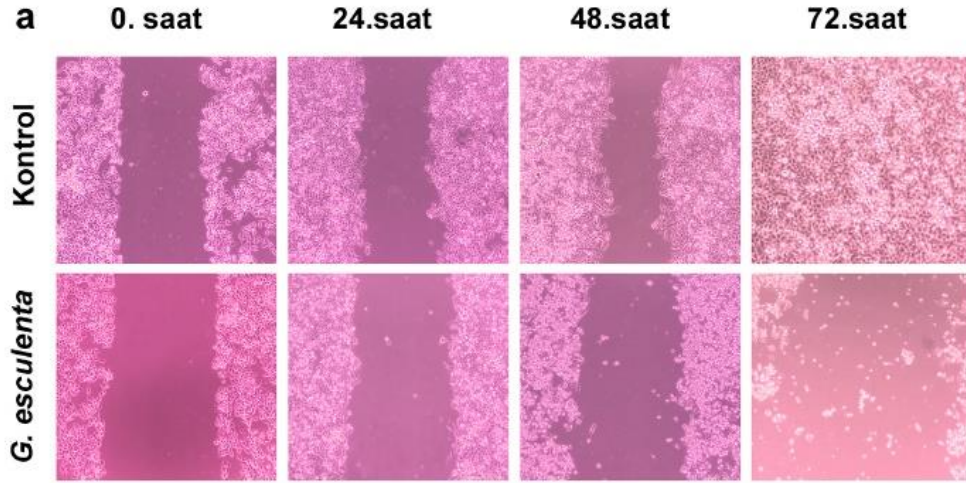
*G. esculenta* HWEP örneğinin TT hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla %77,67 gecikmiştir (Şekil 3.88).





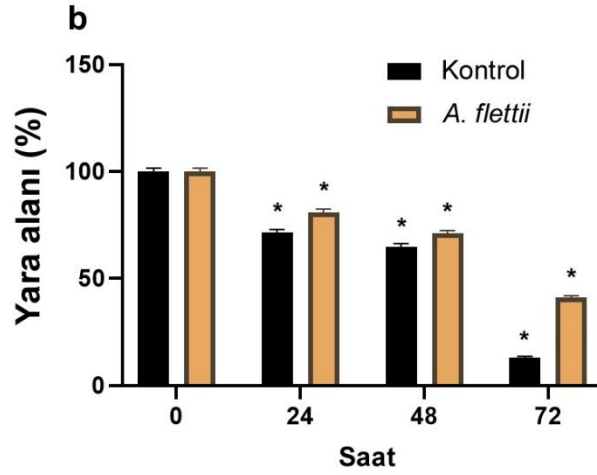
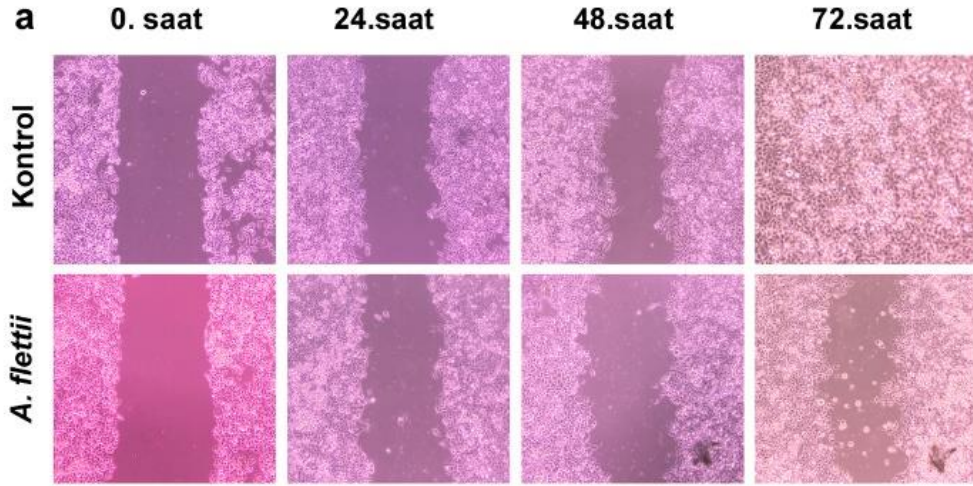
**Şekil 3.88:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla %124,6 gecikmiştir (Şekil 3.89). Hücrelerin formu bozulmuş ve yara alanı dağılmıştır.



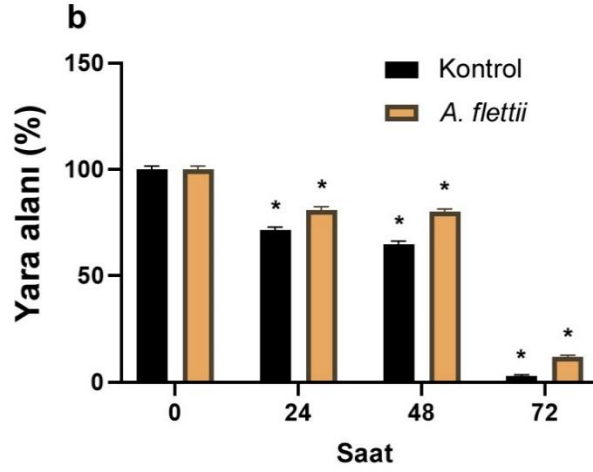
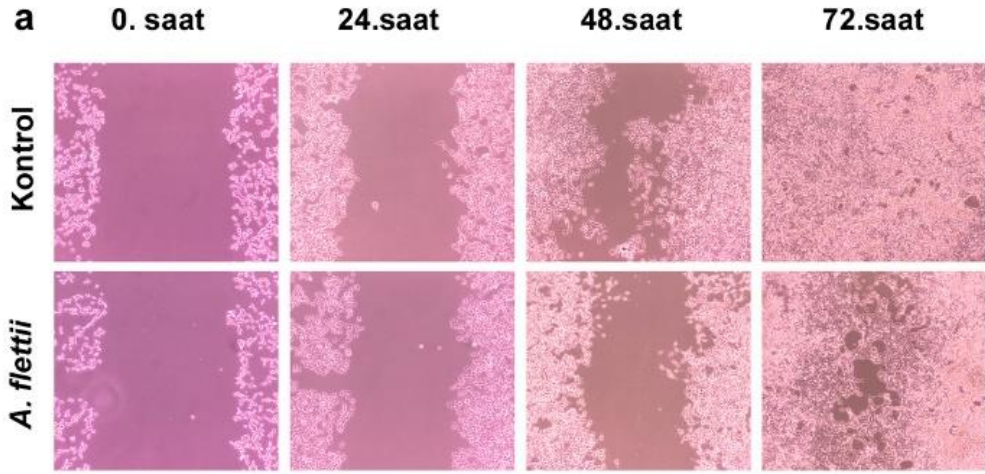
**Şekil 3.89:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla yüzde 66,2 gecikmiştir (Şekil 3.90).



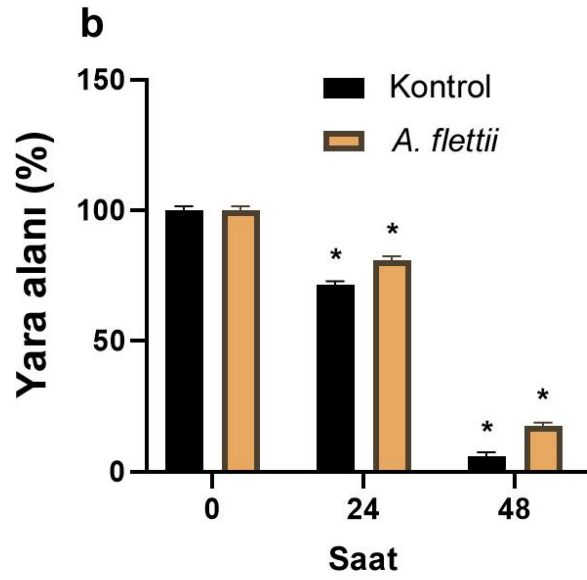
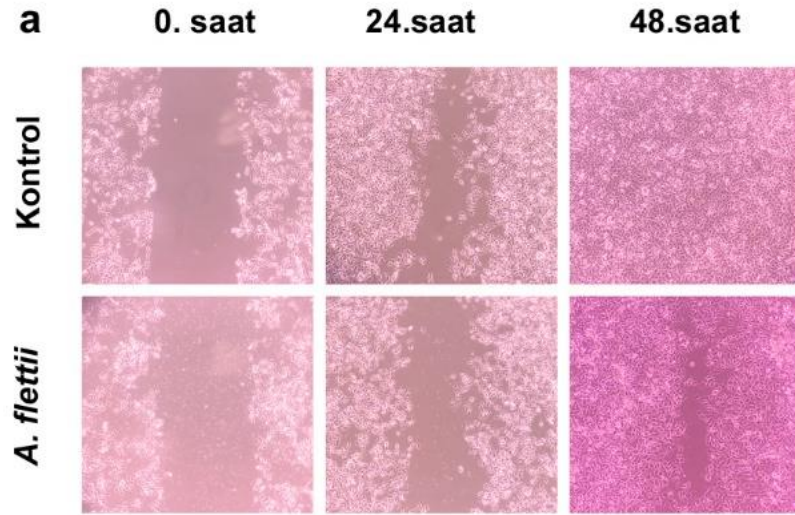
**Şekil 3.90:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla yüzde 36,8 gecikmiştir (Şekil 3.91).



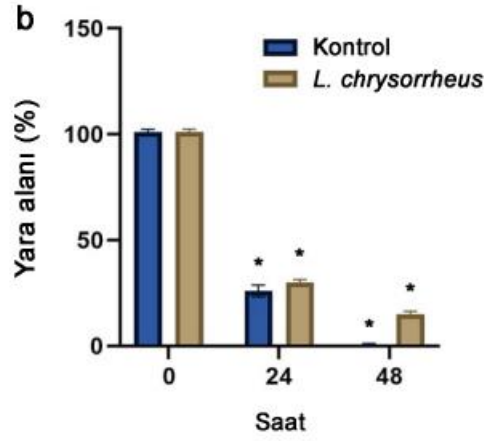
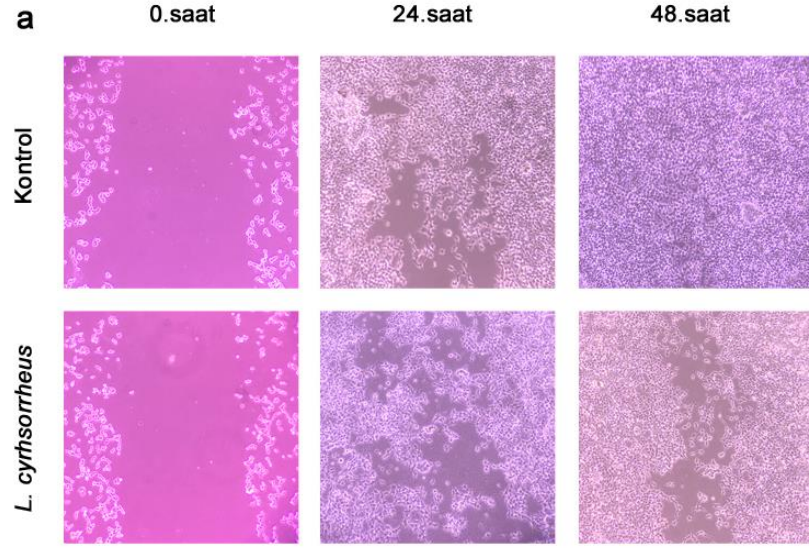
**Şekil 3.91:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MDA-MB-231 hücre hattında 48 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla yüzde 68 gecikmiştir (Şekil 3.92). Kontrol grubu 48. saatte yara alanını doldurduğu için çalışma 48. saatte sonlandırılmıştır.



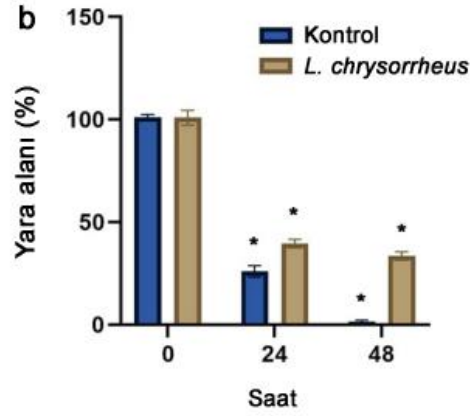
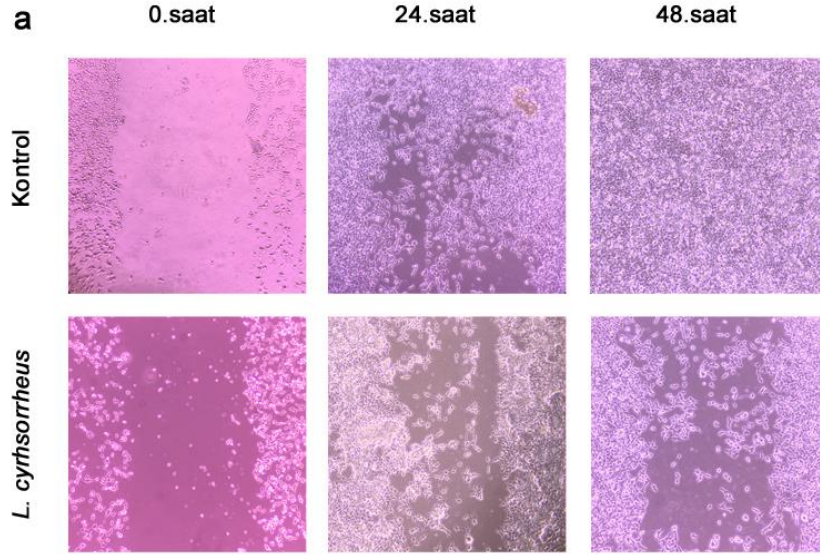
**Şekil 3.92:** *A. flettii* HWP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*L. chrysorrhoeus* HWP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla yüzde 81 gecikmiştir (Şekil 3.93). Kontrol grubu 48. saatte yara alanını doldurduğu için çalışma 48. saatte sonlandırılmıştır.



**Şekil 3.93:** *L.chrysoarrheus* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin PANC-1 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda yara alanı iyileşmesi kontrol grubuna kıyasla yüzde 89 gecikmiştir (Şekil 3.94). Kontrol grubu 48. saatte yara alanını doldurduğu için çalışma 48. saatte sonlandırılmıştır.



**Şekil 3.94:** *L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı üzerinde a) migrasyona etkisi ve b) yüzde sütun grafiği. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında yara alanında anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Yara iyileştirme (wound-healing) deneyi, hücrelerin hız, kalıcılık ve polarite gibi temel hücre göçü parametrelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler yoğun bir tek tabaka oluşturacak şekilde ekilir ve bir pipet ucu yardımıyla kazınarak ince bir "yara" açılır. Yara kenarındaki hücrelerin polarize olması ve yara boşluğuna göç etmesi prensibine dayanan bu yöntemle sitotoksik etki gösteren ajanların kanser progresyonunda önemli olan toplu hücre migrasyonuna etkilerini belirlemek için kullanılır (Cory 2011, Jonkman ve diğ. 2014).

Polisakaritler, doğrusal veya dallı yapılara sahip uzun karbonhidrat zincirlerinden oluşur ve hücrede biyolojik fonksiyonlara katkıda bulunan çok sayıda bileşik içerirler. Yapılarında başta D-galakturonik ve D-glukuronik asitler olmak üzere glikuronik asitler bulunur (Ovodov 2010). Sağlıklı hücreler ve fibroblast hücreleri üzerinde hızlı yara iyileştirme etkileri kadar kanser hücrelerinde yara iyileşmesini geciktirmeleri ve bu süreçte görev alan büyüme faktörlerini inhibe etmeleri de önemlidir.

Çalışmalar sonunda elde edilen yara alanı fotoğrafları ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş ve *A. flettii* HWEP polisakkariti uygulanan MIA-PaCa-2, MDA-MB-231 ve HepG2 hücrelerinin yara alanının kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla 2,96, 4,32 ve 3,12 kat açık olduğu görülmüştür. *G. esculenta* HWEP polisakkarit ekstraktı uygulanan HeLa, TT ve MIA-PaCa-2 hücre hattında ise yara alanının kapanması sırasıyla 5,27, 4,48 ve 18,41 kat gecikmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, özellikle MIA-PaCa-2 hücre hattında kontrol grubu 72 saat sonunda yara alanını tamamen kapatırken *G. esculenta* polisakkaritlerinin hücre göçünü önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür.

*Balanophora polyandra* Griff.'den elde edilen polisakkarit ekstraktının antikanser özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada insan ovaryum kanseri hücre hatları (A2780 ve OVSAHO) üzerinde yara iyileşmesini doz bağımlı şekilde geciktirdiği raporlanmıştır (Qu ve diğ. 2020). *P. ostreatus* ekstraktının *in vivo* ve *in vitro* antitümör etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise insan karaciğer kanseri hücre hatları (HepG2 and HCCLM3) üzerinde yara kapanması farklı konsantrasyonlarda (300, 400 ve 500 µg/mL) denenmiş ve hücre mobilitesinin doz artışına bağlı olarak azaldığı raporlanmıştır (Khinsar ve diğ. 2021).

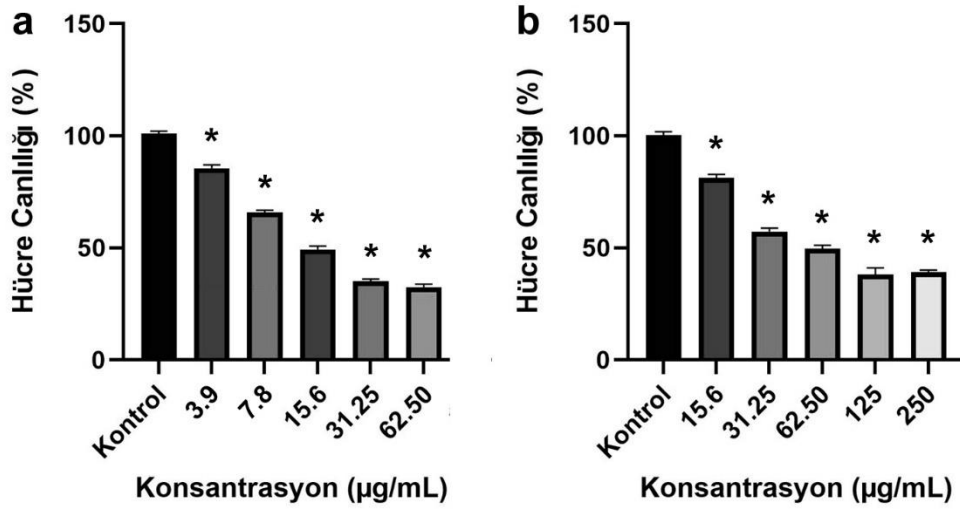
Çalışmamızda araştırdığımız mantar polisakkaritlerinin farklı kanser hücrelerinin yara iyileştirme deneylerinde migrasyonu inhibe ettiği sonuçlar, çok fazla çalışma bulunmamasına karşın literatürde kanser hücreleriyle yapılan çalışmalardaki bulgularla benzerlik göstermektedir.



### 3.5 Polisakkaritlerin Antienflamatuvar Etkileri

Sitotoksisite çalışmalarında en iyi aktivite gösteren *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP örneklerinin antienflamatuvar etkilerinin belirlenmesi için mürin makrofaj (RAW 264.7) hücre hattı kullanılmıştır.

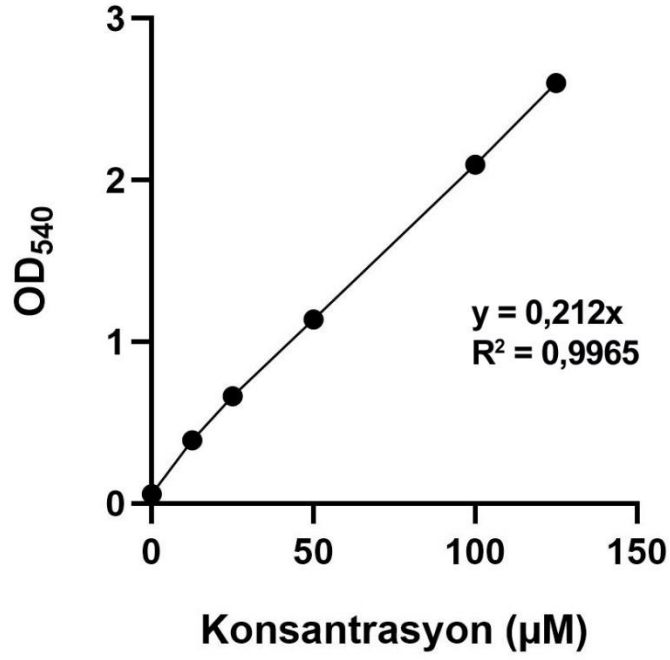
Öncelikle her iki polisakkarit ekstraktı RAW264.7 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve MTT testi ile dozlar belirlenmiştir (Şekil 3.95).



Şekil 3.95: a) *G. esculenta* HWEP ve b) *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının RAW 264.7 hücre hattı canlılığına etkisi. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

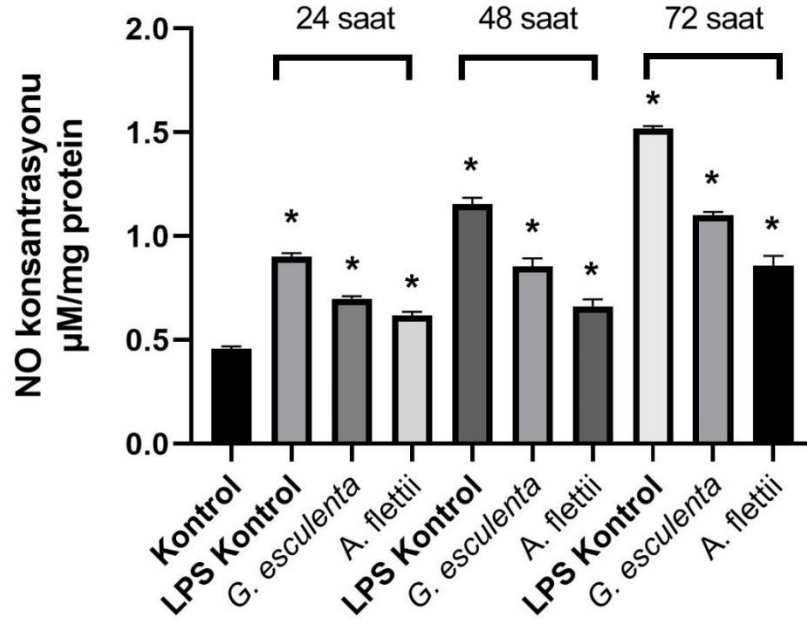
Sonuçlara göre her iki örnek için de (*G. esculenta* HWEP için 3,9 µg/mL ve *A. flettii* HWEP için 15,6 µg/mL) konsantrasyonlar seçilmiş ve çalışmalara başlanmıştır.

İlk olarak, RAW264.7 hücreleri 12 kuyucuklu kültür plakalarına metot kısmında verildiği şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde farklı konsantrasyonlarda polisakkarit örnekleri ve 1 µg/mL konsantrasyonunda LPS uygulanmıştır (1 saat sonra). Çalışma 24, 48 ve 72 saat üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sürelerinin tamamlanmasının ardından besiyerleri toplanarak nitrik oksit (NO) düzeyleri Griess metoduna göre belirlenmiştir. Standart NO grafiği farklı konsantrasyonlardaki (12,5; 25; 5; 100 ve 125 µM) Sodyum Nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) uygulanarak bir mikropilaka spektrofotometre okuyucu kullanılarak 540 nm'de ( $\text{OD}_{540}$ ) ölçülmüştür (Şekil 3.96).



Şekil 3.96: Nitrik oksit (NO) standart eğri grafiği.

Polisakkaritlerin 24 saat uygulaması sonucunda, LPS ile indüklenen LPS Kontrol grubunda negatif kontrol grubuna göre NO miktarında yüzde 95 artış olurken, LPS ile *G. esculenta*'nın 3,9 µg/mL konsantrasyonu uygulanan kuyucukta LPS Kontrol'e göre NO miktarında yüzde 27 azalış gerçekleşmiştir. Benzer şekilde, LPS ile *A. flettii*'nin 15,6 µg/mL konsantrasyonu uygulanan kuyucukta LPS Kontrol'e göre NO miktarında yüzde 41 azalış görülmüştür. 48 saatlik uygulamada ise, *G. esculenta* uygulanan kuyucukta LPS kontrol grubuna göre yüzde 30 ve *A. flettii* uygulanan kuyucukta yüzde 42 azalış görülmüştür. Son olarak, 72 saatlik uygulama sonucunda *G. esculenta* örneği uygulanan kuyucukta LPS Kontrol'e göre NO miktarında yüzde 33 azalış görülürken, *A. flettii* uygulanan kuyucukta da yüzde 47 azalış gerçekleşmiştir (Şekil 3.97). Hücrelerin toplam protein konsantrasyonu, normalizasyon için BCA testi ile belirlendi.

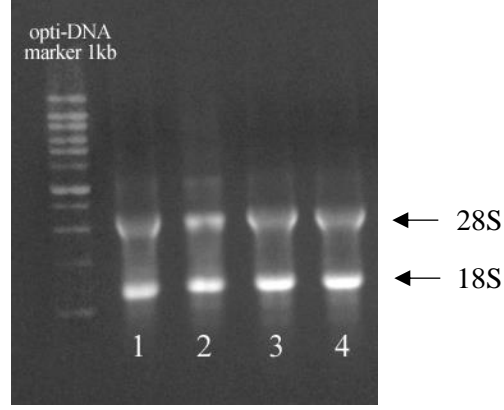


**Şekil 3.97:** *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP örneklerinin 24, 48 ve 72 saat uygulamalarının ardından 1µg/mL LPS ile oluşturulan inflamasyona karşı etkileri (Kontrol grubu dışında tüm örneklere LPS uygulanmıştır). \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

Ayrıca, aynı uygulama RAW 264.7 hücrelerinde tekrar edilerek metot kısmında verildiği gibi inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir.

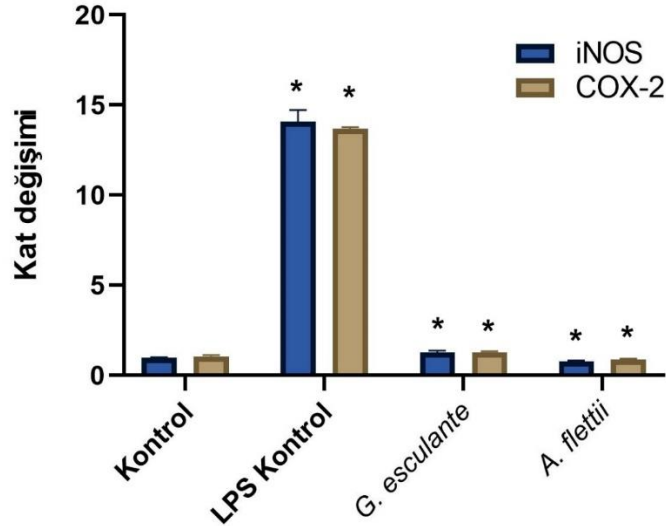
### RAW264.7 Hücrelerinde Toplam RNA'nın Görüntülenmesi

Materyal ve Metot kısmında verildiği gibi hazırlanan bileşenlerin yüklendiği jel güç kaynağına bağlanmış ve 90 Volt, 500 mA'de 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda jel UV transilluminatörde gelLite Jel Görüntüleme Cihazı'nda görüntülenmiştir (Şekil 3.98).



**Şekil 3.98:** *G. esculenta* HWEF ve *A. flettii* HWEF örneklerinin 72 saat uygulamalarının ardından LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücre hattından elde edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa (1) Kontrol, (2) LPS Kontrol, (3) *G. esculenta* HWEF ve (4) *A. flettii* HWEF.

Polisakkaritlerin 72 saat uygulaması sonucunda, LPS ile indüklenen LPS Kontrol grubunda negatif kontrol grubuna göre iNOS gen ekspresyonunda 13,64 kat, COX-2 ekspresyonunda ise 12,04 artış olurken, LPS ile *G. esculenta*'nın 3,9 µg/mL konsantrasyonu uygulanan hücrelerde LPS Kontrol'e göre iNOS seviyesinde %80 ve COX-2 seviyesinde %83 azalış gerçekleşmiştir. *A. flettii*'nin 15,6 µg/mL konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ise LPS Kontrol'e göre iNOS seviyesinde %92 ve COX-2 seviyesinde %88 azalış gerçekleşmiştir (Şekil 3.99).



**Şekil 3.99:** *G. esculenta* HWEF ve *A. flettii* HWEF örneklerinin 72 saat uygulamalarının ardından 1µg/mL LPS ile oluşturulan inflamasyona karşı iNOS ve COX-2 gen ekspresyonlarındaki değişim (Kontrol grubu dışında tüm örneklere LPS uygulanmıştır). \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

Literatürde polisakkaritlerin çeşitli sitokinlerin salınımını artırarak bağışıklık sistemini indüklediğine dair çok sayıda yayın bulunmaktadır (Zhang ve diğ. 2014 ve Li ve diğ. 2016, Zhao ve diğ. 2020, Motta ve diğ. 2021). İmmün sistemi uyaran polisakkaritler kanser tedavisi için potansiyel ajanlardır (Borchers ve diğ. 1999, Schepetkin ve Quinn 2006, Zhang ve diğ. 2014). Örneğin Lentinan, mide kanseri hastalarının hayatta kalma oranlarını iyileştirmek için kemo-immünoterapide floropirimidin ile kombinasyon halinde başarıyla kullanılan, bağışıklığı destekleyen mantar polisakaritlerinden biridir (Ina ve diğ. 2013). Bu nedenle, çalışmamızda kullandığımız *G. esculenta* ve *A. flettii*'den ekstrakte edilen polisakkaritlerin, immünoterapötik ajanların formülasyonu için umut verici adaylar olması beklenmektedir.

Çalışmamızda *G. esculenta* ve *A. flettii* polisakkarit örnekleri, LPS (1 µg/mL) ile indüklenen RAW264.7 hücre hattı üzerinde NO miktarını 14, 48 ve 72 saat uygulamalarının ardından düşürmüştür. Ayrıca, 72 saat uygulamaların ardından inflamasyon ilişkili nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gen ekspresyonunun seviyesini önemli derecede düşürmüştür.

Kim ve arkadaşlarının çalışmasında, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. ekstraktlarının farelerde lipopolisakkarit kaynaklı akciğer hasarı üzerindeki TNF-α, IL-6, IL-1β ekspresyonunun yanı sıra COX-2 ve iNOS mRNA ekspresyonunu inhibe ederek koruyucu etkisi gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2016). Bu sonuçlar farklı çalışmalarla da desteklenmektedir (Mueller ve diğ. 1991, Jiang ve diğ. 2011). *Cordyceps militaris* L.'ten izole edilen kordisepinin iNOS, COX-2 ekspresyonunu ve TNF-α gen ekspresyonunu aşağı yönde regüle ettiği gösterilmiştir (Lee ve diğ. 2014). Ek olarak, Ohta ve arkadaşlarının çalışmasında, Ova (ovalbümin) ile indüklenen astım farelerinde kordisepinin IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerini azalttığını raporlamıştır (Ohta ve diğ. 2007).

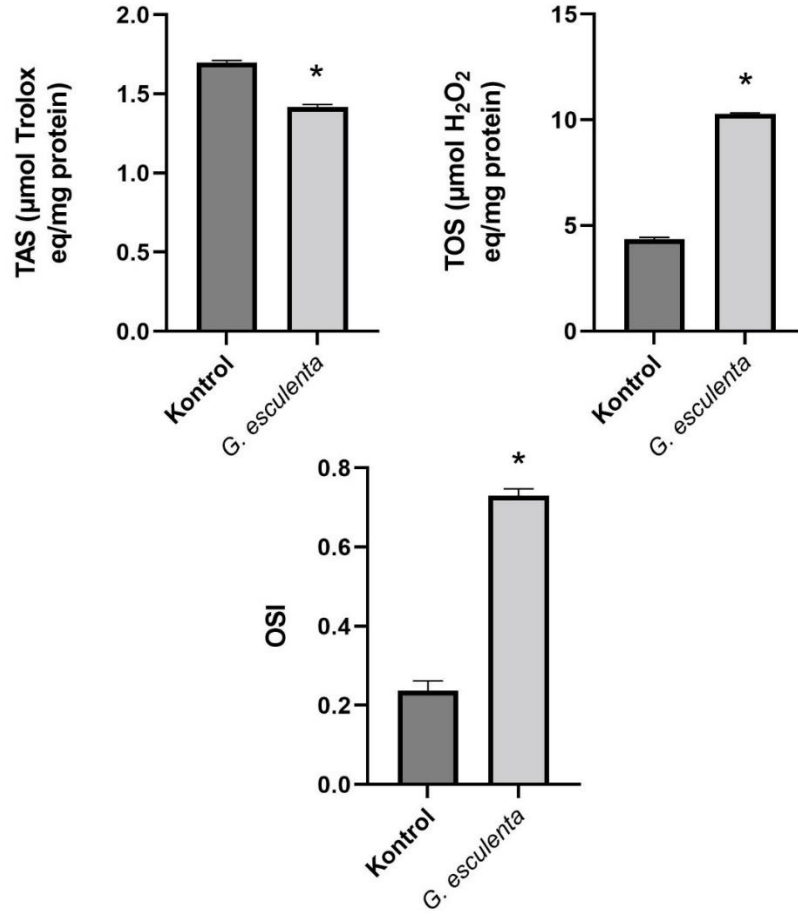
Mantar polisakkaritleri kimyasal yapıları açısından çok çeşitli anti-enflamatuvar bileşikler (terpenoidler, fenolik bileşikler ve diğer düşük moleküler ağırlıklı bileşikler) içerir. Yapılan çalışmalarla farklı biyoaktif metabolit türleri izole edilen mantarların immünomodülatör ya da güçlü anti-inflamatuvar ajanlar olarak farklı etki mekanizmaları ortaya konmaktadır.

Çalışmamızda verilen *G. esculenta* ve *A. flettii* polisakkarit ekstraktlarının antiinflamatuvar etkileri, literatürdeki çalışmalarda yer alan bulgularla benzerlik göstermektedir ve mantar polisakkaritlerinin immünomodülatör ve antiinflamatuvar potansiyelini ortaya koymaktadır.

### **3.6 Polisakkaritlerin TAS ve TOS Seviyelerine Etkileri**

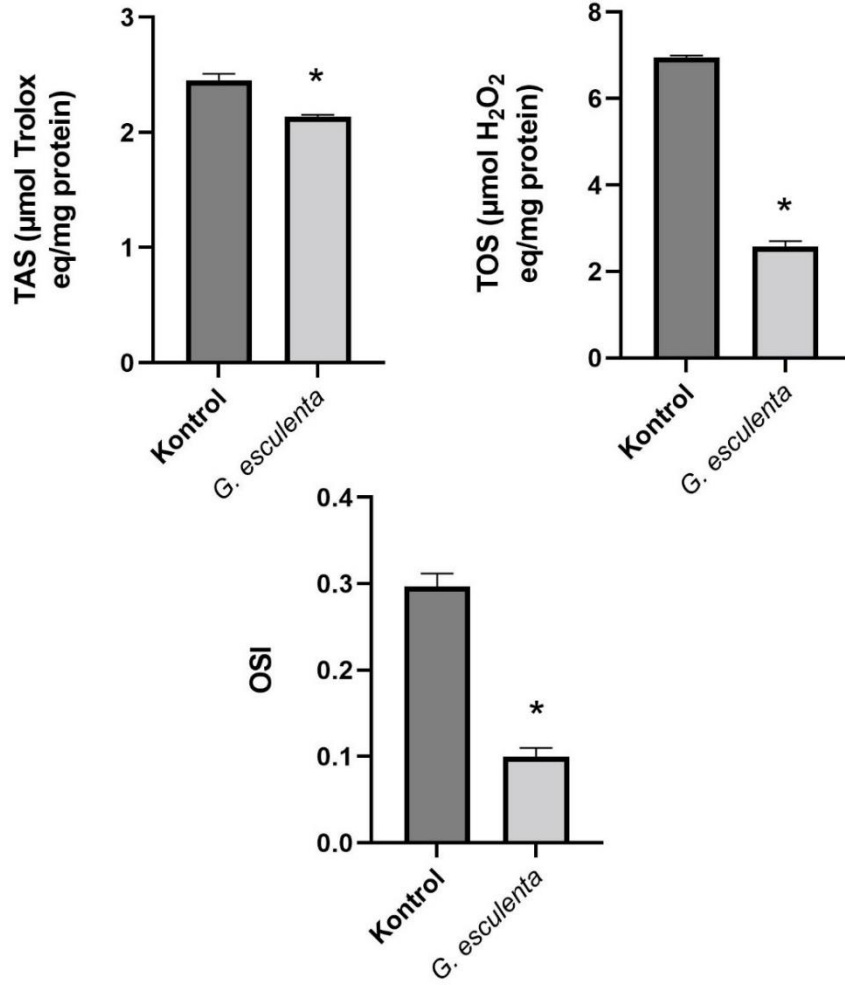
Polisakkaritlerin hücreler üzerinde Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS)'lerini belirlemek amacıyla sitotoksosite çalışmalarında en iyi aktiviteyi gösteren *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP örneklerinin 72 saat etkili dozları hücre hatlarına uygulanmıştır. Oksidatif stres indeksi (OSİ), TAS değerinin TOS değerine bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Hücrelerin toplam protein konsantrasyonu, normalizasyon için BCA testi ile belirlenmiştir.

*G. esculenta* HWEP örneğinin HeLa hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. *G. esculenta* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 102,7 artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 227 artış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.100).



**Şekil 3.100:** *G. esculenta* HWEP polisakkaritinin HeLa hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

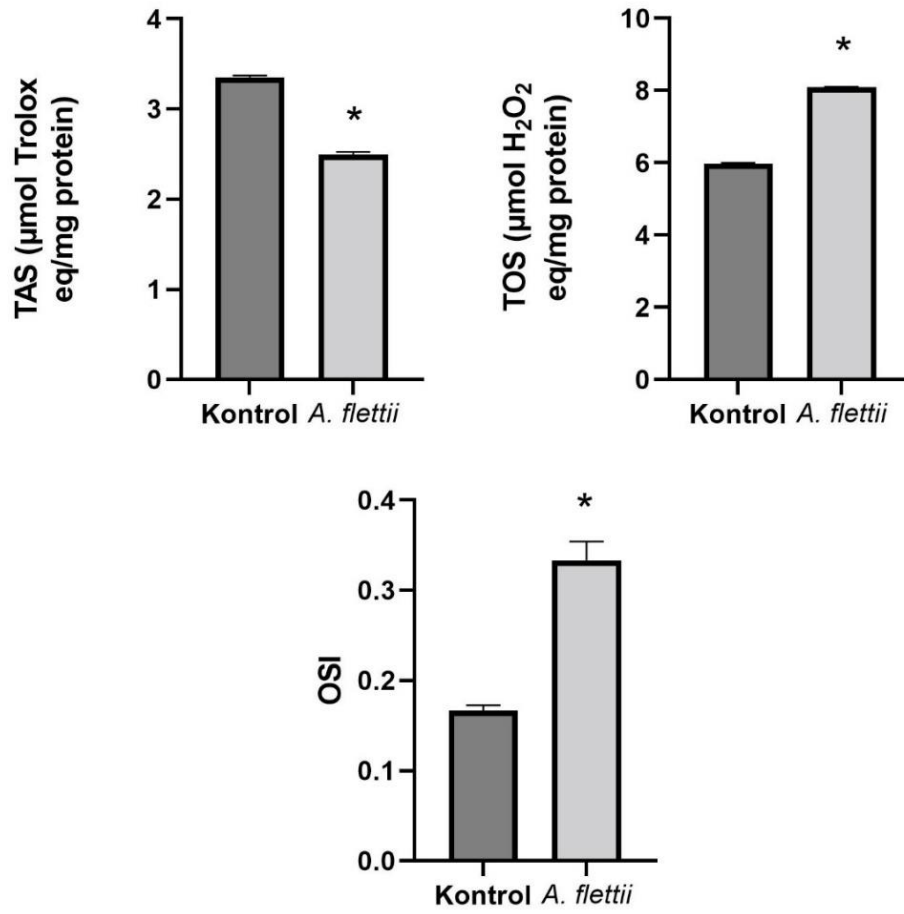
*G. esculenta* HWEP örneğinin TT hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. *G. esculenta* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 62,8 azalış gerçekleşmiştir ( $p < 0,05$ ). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 68 azalış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.101).



**Şekil 3.101:** *G. esculenta* HWEP polisakkaritinin TT hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).

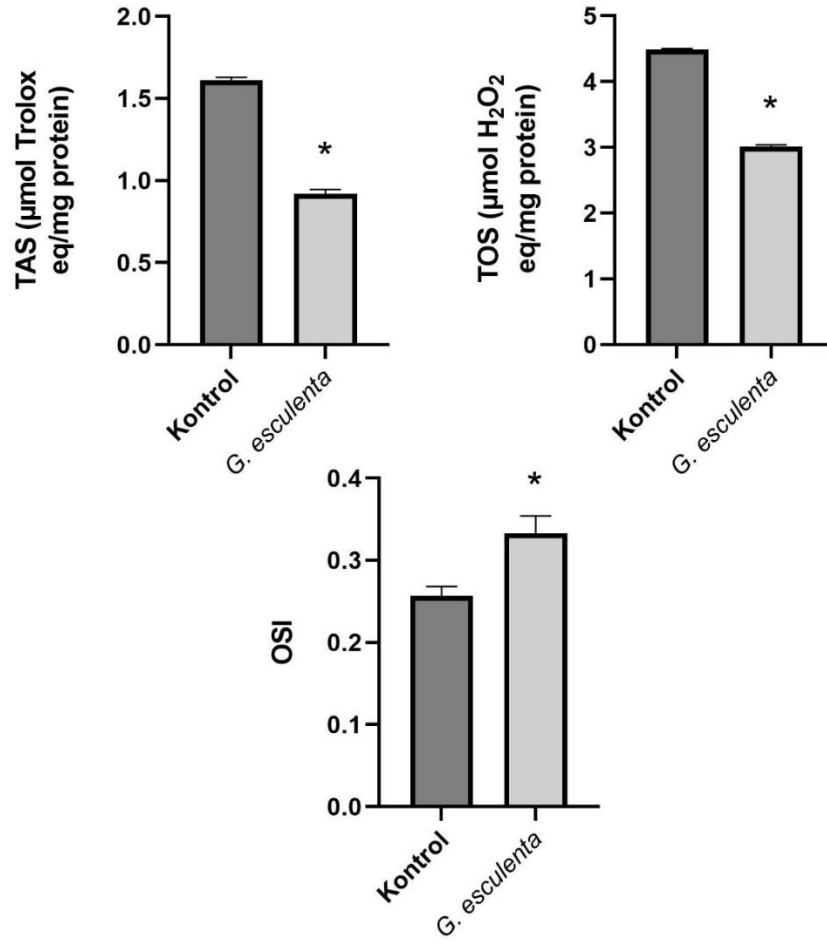
*A. flettii* HWEP örneğinin MDA-MB-231 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde yüzde 29,3 azalış gerçekleşmiştir. *A. flettii* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 25,92 artış gerçekleşmiştir (p < 0,05). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 75 artış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.102).





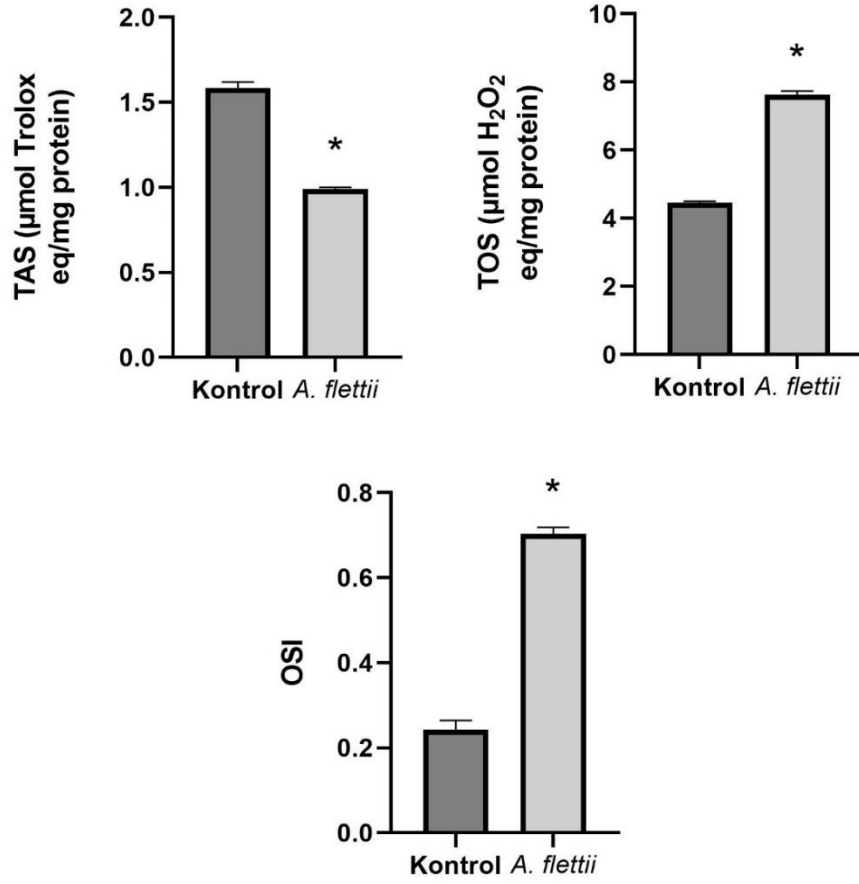
**Şekil 3.102:** *A.flettii* HWEP polisakkaritinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

*G. esculenta* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde yüzde 40,4 azalış gerçekleşmiştir. *G. esculenta* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 31,5 azalış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 28 artış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.103).



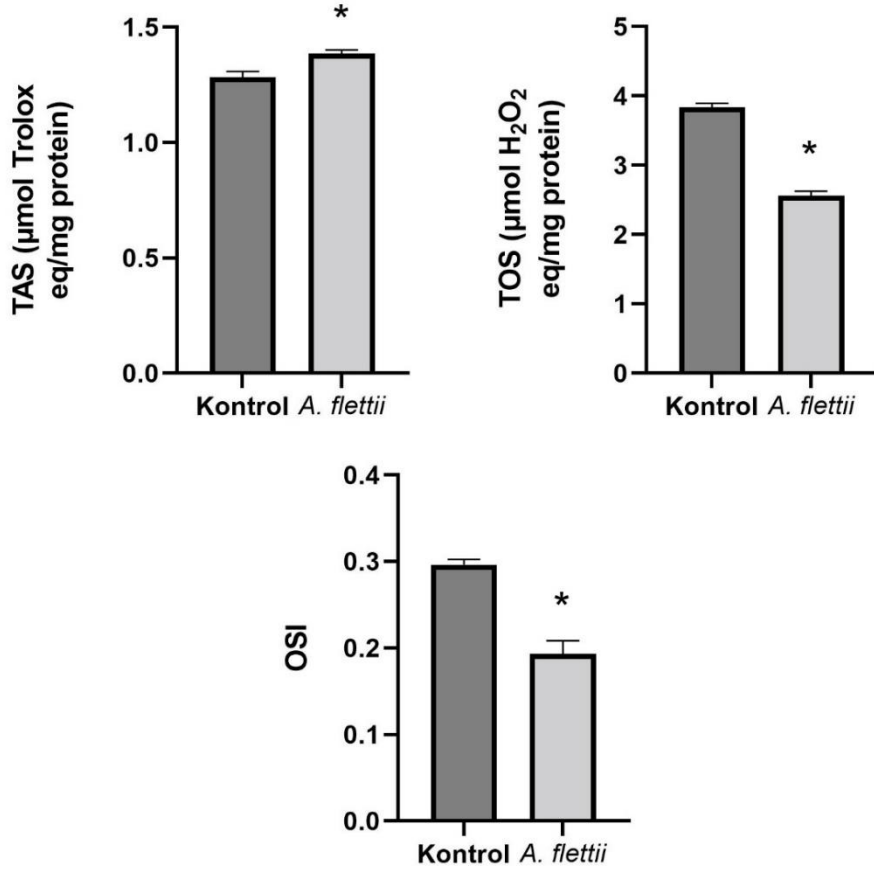
**Şekil 3.103:** *G. esculenta* HWEP polisakaritinin MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* HWEP örneğinin MIA PaCa-2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde yüzde 37,5 azalış gerçekleşmiştir. *A. flettii* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 91,5 artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 218 artış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.104).



**Şekil 3.104:** *A. flettii* HWEP polisakkaritinin MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı ( $p < 0,05$ ).

*A.flettii* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından doz grubunda kontrol grubuna kıyasla TAS seviyesinde yüzde 7,4 artış gerçekleşmiştir. *A. flettii* uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla TOS seviyesinde ise yüzde 31 azalış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Son olarak, OSI indeksinde yüzde 36,3 azalış gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 3.105).



**Şekil 3.105:** *A. flettii* HWPB polisakkaritinin HepG2 hücre hattı üzerinde 72 saat uygulaması sonrasında TAS, TOS ve OSI değerleri. \* Kontrol grubuna göre farklı (p < 0,05).

Hüresel oksidatif hasar, esas olarak serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu bir mekanizmadır. Birçok biyokimyasal süreçte düşük ROS seviyeleri görülürken; bununla birlikte, ROS'un aşırı üretimi ve/veya uzaklaştırılmaması, aktif oksijen metabolitlerinin oluşumu ile bunların oluşma hızı arasında bir dengesizlik olarak karakterize edilen oksidatif strese neden olabilir. Oksidatif stres, kanser dahil birçok hastalığın patogenezinde ve komplikasyonlarında rol oynayabilir. ROS'un neden olduğu DNA hasarı sadece tümör oluşumunu başlatmakla kalmaz, aynı zamanda kanserin ilerlemesine de yardımcı olur (Abuelo ve diğ. 2013, Singh ve diğ 2016, Gupta ve diğ. 2016).

TOS, Oksidatif stres indeksi (OSI) ile birlikte incelendiğinde sonuçlarımızda oksidanlar ve antioksidanlar arasında istatistiksel farklılıklar bulundu. Bu hücrelerin oksidatif strese maruz kaldığını ve ROS üretimiyle birlikte antioksidan savunmasındaki azalmanın bir sonucu olabileceğinden hem oksidanları hem de

antioksidanları ayrı ayrı değerlendirmek yerine birlikte değerlendirmenin daha iyi bir uygulama olabileceğini düşündürmektedir ve dolayısıyla bu parametreler birbirine bağımlıdır.

Çalışmalar neticesinde, deney grupları arasında en yüksek TAS seviyesi (1,08 µmol Trolox eq/mg protein) *A. flettii* HWEP örneği uygulanan HepG2 hücre hattında ölçüldü. Yine *A. flettii* uygulanan deney gruplarından MIA-PaCa-2 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında TAS seviyelerinde düşüş olduğu ve bu düşüşün istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. TOS seviyeleri incelendiğinde ise *G. esculenta* için yalnızca HeLa hücre hattında, *A. flettii* için MDA-MB-231 ve MIA-PaCa-2 hücre hatlarında yükseldiği kaydedilmiştir. Oksidatif stres indeksi (OSI) değerlendirildiğinde ise bu oran TT hücre hattında en düşük seviyede görülmüştür. OSI oranı en yüksek çıkan iki grup ise *G. esculenta* uygulanan HeLa ve *A. flettii* uygulanan MIA-PaCa-2 hücreleri olarak belirlenmiştir.

Sonuçlarımız arasında; *G. esculenta*'nın HeLa ve MIA-PaCa-2 hücre hattında, *A. flettii*'nin ise MIA-PaCa-2 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde daha yüksek OSI değerlerine sahip olduğu görülmektedir. OSI değerinin artması, sadece oksidatif stresin artması değil *G. esculenta* HWEP polisakkaritinin MIA-PaCa-2 hücre hattındaki sonuçlarında olduğu gibi TAS'taki düşüşle beraber TOS'daki daha büyük düşüşten de kaynaklanabilmektedir.

Sitotoksosite testleri sonucunda belirlenen EC50 dozu uygulanan polisakkaritlerin TT, MIA-PaCa-2 ve HepG2 hücrelerinde TAS seviyelerini kontrol grubuyla kıyaslandığında azaltarak oksidatif stresi artırdığı ve büyük olasılıkla bu nedenle apoptozu uyardığı söylenebilir. Bu deney gruplarında imaj sitometri ve gerçek zamanlı PZR sonuçlarına bakıldığında oksidatif stresle beraber apoptotik genlerin (Bax, caspase 3, 8, 9, p53) mRNA ekspresyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, polisakkarit örneklerinin farklı dozlarda (daha düşük ya da toksik olmayan) araştırılması yararlı olacaktır. Çalışmamızda EC50 dozu uygulanan gruplarda TAS seviyesinin düşmesine bağlı olarak oksidatif stresin ve buna bağlı olarak p53 geninin indüklenmesi, sitozolik ve mitokondriyal kaynaklı reaktif oksijen türlerinin apoptozun uyarılmasında etkili olabileceğini göstermektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda bu bulgumuzu destekler niteliktedir. (Lu ve diğ. 2015, Nasimian ve diğ. 2020).

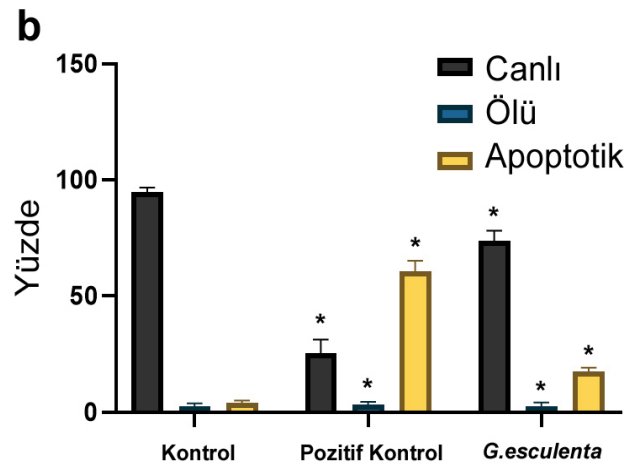
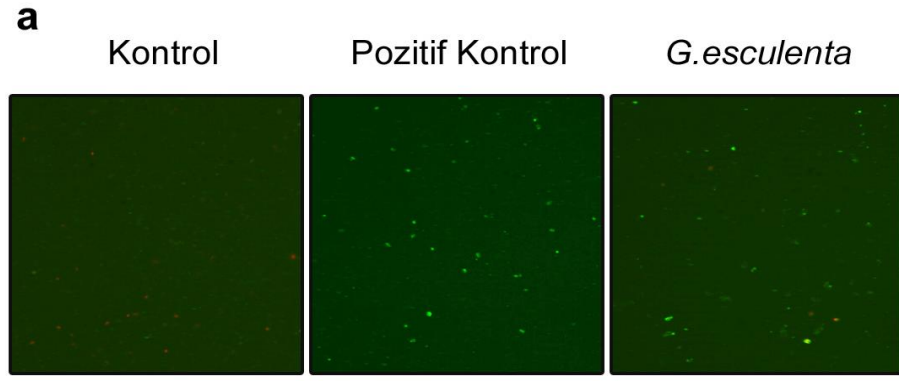
Ek olarak, çok sayıda çalışmada, polisakkarit ekstraktları ve içerdikleri galaktoz, glikoz ve mannozun oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Babior ve Woodman 1990, Wasser 2011, Erjavec ve diğ. 2012, Wang ve diğ. 2014, Suabjakyong ve diğ. 2015, Klaus ve diğ. 2015). Bu nedenle, çalışmamızda kullanılan mantarların bazıları antioksidan özellikler sergilemesine rağmen, bu aktiviteden sorumlu olan bileşikleri karakterize etmek için araştırılan ekstraktlardan aktif olanları fraksiyonlamak gerekmektedir.

### **3.7 Apoptoz Analizleri**

#### **3.7.1 Annexin-V/PI Boyama Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi**

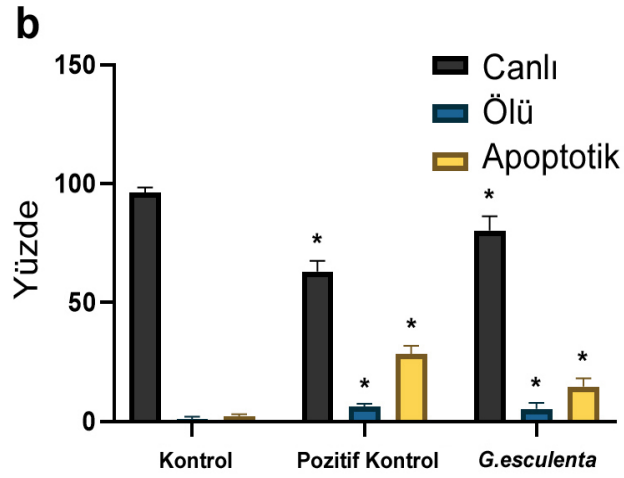
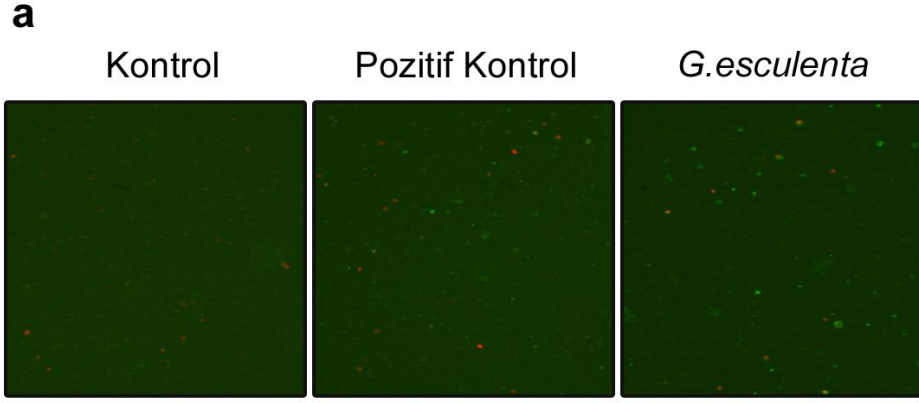
Apoptozun belirlenmesi amacıyla *G. esculenta* HWEP, *A. flettii* HWEP ve *L. chrysorrhoeus* HWEP örneklerinin 72 saat dozları HeLa, TT, MDA-MB-231, HepG2 ve PANC-1 hücre hatlarına uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir. 72 saat sonra besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve hücre peleti PBS ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiştir. Hücrelerin canlı, ölü ve apoptotik oranları metot kısmında verildiği şekilde floresans imaj sitometri cihazında analiz edilmiştir.

*G. esculenta* HWEP örneğinin HeLa hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla 94, 2 ve 4 iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla 23, 12 ve 65 bulunmuştur. Doz grubunda ise hücre dağılımı %78 canlı, %4 ölü ve %18 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.106).



**Şekil 3.106:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HeLa hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (p < 0,05).

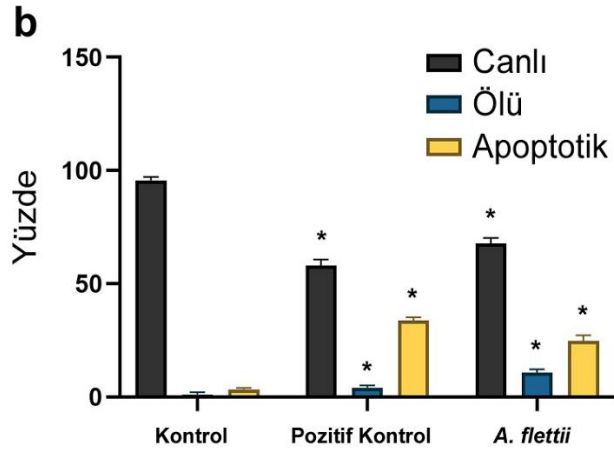
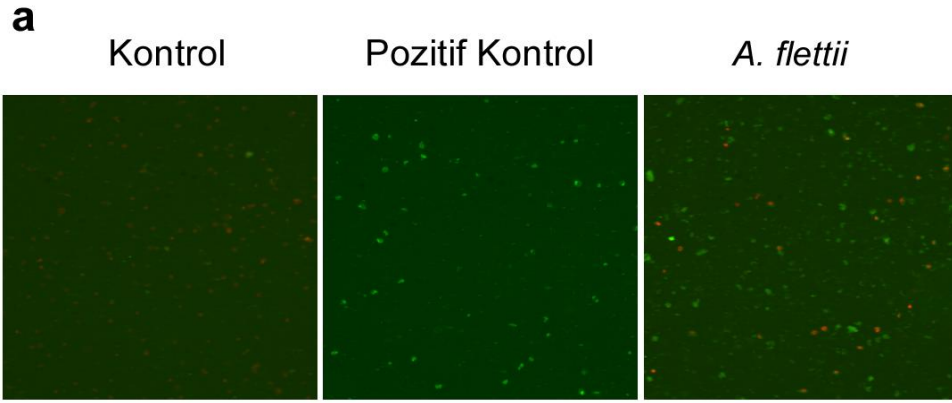
*G. esculenta* HWEP örneğinin TT hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla 98, 1 ve 1 iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla 68, 7 ve 25 bulunmuştur. Doz grubunda ise hücre dağılımı %86 canlı, %3 ölü ve %11 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.107).



**Şekil 3.107:** *G. esculenta* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının TT hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (p < 0,05).

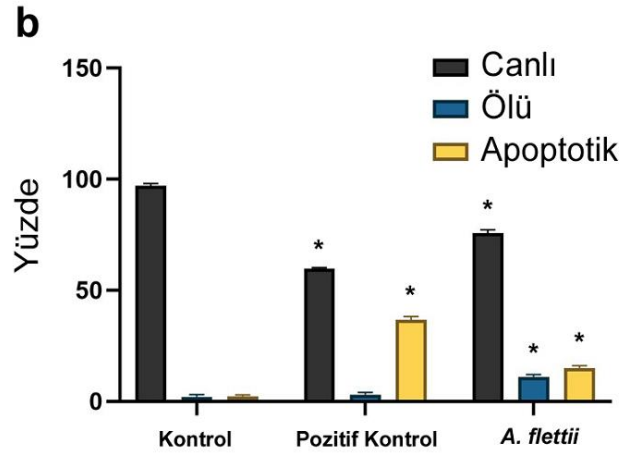
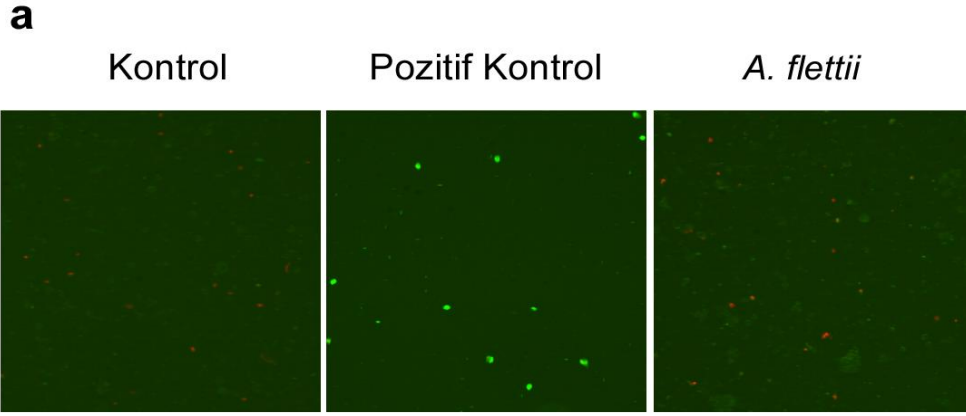
*A. flettii* HWEP örneğinin MDA-MB-231 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla 93, 2 ve 5 iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla 42, 3 ve 55 bulunmuştur. Doz grubunda ise hücre dağılımı %78 canlı, %3 ölü ve %19 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.108).





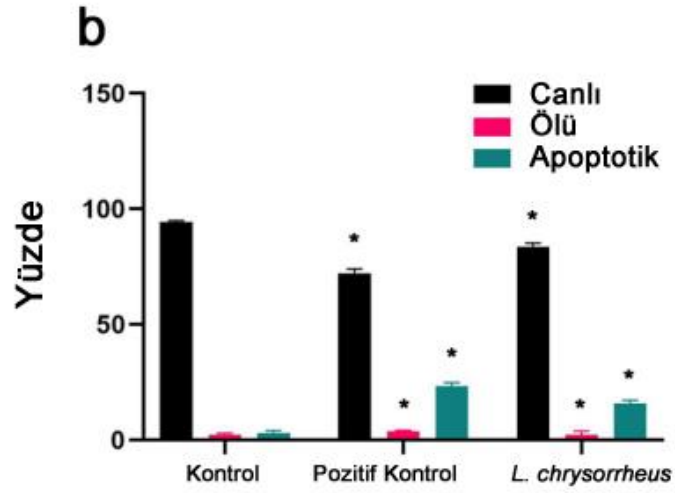
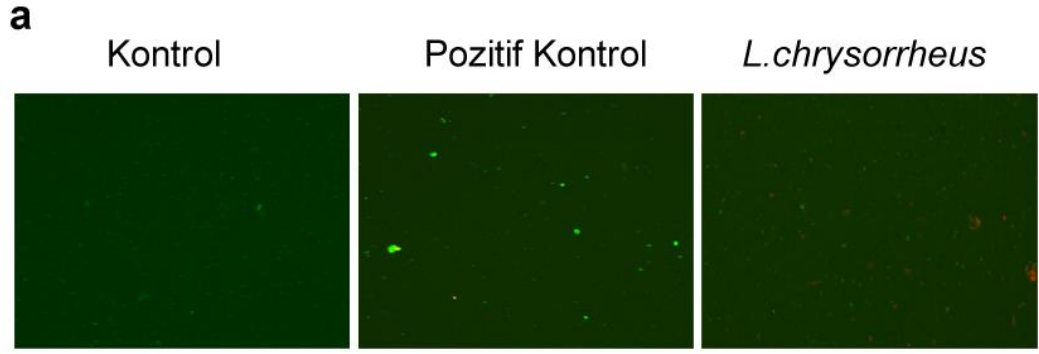
**Şekil 3.108:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (p < 0,05).

*A. flettii* HWEP örneğinin HepG2 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla 97, 1 ve 2 iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla 60, 2 ve 37 bulunmuştur. Doz grubunda ise hücre dağılımı %78 canlı, %9 ölü ve %13 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.109).

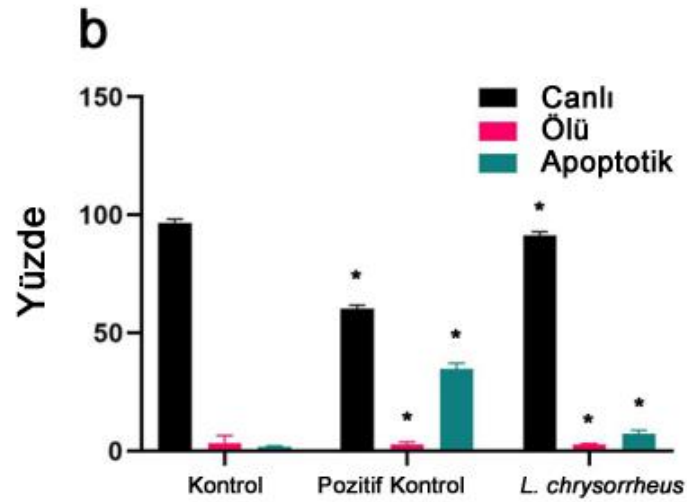
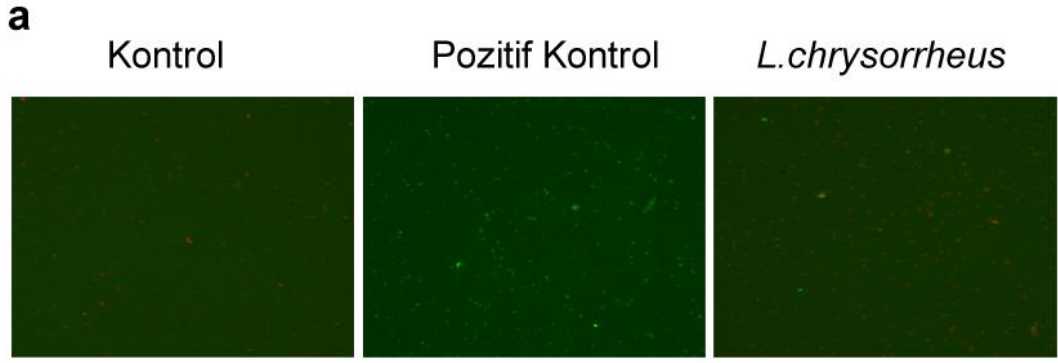


**Şekil 3.109:** *A. flettii* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

*L. chrysoarrheus* HWEP örneğinin HepG2 ve PANC-1 hücre hattında 72 saat uygulamasının ardından pozitif kontrol grubunda apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla %37 ve %27 iken doz grubunda ise apoptotik hücre dağılımı sırasıyla %14 ve %7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.110-111). Bu sonuç, *L. chrysoarrheus* polisakkaritinin, PANC-1 hücrelerine kıyasla HepG2 hücre hattında apoptozu daha çok indüklediğini göstermektedir.



**Şekil 3.110:** *L. chrysothrix* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının HepG2 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (p < 0,05).

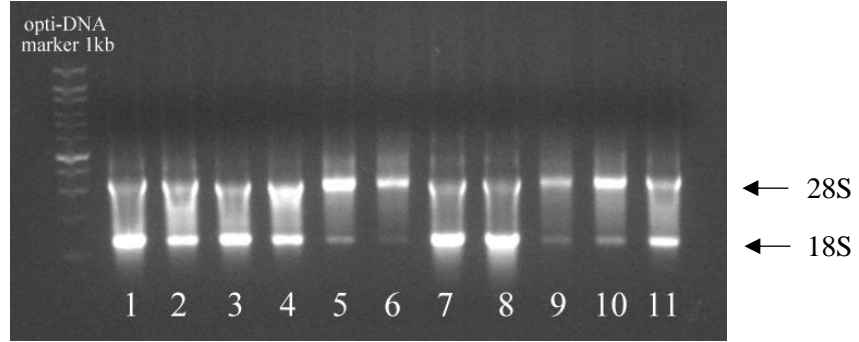


**Şekil 3.111:** *L. chrysothrix* HWEP örneğinin 72 saat uygulamasının PANC-1 hücre hattı üzerinde apoptoza etkisi. **a)** Arthur – Floresan Hücre Analiz Cihazı görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzde sütun grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* Polisakkarit uygulanan grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak fark tespit edilmiştir (p < 0,05).

### 3.7.2 Apoptozda Görev Alan Genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

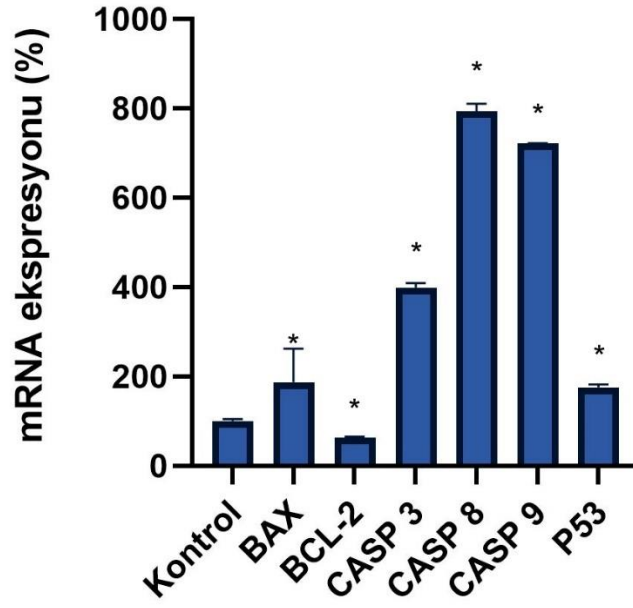
HeLa, TT, MDA-MB-231, HepG2 ve PANC-1 hücre hatlarında sitotoksosite çalışmalarında belirlenen etkili dozlarda *G. esculenta*, *A. flettii* ve *L. chrysothrix* polisakkaritlerinin uygulanması sonucunda apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle incelenmiştir.

## Toplam RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi

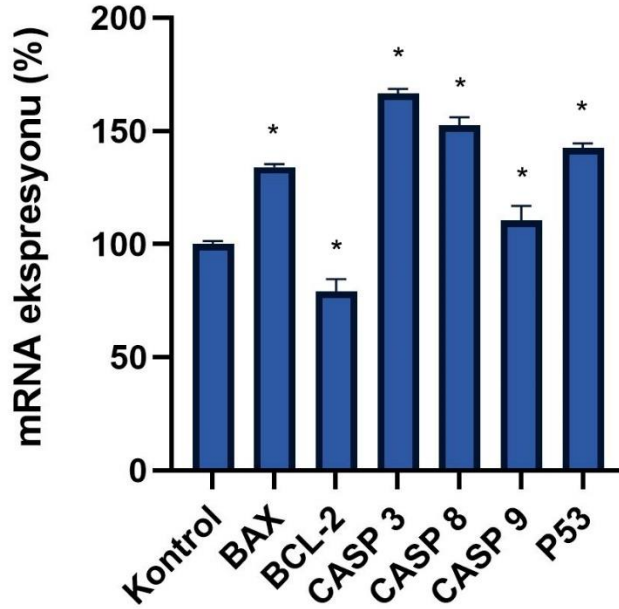


**Şekil 3.112:** Polisakkaritlerin 72 saat uygulamalarının ardından HeLa, TT, HepG2 ve MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen RNA'larn %1'lik agaroz jel elektrofrezisi. Soldan sağa (1) HeLa Kontrol, (2) HeLa *G. esculenta* HWEP, (3) TT Kontrol, (4) TT *G. esculenta* HWEP, (5) HepG2 Kontrol, (6) HepG2 *A. flettii* HWEP, (7) MDA-MB-231 Kontrol, (8) MDA-MB-231 *A. flettii* HWEP, (9) PANC-1 Kontrol, (10) PANC-1 *L.chrysorrhoeus* HWEP ve (11)HepG2 *L.chrysorrhoeus* HWEP.

*G. esculenta* polisakkarit ekstraktının EC50 dozunun 72 saat uygulaması sonrasında HeLa ve TT hücre hattında Caspase 8 geninin ekspresyon seviyesinde sırasıyla %691 ve %50 artış gerçekleşmiştir ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde polisakkarit uygulaması sonrasında Caspase 9 ekspresyonunda, sırasıyla HeLa ve TT hücre hattında %724 ve %10 artış tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, Caspase 3 mRNA ekspresyonu, HeLa ve TT hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %298 ve %65, P53 mRNA seviyesinde %76 ve %44 artış, BAX geninde ise %137 ve %35 artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Kontrol ile karşılaştırıldığında, BCL-2 mRNA seviyesi ise HeLa ve TT hücrelerinde sırasıyla %54 ve %20 azalmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.113 ve 3.114).

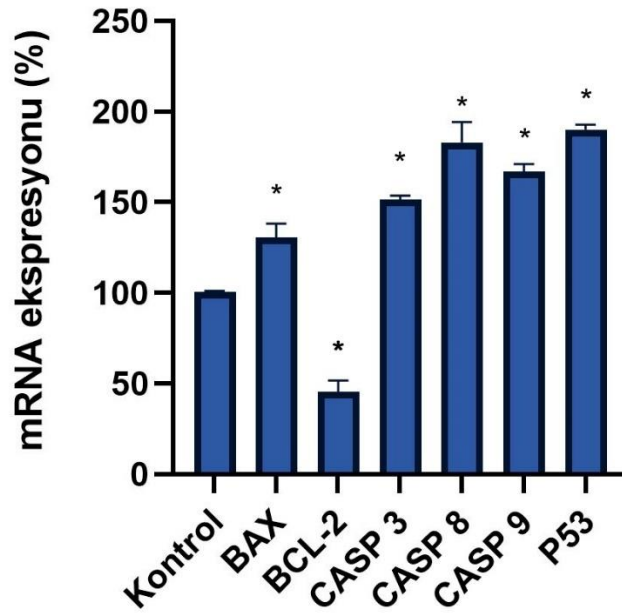


**Şekil 3.113:** *G. esculenta* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HeLa hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

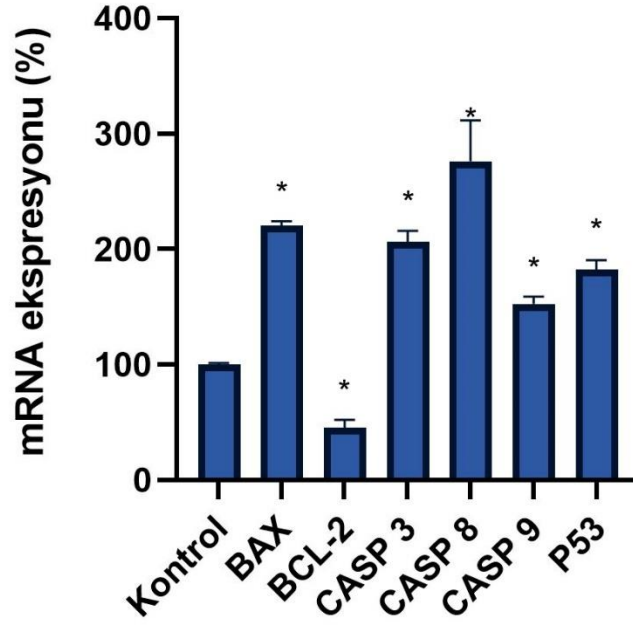


**Şekil 3.114:** *G. esculenta* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında TT hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

*A. flettii* polisakkarit ekstraktının EC50 dozunun 72 saat uygulaması sonrasında MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hattında BAX geninin ekspresyon seviyesinde sırasıyla %31 ve %120 artış gerçekleşmiştir ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde polisakkarit uygulaması sonrasında Caspase 3 ekspresyonunda, sırasıyla MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hattında %51 ve %101 artış tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, Caspase 8 mRNA ekspresyonu, MDA-MB-231 ve HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %83 ve %156, P53 mRNA seviyesinde %85 ve %173 artış, Caspase 9 geninde ise %67 ve %52 artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Kontrol ile karşılaştırıldığında, BCL-2 mRNA seviyesi ise MDA-MB-231 ve HepG2 hücrelerinde sırasıyla %52 ve %63 azalmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.115 ve 3.116).



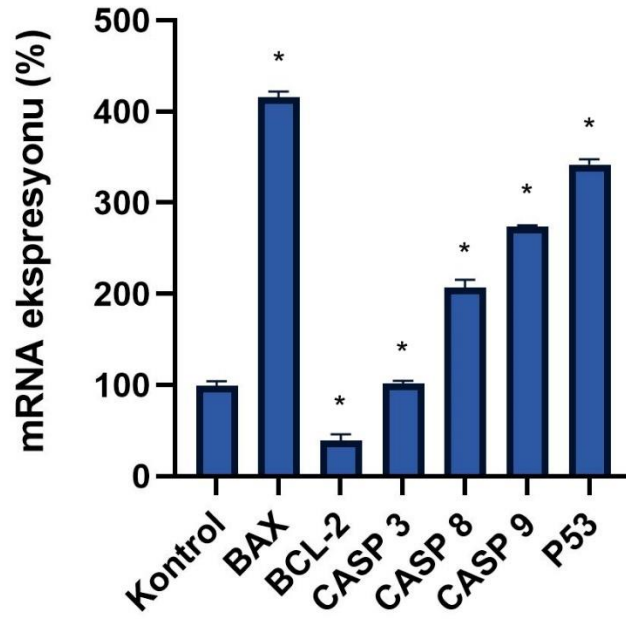
**Şekil 3.115:** *A. flettii* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).



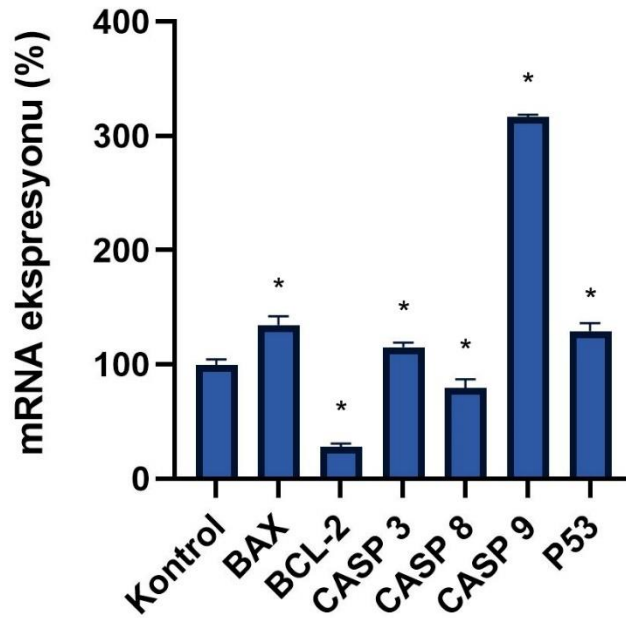
**Şekil 3.116:** *A.flettii* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HepG2 hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

*L. chrysoarrheus* polisakkarit ekstraktının EC50 dozunun 72 saat uygulaması sonrasında HepG2 ve PANC-1 hücre hattında BAX geninin ekspresyon seviyesinde sırasıyla %317 ve %31 artış gerçekleşmiştir ( $p < 0,05$ ). Caspase 3 ekspresyonunda, sırasıyla HepG2 ve PANC-1 hücre hattında %7 ve %18 artış tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Ek olarak, Caspase 8 mRNA ekspresyonu, HepG2 ve PANC-1 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %101 artış ve %11 azalış görülmüştür. P53 mRNA seviyesinde %241 ve %28 artış, Caspase 9 geninde ise %174 ve %219 artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Kontrol ile karşılaştırıldığında, BCL-2 mRNA seviyesi ise HepG2 ve PANC-1 hücrelerinde sırasıyla %58 ve %65 azalmıştır ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3.117 ve 3.118).





**Şekil 3.117:** *L. chrysoarrheus* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında HepG2 hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).



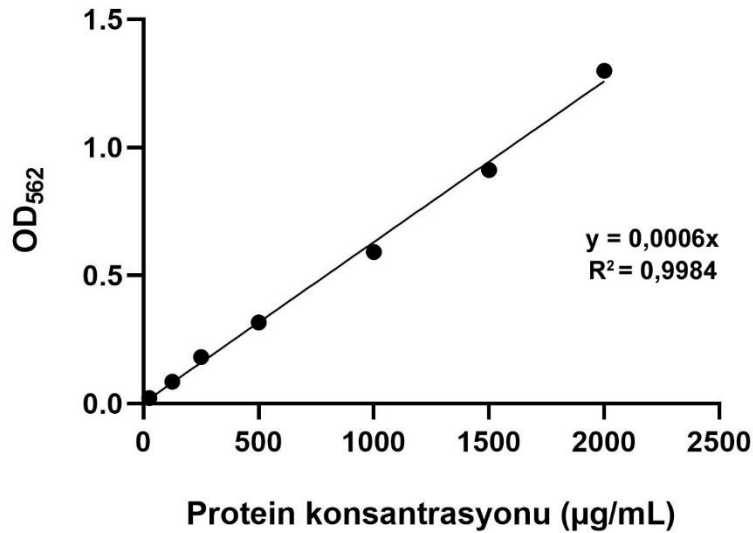
**Şekil 3.118:** *L. chrysoarrheus* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında PANC-1 hücre hattında apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri QIAGEN GeneGlobe ile analiz edilmiştir. Kontrol değeri %100 alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

### 3.7.3 Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Polisakkaritlerin etkili olduğu hücre hatlarından protein izolasyonu yapmak amacıyla hücreler yoğun şekilde 100mm'lik kültür plakalarına ekildikten 24 saat sonra kontrol grubu ve doz uygulanan plakalar 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve proteaz inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu plakalara eklenerek hücre kaldırıcı (cell scraper) yardımıyla hücre lizatları toplanmıştır.

Hücre lizatındaki peletler sonikatör yardımıyla parçalanarak 30 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüj yardımıyla 10.000g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı yeni ependorflara aktarılmış ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

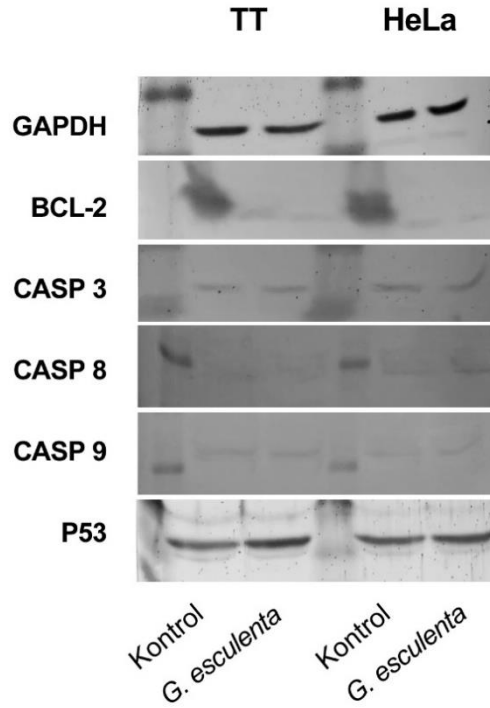
Elde edilen örneklerin protein miktarını tayin etmek için Materyal ve Metot kısmında verildiği şekilde BCA test kiti kullanılmıştır. Standartlar ve tüp içi seri dilüsyonlar ile 96 kuyucuklu plakalara yüklenen örnekler 30 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyuculu bir spektrofotometrede 562nm'de (OD<sub>562</sub>) ölçülmüştür (Şekil 3.119).



Şekil 3.119: Bilinen farklı konsantrasyonlardaki protein numunelerinin standart eğri grafiği.

### 3.7.4 Apoptoz İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerinin Western-blot Yöntemi ile Belirlenmesi

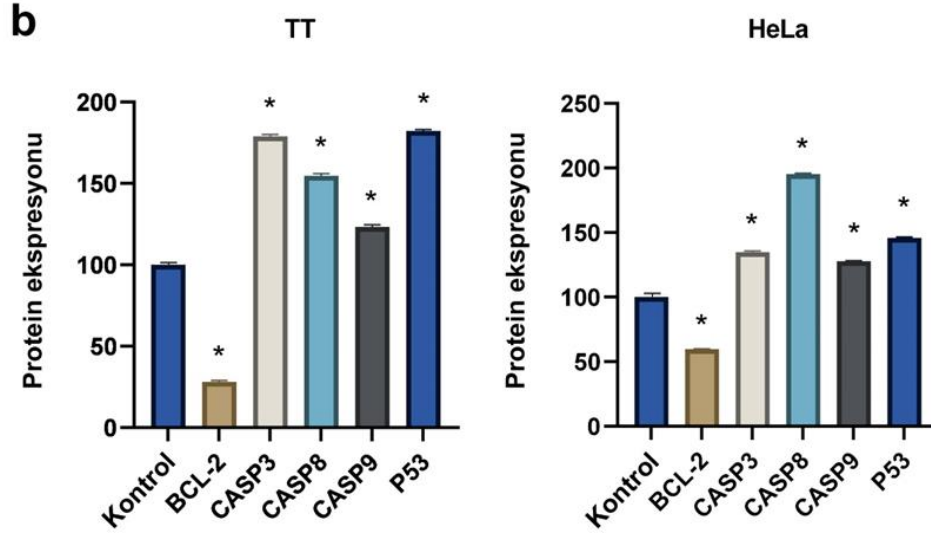
Çalışmada aktivitesi en yüksek olan örnek *G. esculenta* polisakkariti için TT ve HeLa hücre hatları üzerinde kontrol gruplarıyla beraber 72 saatlik etkin doz (EC50) uygulamasının ardından apoptoz yolları ile ilişkili BCL-2, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 protein seviyelerindeki değişimler Western-blot yöntemiyle incelenmiştir (Şekil 3.120).



**Şekil 3.120:** *G. esculenta* polisakkaritinin EC50 dozu uygulaması sonrasında TT ve HeLa hücre hattında apoptotik proteinlerden BCL-2, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 protein seviyelerine etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir.

*G. esculenta* polisakkarit ekstraktı uygulanan TT ve HeLa hücre hattında BCL-2 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde sırasıyla %67 ve %44 azalış gözlemlenmiştir. Caspase 3 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda ise protein seviyesinde *G. esculenta* uygulaması yapılan TT ve HeLa hücrelerinde sırasıyla %78 ve %35 artış tespit edilmiştir. Caspase 8 protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda ise TT ve HeLa hücrelerinde sırasıyla %49 ve %95 artış tespit edilmiştir. Ayrıca, Caspase 9 protein seviyesinde TT ve HeLa hücrelerinde sırasıyla %24 ve %27 artış tespit edilmiştir. Son olarak, P53 protein

bantlarının densitometrik analizi sonucunda TT ve HeLa hücrelerinde sırasıyla %81 ve %46 artış tespit edilmiştir (Şekil 3.121).

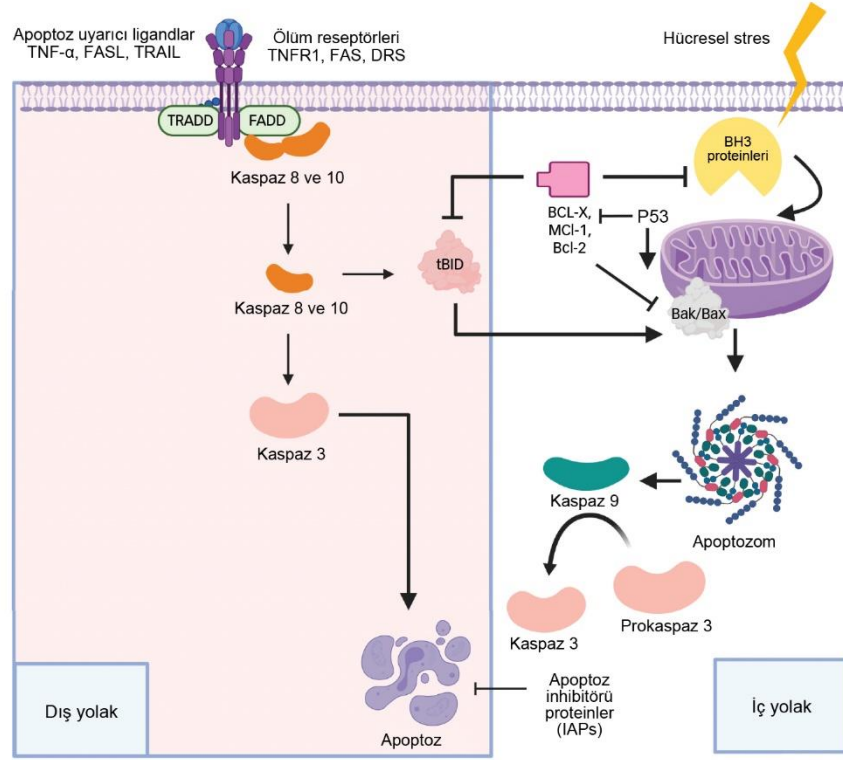


**Şekil 3.121:** *G. esculenta* polisakaritinin TT ve HeLa hücre hattında western-blot yöntemi sonrası protein bantlarının densitometrik analizi. Kontrol değerleri 100 olarak alınmıştır. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

Son zamanlarda, terapötik etkilerinden (antikanser, antimikrobiyal, antidiyabetik, antioksidan gibi) dolayı mantarlara büyük ilgi duyulmakta ve çok sayıda yeni biyoaktif bileşik izole edilmektedir (Kim ve diğ. 2015, Zhang ve diğ. 2020). *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Schizophyllum*, *Lactarius* ve *Albatrellus* ise antikanser özellikleri yoğun şekilde çalışılan cinslerden sadece bazılarıdır (Patel ve Goyal 2012).

Apoptoz ise, doğal bir ölüm mekanizması olması sebebiyle antikanser tedavileri için umut verici bir hedefdir (Pistritto ve diğ. 2016, Preffer ve Singh 2018). Hem içsel hem de dışsal yollar, yüzlerce proteinin bölünmesi yoluyla apoptozu gerçekleştirmek için kaspazları kullanır. Kanserde, apoptotik yol tipik olarak, antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1) aşırı ekspresyonu ve proapoptotik proteinlerin (Bax, Bak, BID, Kaspaz 3, 8 ve 9) yetersiz ekspresyonu dahil olmak üzere çok çeşitli yollarla inhibe edilir (Şekil 3.122). Bu değişikliklerin çoğu, en yaygın antikanser tedavisi olan kemoterapiye karşı içsel dirence neden olmaktadır.

Umut verici yeni antikanser tedavileri, apoptotik yolu aktive ederek antikanser aktivite sergileyen bitki veya mantar kaynaklı bileşiklerdir (Scott ve Athena 2000, Fulda ve Debatin 2006, Pistritto ve diğ. 2016).



**Şekil 3.122:** Apoptoz sinyal yolağı. Bansal ve diğ. (2021)'den uyarlanmıştır.

Wong ve arkadaşlarının yenilebilir bir mantar olan *P. tuber-regium* gövde ve miselyumundan ekstrakte ettikleri suda çözünür polisakkaritlerin *in vitro* anti-proliferatif aktivitelerini incelediği çalışmada, ekstraktların sitotoksik etkileri ortaya konulmuştur. Her iki polisakkarit ekstraktının da Bax/Bcl-2 oranında bir artışla HL-60 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wong ve diğ. 2007). *T. versicolor* mantarının polisakkaritinin, insan hepatoma kanseri (QGY) hücre hatları üzerinde ve *in vivo* çalışmalarla düşük konsantrasyonlarda (20 µg/mL) proliferasyonu engellediği gösterilmiştir. Yapılan analizlerde gösterilen apoptoz ve bu hücrelerde tedavi sonrasında hücre döngüsü ile ilgili genlerin (p53, Bcl-2 ve Fas) ekspresyonundaki azalma, *T. versicolor* polisakkaritinin kanser tedavisinde potansiyel bir aday olabileceğini göstermektedir (Cai ve diğ. 2010). Başka bir çalışmada ise *P. ostreatus*'tan elde edilen polisakarit özütünün, HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri indüklediğini gösterilmiştir (Lavi ve diğ. 2006).

Çalışmamızda kullandığımız *G. esculenta* HWEP polisakkaritinin HeLa ve TT hücre hattı üzerindeki etkileri imaj sitometrisi sonuçlarına göre %10'un üzerinde apoptotik hücre yoğunluğu tespit edilmiştir. Bununla beraber apoptoz ilişkili genlerin mRNA seviyelerinde Bax/Bcl-2 oranları yükselirken kaspazların da gen ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde *A. flettii* HWEP polisakkaritinin MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatları üzerinde imaj sitometrisi analizleri sonunda sırasıyla %19 ve %13 oranında apoptotik hücre oranı tespit edilmiştir. Gerçek Zamanlı PZR çalışmalarında da Bax/Bcl-2 oranının arttığı hesaplanmıştır. EC50'sini hesapladığımız ve sitotoksosite çalışmalarında en etkili polisakkarit ekstraktı olan *G. esculenta* HWEP'in western-blot analizleri sonucunda Bcl-2 protein ekspresyonunun HeLa ve TT hücrelerinde sırasıyla 1,68 ve 3,44 kat azaldığı, bunun yanı sıra kaspazların protein ekspresyonunun da arttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışmamızdaki mantar ekstraktlarının apoptozu hem iç hem de dış yolak üzerinden indüklediği farklı yaklaşımlarla gösterilmiştir.

Literatürde belirtilen bulgularla kendi çalışmamızda araştırdığımız mantar polisakkaritlerinin farklı kanser hücreleri üzerinde araştırılan apoptoz sonuçları benzer etkileri ortaya koymakta ve mantar polisakkaritlerinin apoptotik potansiyelini desteklemektedir.

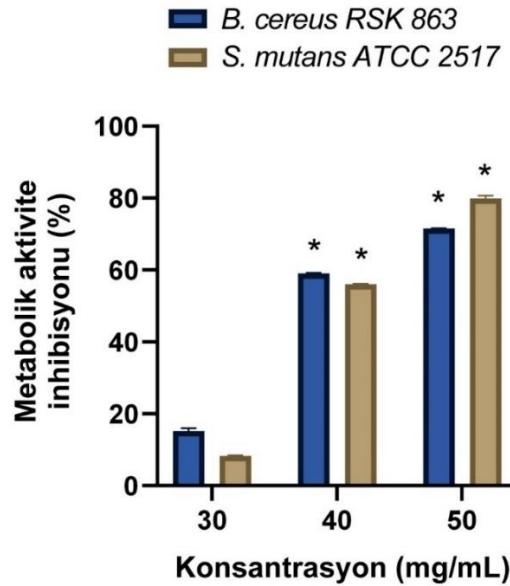
### **3.8 Antibiyofilm Aktivite Analizleri**

#### **3.8.1 Polisakkaritlerin Biyofilm İnhibisyon Etkisi**

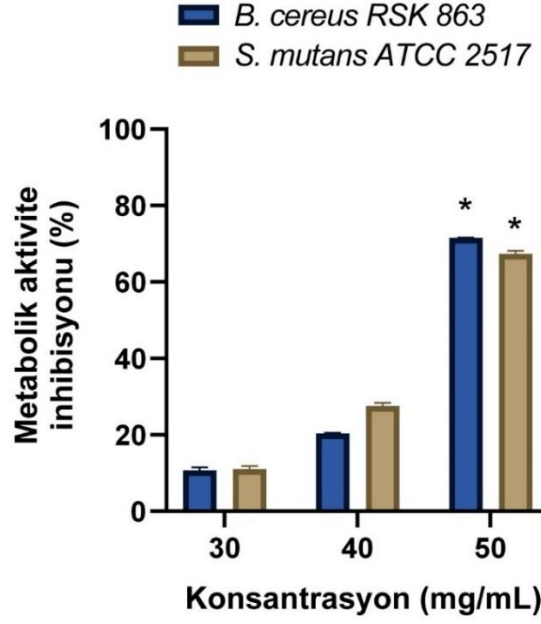
Tez çalışmasında yer alan *G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP polisakkarit örnekleri, 96 kuyucuklu plakada geliştirilen mikroorganizmalar üzerinde farklı (10-50 mg/mL) konsantrasyonlarda ve sürelerde (24, 48, 72 ve 96 saat) XTT metodu ile metabolik aktivite inhibisyonu test edilmiştir. Metabolik aktivite inhibisyonu antibiyofilm etki olarak tanımlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre, test edilen konsantrasyonlarda polisakkarit örneklerinin çalışmada kullanılan mayalar (*C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* RSKK 665, *C. glabrata* (klinik izolat), *C. krusei* ATCC 22019) üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Patojen bakteriler arasında sadece *B. cereus* RSKK 863 ve *S. mutans* ATCC 2517 biyofilmine karşı inhibisyon etki tespit

edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer patojen bakterilerin (*S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 10536, *B. pumilus* NRRL-BD-142, *E. faecalis* ATCC 19433 ve *P. aeruginosa* PA01) mantar polisakkaritlerinin test edilen konsantrasyon aralığında dirençli oldukları gözlenmiştir.

*G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP örneklerinin *Bacillus cereus* RSKK 863 ve *Streptococcus mutans* ATCC 2517 bakterilerinin 96 saatlik biyofilm oluşumunu, polisakkaritlerin konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibe etmiştir. Bakterilerin metabolik aktivitelerindeki inhibisyonu da polisakkaritlerin test edilen konsantrasyonlarında da farklılık göstermiştir. Diğer bir deyişle, *G. esculenta* HWEP örneği *Bacillus cereus* RSKK 863 (40 mg/mL için %59, 50 mg/mL için %69) ve *Streptococcus mutans* ATCC 2517 (50 mg/mL için %57 ve 50 mg/mL için %79) suşları üzerinde 40 ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında etkili olurken (Şekil 3.123), *A. flettii*'nin aynı suşlar üzerinde sadece 50 mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu 40 mg/mL konsantrasyonda metabolik aktiviteye herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. *A. flettii* polisakkariti, *B. cereus* RSKK 863 bakteri biyofilminin %72'sini inhibe ederken, *S. mutans* ATCC 2517 biyofilminin ise %65'ini inhibe etmiştir (Şekil 3.124).



**Şekil 3.123:** *G. esculenta* polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (30, 40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında *B. cereus* ve *S. mutans* bakterilerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkisi. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 3.124:** *A. flettii* polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (30, 40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında *B. cereus* ve *S. mutans* bakterilerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkisi. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0,05$ ).

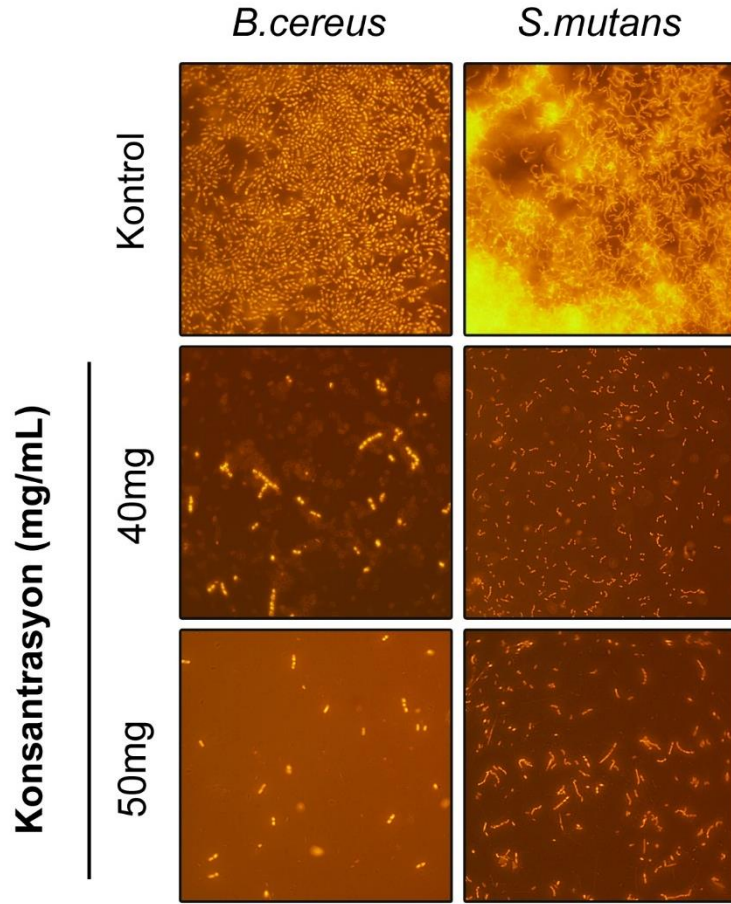
### 3.8.2 Biyofilm İnhibisyonunun Floresan Mikroskopla Analizi

*G. esculenta* HWEP ve *A. flettii* HWEP polisakkarit örneklerinin en iyi antibiyofilm aktivite gösterdikleri konsantrasyonları (*G. esculenta* için 40 ve 50 mg/mL, *A. flettii* için 50 mg/mL) kullanılarak, polisakkarit ile muamele edilmiş ve edilmemiş *B. cereus* RSKK 863 ve *S. mutans* ATCC 2517 bakteriyel biyofilm yapıları SyberGreen ve Propidyum iyodür (PI) boya ile boyanmış ve farklı filtreler (yeşil ve mavi) kullanılarak floresan mikroskop altında incelenmiştir.

Polisakkarit örneği ile muamele edilmemiş kontrol grubunda bakteri biyofilm yapısında hücreler topluluklar şeklinde olup, hücrelerin birbirleriyle bağlantılı oldukları ve hücre-hücre iletişiminin yoğun olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunun aksine, *G. esculenta* HWEP ile 96 saat muamele edilen bakteri biyofilm oluşumlarında her iki suş için de önemli derecede azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.125). Üstelik *Bacillus cereus* bakterisinin kontrol grubunda gözlenen spor formunun da polisakkarit muamelesinden sonra görülmediği ve hatta sporülasyonda gecikmeler tespit edilmiştir. Ayrıca hücreler arasındaki bağlantıların koptuğu, yer yer hücre bütünlüğünün bozulduğu da dikkati çekmiştir. Mikroskop analizlerimizde, canlı hücre (vegetatif



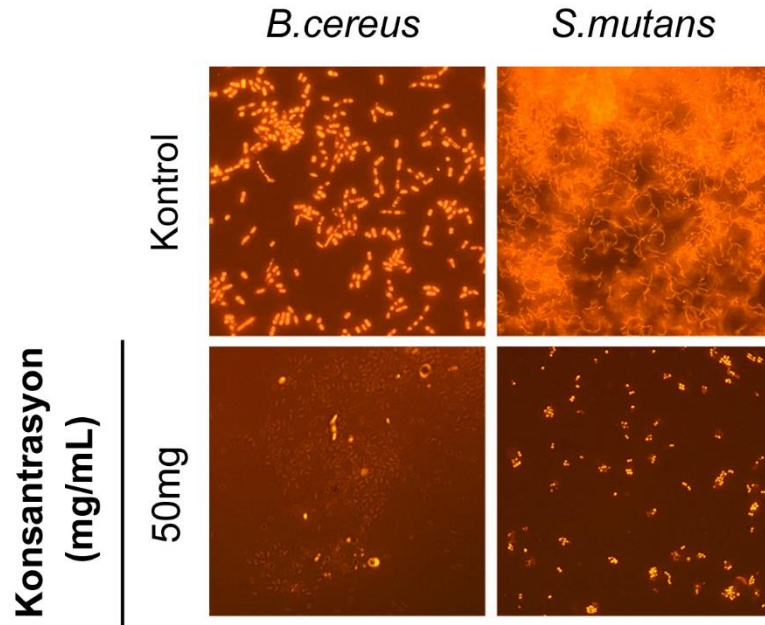
formlar) sayısında azalma, ölü hücre sayısında artış ve boş spor mantosunun (kılıf) kontrole göre belirgin derecede olduğu dikkati çekmiştir. Aynı zamanda, konsantrasyon artışıyla birlikte gerek hücre sayısı gerekse boş spor mantosu görüntüsü azalmış, 40 mg/mL'lık uygulamaya göre 50 mg/mL uygulanan örneklerde hücreler arasındaki organizasyonun daha fazla bozulduğu görülmüştür (Şekil 3.125).



**Şekil 3.125:** *G. esculenta* polisakkaritinin 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda (40 ve 50 mg/mL) uygulanması sonrasında *B. cereus* ve *S. mutans* bakterilerinin kontrol ve doz gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri.

Benzer şekilde, 96 saatlik inkübasyonun ardından polisakkarit örneği ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki bakteri biyofilm yapısı yoğun ve sıkı bir görüntü verirken, *A. fletii* HWEP polisakkaritinin 50 mg/mL konsantrasyonda uygulaması sonrasında biyofilm topluluklarının azaldığı, canlı hücre sayısının azaldığı ve ölü hücre sayısında artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.126).

Hücreden hücreye iletişimin veya başka bir deyişle hücreler arası sinyalleşmenin, biyofilm oluşumu ve yapısında önemi büyüktür. Çünkü biyofilmin gücü, etkili bir hücreler arası iletişimle sağlanabilir. Bunun için de bakterilerin komşularına yakın konumda olmaları ve bir EPS matriks içerisinde sıkı kümelenme şeklinde yer almaları gerekir. Çalışmamızda mantar polisakkarit muamelesi sonrasında bakteri hücreleri arasındaki özellikle EPS matriksindeki dağılıma ile birlikte mikrokoloni yapıların azaldığı hatta yok olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda da hücre-hücre etkileşiminin azaldığı ve buna bağlı olarak kontrole kıyasla hücre kümelenmelerinin olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar bize, mantar polisakkaritlerinin bakteriyel EPS üretim gen bölgesini etkilemiş olabileceği ve belki de çoğunluğu algılama (quorum sensing) mekanizmasını inhibe edici bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür. Bu olası etkiler, detaylı gen çalışmalarıyla araştırılmalıdır.



**Şekil 3.126:** *A. flettii* polisakkaritinin 50 mg/mL uygulaması sonrasında *B. cereus* ve *S. mutans* bakterilerinin kontrol ve doz gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri.

Literatüre göre mantarlar genellikle gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilemektedir. Tüm mantarlar arasında *L. edodes* en çok çalışılan türdür ve hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı geniş bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. *Pseudoplectania nigrella* (Pers.) Fuckel'den elde edilen

plektasin peptit gram pozitif bakterilere karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip iken, *Leucopaxillus albissimus* (Peck) Singer'den izole edilen 2-aminokinolin, gram negatif bakterilere karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Alves ve diğ. 2012).

*Agaricus silvicola* (Vittadini) Peck'den elde edilen metanolik ekstraktın *B. cereus*'a karşı antibakteriyel etkisi (MIC = 5 µg/mL) gösterilmiş ve ampisilinden daha düşük (MIC = 6.25 µg/mL) olduğu raporlanmıştır (Barros ve diğ. 2008). *L. edodes* ekstraktının ise diş çürümesinde önemli rol oynayan *S.s mutans* suşu üzerinde güçlü şekilde antibakteriyel etki gösterdiği (Hirasawa ve diğ. 1999, Signoretto ve diğ. 2011) daha önce gösterilmiştir.

Çalışmamızda, *G. esculenta* ve *A. flettii* örneklerinin *B. cereus* ve *S. mutans* bakterileri üzerindeki etkilerini floresan görüntüleri ile kıyasladığımızda her iki örneğin de bakteriyel biyofilme karşı etkili olduğu görülmektedir. Bilindiği üzere biyofilm yapının matriksini oluşturan yapı bakteriyel lipopolisakkarittir. Bakteriyel polisakkarit matriks, mikroskop altında bulutsu form şeklinde gözlenmektedir. Özellikle, diş çürüğü lezyonlarında sık rastlanan ve çürük oluşumunda etiyolojik faktör olarak kabul edilen *S. mutans* suşunun kontrol grubunda gözlenen bulutsu formun (bakteriyel LPS) her iki mantar polisakkarit uygulaması sonrasında da tümüyle kaybolduğu tespit edilmiştir.

Çalışılan mantarların farklı bakteri suşlarına karşı antibiyofilm potansiyeli, literatürdeki çalışmaları destekler niktelikte olup mevcut antimikrobiyal ajanlara yeni alternatifler kazandırmanın yanı sıra tarım, gıda veya ilaç endüstrisinde uygulamalar ile sentetik kimyasallara alternatifler oluşturmak için faydalı olabilir.

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mantarlar, bol miktarda nutrasötik ve aktif bileşik içermektedir. Yüksek protein, düşük yağ ve kalori içerikleri gibi besinsel önemleri ile iyi bilinen fonksiyonel gıdalardır. Mantarlar, çok sayıda biyoaktif madde içerdiklerinden dolayı hepatoprotektif, bağışıklık güçlendirici, antikanser, antimikrobiyal, antiviral ve antidiyabetik ajanlar olarak büyük potansiyele sahiptir. Ayrıca oksidatif hasarı azaltmada yararlı olan doğal antioksidanların önde gelen kaynaklarıdır. Bununla birlikte, potansiyellerine rağmen, mantarlardan biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, dört farklı mantardan elde edilen sekiz farklı polisakkarit ekstraktı, sekiz İnsan kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik ve apoptotik potansiyelini araştırmak için çalışılmıştır. Kanser hücrelerine karşı güçlü aktivite gösteren örnekler ile LPS ile indüklenen mürin makrofaj hücre hattı (RAW 264.7) üzerinde antienflamatuvar özellikleri de araştırılmıştır. Ek olarak, yedi bakteri ve dört maya hücresi üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri gerçekleştirmek için sekiz polisakkarit özütünden, sitotoksikite çalışmalarıyla ilişkilendirilerek en iyi aktiviteye sahip örnekler seçilmiştir.

Polisakkarit ekstraktlarından beş tanesi, kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir. Bunlar arasında, *Gyromitra esculenta* HWEP ve *Albatrellopsis flettii* HWEP örnekleri MIA-PaCa-2, TT, HeLa, MDA-MB-231 ve HepG2 hücre canlılığı üzerinde iyi bir inhibisyon sergilemiştir. Bu ekstraktların farklı hücre hatları üzerindeki etkinliği, mantar polisakkaritlerinin, antitümör aktivite potansiyelini göstermektedir.

Sekiz mantar polisakkaritinin yedi bakteri suşuna karşı antibakteriyel aktivitesinin sonuçları, Gram negatif bakterilerin mantar polisakkaritlerine karşı daha dirençli olduğunu gösterdi. *G. esculenta* ve *A. flettii*'den ekstrakte edilen polisakkaritler, *Bacillus cereus* ve *Streptococcus mutans*'in metabolik aktivasyonunu inhibe ederken, çoğalmalarını, organize olmaları ve biyofilm oluşturmalarını engelledi. Bu çalışma, *G. esculenta* ve *A. flettii*'den izole edilen polisakkaritlerin bakterilere karşı antibiyofilm aktiviteye sahip olduğunu ortaya koyan ilk çalışmadır. Antibakteriyel aktivitenin saptanmasında, büyük moleküler ağırlığa sahip

polisakkaritlerin agar içinde yeterince dağılmaması nedeniyle disk difüzyon yönteminden daha güvenilir olduğu için mikrodilüsyon yöntemi tercih edilmiştir.

Polisakkaritlerin bu tür bir aktivite göstermesi için moleküler ağırlığın yanı sıra hidroksil grup içeriği, monosakkarit bileşenleri, pozisyon ve glikozidik bağlantı türü gibi fizikokimyasal faktörler de önemlidir. Teorik olarak, bakterilerin konakçının hücre yüzeyindeki şekerlere bağlanması enfeksiyonu başlatabileceğinden, aksine, antibakteriyel aktiviteye sahip bazı polisakkaritler bakteri hücrelerine bağlanarak onları yok etmek için biyokimyasal reaksiyonları indükleyebilir. Polisakkaritlerin bu işlevi, insan bağışıklık sistemi tarafından da kullanılabilir. Polisakkaritler yabancı moleküller olarak kabul edildiğinden, kanser hücrelerine karşı immün yanıtı tetikleyebilir ve mücadele için tanıma sürecinde önemli bir rol oynayabilir. Polisakkaritler kullanılarak antibakteriyel mekanizmaların açıklığa kavuşturulması, bu polisakkaritlerin antikanser yeteneğinin mekanizmasının da anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada antikanser, antiinflamatuvar ve antibiyofilm aktiviteleri gösterilen mantarların, apoptozu indüklediği ve dolayısıyla potansiyel antitümör bileşikleri içerebileceği gösterilmiştir. Aynı şekilde, biyofilm oluşturan bakteriler üzerinde de spesifik antibiyotik ajanların keşfi için umut vaadeden sonuçlar alınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda içerdikleri biyoaktif maddeler, spesifik antibiyotikler ve yan etki insidansı düşük ilaçlar geliştirmek için karakterize edilebilir. Bu nedenle, çalışmada yer alan mantar polisakkaritlerinin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarını genişleterek, detaylı şekilde araştırılması gerekmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Abel, G., Szöllösi, J., Chihara, G., Fachel, J., "Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: a flow cytometric study", *Int J Immunopharmacol*, (6), 615-21, (1989).
- Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J., Castillo, C., "Oxidative stress index (OSI) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period", *Animal*, 7(8), 1374-78, (2013).
- Adebayo, E.A., Oloke, J.K., Ayandele, A.A., Adegunlola, C.O., "Phytochemical, antioxidant and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius*", *J Microbiol Biotech Res.*, 2 (2), 366-74, (2012).
- Adebayo, E.A., Oloke, J.K., Majolagbe, O.N., Ajani, R.A., Bora, T.C., "Antimicrobial and anti-inflammatory potential of polysaccharide from *Pleurotus pulmonarius*", *Afr J Microbiol Res.*, 6 (13), 3315-23, (2012).
- Aida, F.M.N.A., Shuhaimi, M., Yazid, M., Maaruf, A.G., "Mushroom as a potential source of prebiotics: a review", *Trends Food Sci. Technol*, 20, 567–75, (2009).
- Aires de Sousa, M., de Lencastre, H., "Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA", *J Clin Microbiol.*, 41 (8), 3806-15, (2003).
- Akata, I., Altuntas, D., Kabaktepe, S., "Fungi Determined In Ankara University Tandoğan Campus Area (Ankara-Turkey)," *Trak. Univ. J. Nat. Sci.*, 20 (1), 47-55, (2019).
- Akata, I., Keskin, E., Sahin, E., "Molecular characterization of a new mitovirus hosted by the ectomycorrhizal fungus *Albatrellopsis flettii*", *Arch. Virol.*, 166 (12), 3449-54, (2021).
- Alcoceba, E., Mena, A., Cruz Pérez, M., Ruiz de Gopegui, E., Padilla, E., Gil, J., Ramírez, A., Gallegos, C., Serra, A., Pérez, J.L., Oliver, A., "Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Majorcan hospitals: high prevalence of the epidemic clone EMRSA-15", *Clin Microbiol Infect.*, 13(6), 599-605, (2007).
- Alcon, A., Fàbregas, N., Torres, A., "Hospital-acquired pneumonia: etiologic considerations", *Infect Dis Clin North Am.*, 17 (4), 679-95, (2003).
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., (Eds.) *Introductory mycology*, New York: Wiley, (1996).
- Alli, H., Isiloglu, M., Solak, M.H., "Macrofungi of Aydın Province", *Mycotaxon*, 99, 163-65, (2007).

- Altuntas, D., Sahin, E., Kabaktepe, S., Alli, H., Akata, I., "Albatrellopsis flettii, A New Genus for Turkish Albatrellaceae", *KSU J. Agric Nat.*, 24 (4), 815-19, (2021).
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M., "A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds", *Planta Medica*, 78, 1707-18, (2012).
- Anusiya, G., Gowthama, P.U., Yamini, N.V., Sivarajasekar, N., Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., "A review of the therapeutic and biological effects of edible and wild mushrooms", *Bioengineered*, 12(2), 11239-68, (2021).
- Babior, B.M., Woodman, R.C., "Chronic granulomatous disease", *Semin. Hematol.*, 27, 247-59, (1990).
- Baeva, E., Bleha, R., Lavrova, E., Sushytskyi, L., Čopíková, J., Jablonsky, I., Klouček, P., Synytsya, A., "Polysaccharides from Basidiocarps of Cultivating Mushroom *Pleurotus ostreatus*: Isolation and Structural Characterization", *Molecules*, 24 (15), 2740, (2019).
- Bansal, R., Sagar, R., Han, W.D., Kumar, S.K., "Modulation of Apoptosis Pathways in the Biology and Treatment of Multiple Myeloma.", *Oncology & Haematology*, (2021).
- Barad, A.A., "British Columbian Wild Mushrooms as Potent Source of Novel Natural Anti-Cancer Compounds" Ph.D. Thesis, University of Northern British Columbia, Prince George, BC, Canada, (2017).
- Barbosa, J.R., de Carvalho, J.R.N., "Polysaccharides obtained from natural edible sources and their role in modulating the immune system: Biologically active potential that can be exploited against COVID-19", *Trends Food Sci Technol.*, 108, 223-35, (2021).
- Barbosa, J.R., dos Santos, F.M.M., da Silva, M.L.H., de Carvalho, J.R.N., "Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp. new extraction techniques biological activities and development of new technologies", *Carbohydrate Polymers*, 229, 115550, (2020).
- Barrett, F.F., McGehee, R.F., Finland, M., "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations", *N Engl J Med.*, 29, 279 (9), 441-8, (1968).
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R., "Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals", *Food Chem Toxicol.*, 46, 2742-47, (2008).
- Basnet, B.B., Liu, L., Bao, L., Liu, H., "Current and future perspective on antimicrobial and anti-parasitic activities of *Ganoderma* sp.: an update", *Mycology*, 24, 8 (2), 111-124, (2017).

- Bergendiova, K., Tibenska, E., Majtan, J., "Pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation, cellular immune response and respiratory tract infections in athletes", *Eur J Appl Physiol.*, 111 (9), 2033-40, (2011).
- Berteli, M.B.D., Barros, L., Reis, F.S., Ferreira, I.C.F.R., Glamočlija, J., Soković, M., Valle, J.S.D., Linde, G.A., Ruiz, S.P., Colauto, N.B., "Antimicrobial activity, chemical composition and cytotoxicity of *Lentinus crinitus* basidiocarp", *Food Funct.*, 12 (15), 6780-92, (2021).
- Boh, B., "Ganoderma lucidum: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs", *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.*, 8, 255-87, (2013).
- Borchers, A.T., Stern, J.S., Hackman, R.M., Keen, C.L., Gershwin, M.E., "Mushrooms, tumors, and immunity", *Proc Soc Exp Biol Med.*, 221 (4), 281-93, (1999).
- Boudjeko, T., Megnekou, R., Woguia, A.L. et al., "Antioxidant and immunomodulatory properties of polysaccharides from *Allanblackia floribunda* Oliv stem bark and *Chromolaena odorata* (L.) King and H.E. Robins leaves", *BMC Res Notes*, 8, 759, (2015).
- Breitenbach, J., Kränzlin, F., "Fungi of Switzerland, *Verlag Mykologia*, 2-3, (1991).
- Brekhman, I. I., *Man and biologically active substances*. New York: Pergamon Press, (1980).
- Brown, G.D., Gordon, S., "Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity", *Immunity*, 19(3), 311-15, (2003).
- Brown, G.D., Gordon, S., "Immune recognition of fungal beta-glucans", *Cellular Microbiology*, 7, 471-79, (2005).
- Cai, X., Pi, Y., Zhou, X., Tian, L., Qiao, S., Lin, J., "Hepatoma cell growth inhibition by inducing apoptosis with polysaccharide isolated from Turkey tail medicinal mushroom, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae)", *Int J Med Mushr*, 12, 257-63, (2010).
- Cao, X., Liu, J., Yang, W., Hou, X., Li, Q., "Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo", *Molecular Medicine Reports*, 12, 2383-89, (2015).
- Carvalho, A.M., Barata, A.M., "Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications" John Wiley & Sons; New York, NY, USA. The consumption of wild edible plants; pp. 159-98, (2017).
- Castillo, T.A., Lemos, R.A., Pereira, J.R.G., Alves, J.M.A., Teixeira, M.F.S., "Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of *Pleurotus* Species (Agaricomycetes)," *Int J Med Mushrooms*, 20 (2), 191-200, (2018).



- Chang, C.J., Lin, C.S., Lu, C.C., Martel, J., Ko, Y.F., Ojcius, D.M., Tseng, S.F., Wu, T.R., Chen, Y.Y., Young, J.D., Lai, H.C., "Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota", *Nat Commun.*, 8, 16130, (2017).
- Chang, S., "World Production of Cultivated Edible and Medicinal Mushrooms in 1997 with Emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, in China", *Int. J. Med. Mushrooms*, 1, 291-300, (1999).
- Chang, S., Miles, G.P., "Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effects and Environmental Impact", Boca Raton, FL: *CRC Press*, (2004).
- Chang, S.T., Wasser, S.P., "The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health", *Int. J. Med. Mushrooms*, 12, 14 (2), 95–134, (2012).
- Chen, L., Shao, H.J., Su, Y.B., "Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses", *Int Immunopharmacol*, 4 (3), 403-9, (2004).
- Chen, S.Y., Ho, K.J., Hsieh, Y., Wang, L.T., Mau, J.L., "Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia", *LWT Food Sci. Technol.*, 47, 274–78, (2012).
- Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S., Wang, S.Y., "Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells", *Life Sciences*, 60, 2349-59, (1997).
- Chen, Z.G., Bishop, K.S., Tanambell, H., Buchanan, P., Quek, S.Y., "Assessment of In Vitro Bioactivities of Polysaccharides Isolated from *Hericium Novae-Zelandiae*", *Antioxidants (Basel)*, 8, 8 (7), 211, (2019).
- Cheng, J.H., Tsai, C.L., Lien, Y.Y., Lee, M.S., Sheu, S.C., "High molecular weight of polysaccharides from *Hericium erinaceus* against amyloid beta-induced neurotoxicity", *BMC Complement Altern Med.*, 7, 16, 170, (2016).
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Shiio, T., Suga, T., Takasuka, N., Sasaki, T., "Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. Cancer detection and prevention", *Int. Soc. for Prev. Oncology, Inc*, 1, 423-43, (1986).
- 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*", *Cancer Res.*, 30, 2776–81, (1970).
- Chijioke, O., Münz, C., "Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation", *Front Immunol.*, 4, 365, (2013).

- Cho, W.C. Supportive cancer care with Chinese medicine. Springer, pp1-8, (2010).
- Cory, G., "Scratch-wound assay.", *Methods Mol Biol.*, 769, 25-30, (2011).
- Daba, A.S., Ezeronye O.U., "Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms", *Afr. J. Biotechnol.*, 2, 272–78, (2003).
- Daikh, A., Segueni, N., Dogan, N.M., Arslan, S., Mutlu, D. Kivrak, I., Akkal, S., Rhouati, S., "Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis", *J. Apic. Res.*, 61 (2), 233-45, (2020).
- Dalmo, R.A., Bogwald, J., "Beta-glucans as conductors of immune symphonies", *Fish Shellfish Immunol.*, 25, 384-96, (2008).
- Dart, R.C., "Mushrooms", *Medical toxicology*, Philadelphia: Williams & Wilkins., 1719-35, (2004).
- Di, Lu. "Ancient Chinese People's Knowledge of Macrofungi during the Period from 220 to 589", *Asian Sci Technol Med.*, 37, 36-68, (2013).
- Ding, X., Liu, Y., Hou, Y., "Structure identification and biological activities of a new polysaccharide isolated from *Lyophyllum decastes* (Fr.) Sing.", *Phcog Mag.*, 18, 112-20, (2022).
- Drori, A., Shabat, Y., Ben, Y.A., Danay, O., Levanon, D., Zolotarov, L., Ilan, Y., "Extracts from *Lentinula edodes* (Shiitake) Edible Mushrooms Enriched with Vitamin D Exert an Anti-Inflammatory Hepatoprotective Effect", *J Med Food.*, 19 (4), 383-9, (2016).
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., " Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumour escape", *Nature Immunology*, 3 (11), 991-98, (2002).
- Ergonul, P.G., Ergonul, B., Kalyoncu, F., Akata, I., "Fatty Acid Compositions of Five Wild Edible Mushroom Species Collected from Turkey", *Int. J. Pharmacol.*, 8 (5), 463-66, (2012).
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., Sabotic, J., "Proteins of higher fungi- From forest to application", *Trends Biotechnol.*, 30, 259-73 (2012).
- Ey, P.L., Ashman, L.K., "The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures", *Methods Enzymol.*, 121, 497-509, (1986).
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V., "Antioxidants in wild mushrooms", *Curr. Med. Chem.*, 16, 1543-1560, (2009).
- Ferreira, I.C.F.R., Heleno, S.A., Reis, F.S., Stojkovic, D., Queiroz, M.J., Vasconcelos M.H., Sokovic M., "Chemical features of *Ganoderma polysaccharides*

- with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities", *Phytochemistry*, 114, 38-55, (2015).
- Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., Martins, A., "Compounds from wild mushrooms with antitumor potential", *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 10, 424-436, (2010).
- Figueiredo, L., Régis, W.C.B., "Medicinal mushrooms in adjuvant cancer therapies: an approach to anticancer effects and presumed mechanisms of action", *Nutrire*, 42, 28, (2017).
- Finimundy, T.C., Gambato, G., Fontana, R., "Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity", *Nutrition Research*, 33 (1), 76–84, (2013).
- Fortes, R.C., Recôva, V.L., Melo, A.L., Novaes, M.R.C.G., "Effects of dietary supplementation with medicinal fungus in fasting glycemia levels of patients with colorectal cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study", *Nutr. Hosp.*, 23, 591-98, (2008).
- Franken, N., Rodermond, H., Stap, J. et al., "Clonogenic assay of cells in vitro", *Nat Protoc.*, 1, 2315–19 (2006).
- Franz, G., "Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concept", *Planta medica*, 55, 6, (1989).
- Friedl, P., Bröcker, E.B., "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix", *Cell Mol Life Sci.*, 20, 57 (1), 41-64, (2000).
- Friedl, P., Wolf, K., "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms", *Nat Rev Cancer.*, 3(5):362-74, (2003).
- Fulda, S., Debatin, K.M., "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy", *Oncogene*, 25, 4798–4811, (2006).
- Gallo, G., Puglia, A.M., "Antibiotics and Resistance: A Fatal Attraction", In *Antibiotics* (eds C.O. Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti and C.L. Pon), (2013).
- Gao, W., Sun, Y., Chen, S., Zhang, J., Kang, J., Wang, Y., Wang, H., Xia, G., Liu, Q., Kang, Y., "Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice", *Vaccine*, 26, 31 (18), 2273-80, (2013).
- Garibay-Orijel, R., Caballero, J., Estrada-Torres, A., Cifuentes, J., "Understanding cultural significance, the edible mushrooms case", *J. Ethnobiol. Ethnomedicine*, 3, 4, (2007).
- Gualerzi, C.O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C.L., "Antibiotics: Targets, mechanisms and resistance", John Wiley & Sons: New Jersey, (2013).
- Guerra, D.C.M., Azevedo, T.C., de Souza, M.C., Rego, L.A., de Dantas, J., Silva, F.R., "Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of  $\beta$ -glucan-rich extract

from *Geastrum saccatum* mushroom”, *Int Immunopharmacol.*, 7 (9), 1160–69, (2007).

Gunawardena, D., Bennett, L., Shanmugam, K., King, K., Williams, R., Zabaras, D., Head, R.O.L., Gyengesi, E., Münch, G., "Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  activated murine macrophages", *Food Chem.*, 1, 148, 92-6, (2014).

Gupta, S., Kunti, S., Chatterjee, S., Dutta, S., Nath, S., Das, H.N., "Oxidative stress index as a biochemical parameter in major depressive disorder", *Asian J. Med. Sci.*, 7 (5), 31-5 (2016).

Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J., Abankwa, D., "ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays", *PLoS One*, (2014).

Halliwell, B., "Free radicals and antioxidants – quo vadis?", *Trends Pharmacol. Sci.*, 32, 125-130, (2011).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine (Eds.). Oxford University Press: Oxford, (2015).

Han, Z.H., Ye, J.M., Wang, G.F., "Evaluation of in vivo antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides", *Int J Biol Macromol.*, 52, 66-71, (2013).

Hassan, M.A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T.W., Tiralongo, J., "Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease", *Int J Mol Sci.*, 16 (4), 7802-38, (2015).

Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C. et al., "An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms", *Complement. Ther. Clin. Pract.*, 15, 5-7, (2009).

Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A.M., Grinde, B., "Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer", *Scand J Immunol.*, 68 (4), 363-70, (2008).

Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Kvalheim, G., "The mushroom *Agaricus blazei* Murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation”, *Adv. Pharmacol. Sci.*, (2011).

Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., Takada, K., "Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom)", *Int J Antimicrob Agents*, 11, 151-57, (1999).

Hung, P.V., Nhi, N.N.Y., "Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam”, *Int. Food Res. J.*, 19 (2), 611–15, (2012).

- Hwang, J.H., Kim, K.J., Ryu, S.J., Lee, B.Y., "Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish", *Chem Biol Interact.*, 25, 248, 1-7, (2016).
- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., Fukuoka, F., "Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms", *Cancer Res.*, 29, 734–5, (1969).
- Ina, K., Kataoka, T., Ando, T., "The use of lentinan for treating gastric cancer", *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 13, 681-88, (2013).
- Iwabuchi, K., Nakayama, H., Hanafusa, K., "Lactosylceramide-enriched microdomains mediate human neutrophil immunological functions via carbohydrate-carbohydrate interaction", *Glycocon J.*, 39 (2), 239-246, (2022).
- Jacome, P.R., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C., Maciel, M.A., "Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil", *Rev Soc Bras Med Trop.*, 45 (6), 707-12, (2012).
- Janeway, Jr, C.A., Medzhitov, R., "Innate immune recognition", *Annu. Rev. Immunol.*, 20 (1), 197-216, (2002).
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S.S.M., Xu, B., "A critical review on the impacts of  $\beta$ -glucans on gut microbiota and human health", *J Nutr Biochem.* 61, 101-10, (2018).
- Jiang, J., Sliva, D., "Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells", *Int. J. Oncol.*, 37, 1529-36, (2010).
- Jiang, Y., Wong, J.H., Fu, M., Ng, T.B., Liu, Z.K. et al., "Isolation of adenosine, isosinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*", *Phytomedicine*, 18, 189-93, (2011).
- Jonkman, J.E., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini M.E. et al., "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy", *Cell Adh Migr.*, 8 (5), 440-51, (2014).
- Jonkman, J.E., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini, M.E., Amon, J.E., Stevens, K.M., Colarusso, P., "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy", *Cell Adh Migr.*, 8 (5), 440-51, (2014).
- Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., Yang, L.V., "In vitro cell migration and invasion assays", *J Vis Exp.*, 1, (88), 51046, (2014).
- Kalac, P., Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms. Nova Science Publisher, In S. Andres & N. Baumann (Eds.), *Mushrooms: Types, properties and nutrition*, 130-51, (2012).

- Kalyoncu, F., Oskay, M., Saglam, H., Erdogan, T.F., Tamer, A.U., "Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species", *J Med Food.*, 13 (2), 415-19, (2010).
- Kanagasabapathy, G., Kuppusamy, U.R., Abd, M.S.N., Abdulla, M.A., Chua, K.H., Sabaratnam, V., "Glucan-rich polysaccharides from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer prevents glucose intolerance, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet", *BMC Complement Altern Med.*, 21, 12, 261, (2012).
- Kardosová, A., Machová, E., "Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides", *Fitoterapia*, 77 (5), 367-73, (2006).
- Khinsar, K.H., Abdul S., Hussain A., Ud Din R., Lei L. et al., "Anti-tumor effect of polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* on H22 mouse Hepatoma ascites in-vivo and hepatocellular carcinoma in-vitro model", *AMB Express.*, 2, 11 (1), 160, (2021).
- Kim, C.S., Oh, J.Y., Choi, S.U., Lee, K.R., "Chemical constituents from the roots of *Cynanchum paniculatum* and their cytotoxic activity", *Carbohydr Res.*, 381, 1-5, (2013).
- Kim, G.Y., Roh, S.I., Park, S.K., Ahn, S.C., Oh, Y.H., Lee, J.D., Park, Y.M., "Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*", *Biol Pharm Bull.*, 26 (10), 1418-23, (2003).
- Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C. et al., "Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- $\kappa$ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells", *Eur. J. Pharmacol.*, 545, 192–99, (2006).
- Kim, H.G., Yoon, D.H., Lee, W.H., Han, S.K., Shrestha, B., Kim, C.H., Lim, M.H., Chang, W., Lim, S., Choi, S., et al., "*Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage", *J. Ethnopharmacol*, 114, 307–15, (2007).
- Kim, S.H., Jakhar, R., Kang, S.C., "Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomes fomentarius* in human lung carcinoma cell line", *Saudi J Biol Sci.*, 22 (4), 484-90, (2015).
- Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljević, D., Zizak, Z., Pavlović, V., Levic, S., Niksic, M., Van Griensven, L.J., "Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*", *Food Res. Int.*, 67, 272–83, (2015).
- Kokoshis, P.L., Williams, D.L., Cook, J.A., Di Luzio, N.R., "Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan", *Science*, 199, 1340–42, (1978).

Kosanic, M., Ranković, B., Dašić, M., "Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents", *Iran J Pharm Res.*, 11(4):1095-102, (2012).

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljević, D., Helsper, J.P., Van Griensven, L.J., "Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*", *Food Chem.*, 129, 1667-75, (2011).

Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 15, 227 (5259), 680-85, (1970).

Lamaison, J.L., Polese, J.M., "The Great Encyclopedia of Mushrooms", HF Ullmann, Königswinter, Germany. 49, (2008).

Lau, H.Y., Tang, J., Casey, P.J., Wang, M., "Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is critical for malignant transformation and tumor maintenance by all RAS isoforms", *Oncogene*, 36, 3934-42, (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 Lett.*, 244, 61-70, (2006).

Lee, H.H., Park, H., Sung, G.-H., Lee, K., Lee, T. et al., "Anti-influenza effect of *Cordyceps militaris* through immunomodulation in a DBA/2 mouse model", *J. Microbiol.*, 52, 696-701, (2014).

Lee, K.R., Lee, J.S., Lee, S., Son, Y.K., Kim, G.R. et al., "Polysaccharide isolated from the liquid culture broth of *Inonotus obliquus* suppresses invasion of B16-F10 melanoma cells via AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway", *Mol Med Rep*, 14, 4429-35, (2016).

Leekha, S., Terrell, C.L., Edson, R.S., "General principles of antimicrobial therapy", *Mayo Clin Proc.*, 86 (2), 156-67, (2011).

Lemieszek, M., Rzeski, W., "Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class", *Cont. Oncology*, 16, 285, (2012).

Lemieszek, M.K., Cardoso, C., Nunes, F.H.F.M., Barros, A.I., Marques, G., Pozarowski, P., Rzeski, W., "*Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells", *Food & Function*, 4, 575-85, (2013).

Li, H., Zhang, M., Ma, G., "Hypolipidemic effect of the polysaccharide from *Pholiota nameko*", *Nutrition*, 26 (5), 556-62, (2010).

Li, M., Liu, Y., Zhang, H., Liu, Y., Wang, W. et al., "Anti-cancer Potential of Polysaccharide Extracted From *Polygonatum sibiricum* on HepG2 Cells via Cell Cycle Arrest and Apoptosis", *Front. Nutr.*, 9, 938290, (2022).

- Li, W.J., Nie, S.P., Liu, X.Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.Y., "Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*", *Food Chem. Toxicol.*, 50, 689-94, (2012).
- Liang, Z.Q., Wang, X.X., "The regulation effect of polysaccharopeptide PSP on human peripheral lymphocyte proliferation and T lymphocyte subpopulation", *Advanced Research in PSP*, (1996).
- Liao, S.F., Liang, C.H., Ho, M.Y., Hsu, T.L., Tsai, T.I., Hsieh, Y.S. et al., "Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes", *Proc Natl Acad Sci.*, 20, 110 (34), 13809-14, (2013).
- Lima, C.U., Cordova, C.O., Nóbrega, O.T., Funghetto, S.S., Karnikowski, M.G., "Does the *Agaricus blazei* Murill mushroom have properties that affect the immune system? An integrative review", *J Med Food.*, 14 (1-2), 2-8, (2011).
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H., Jülich, W.D., "The pharmacological potential of mushrooms", *Evid. -based Complement. Altern. Med.*, 2, 285-99, (2005).
- Linnakoski, R., Reshamwala, D., Veteli, P., Cortina-Escribano, M., Vanhanen, H., Marjomäki, V., "Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications", *Front Microbiol.*, 2, 9:2325, (2018).
- Lovy, A., Knowles, B., Labbe, R., Nolan, L., "Activity of Edible Mushrooms Against the Growth of Human T4 Leukemic Cancer Cells, HeLa Cervical Cancer Cells, and *Plasmodium falciparum*", *J. Herbs Spices Med. Plants*, 6, 49-57, (2000).
- Lucas, E.H., "Tumor inhibition in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes", *Antibiotic Chemotherapy*, 7, 1-15, (1957).
- Manna, D.K., Mandal, A.K., Sen, I.K., Maji, P.K., Chakraborti, S., Chakraborty, R., Islam, S.S., "Antibacterial and DNA degradation potential of silver nanoparticles synthesized via green route", *Int J Biol Macromol.*, 80, 455-9, (2015).
- Martin, T.A., Ye, L., Sanders, A.J., et al., "Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective [online]", (21 Sep 2022), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700>, (2013).
- Matamoros-Recio, A., Franco-Gonzalez, J.F., Forgione, R.E., Torres-Mozas, A., Silipo, A., Martín-Santamaría, S., "Understanding the Antibacterial Resistance: Computational Explorations in Bacterial Membranes", *ACS Omega*, 6 (9), 6041-54, (2021).
- McKnight, K.H., McKnight, V.B., *A Field Guide to Mushrooms*, North America, Boston, Houghton Mifflin, (1998).
- Mena, K.D., Gerba, C.P., "Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water", *Rev Environ Contam Toxicol.*, 201, 71-115, (2009).



- Michelot, D., Toth, B., "Poisoning by *Gyromitra esculenta*--a review.", *J Appl Toxicol.*, 11 (4), 235-43, (1991).
- Mizuno, T., "Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi", *Foods Food Ingred J Jpn.*, 167, 69-85, (1996).
- Mizuno, T., "The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan", *Int J Med Mushrooms*, 1, 9-29, (1999).
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T., Kawagishi, H., "Antitumor-active substances from mushrooms", *Food Rev. Int.*, 11, 1, 23-61, (1995).
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A., "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)", *Int. Immunopharmacol.*, 7 (6), 701-724, (2007).
- Motta, F., Gershwin, M.E., Selmi, C., "Mushrooms and immunity", *J Autoimmun.*, 117, 102576, (2021).
- Mueller, W.E.G., Weiler, B.E., Charubala, R., Pfleiderer, W. et al., "Cordycepin analogs of 2',5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase", *Biochemistry*, 30, 2027–33, (1991).
- Munz, C., Steinman, R.M., Fujii, S., "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity", *Experimental medicine*, 202, 203–207, (2005).
- Murphy, E.J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N.J., Laffey, J.G., "β-Glucan Metabolic and Immunomodulatory Properties and Potential for Clinical Application", *J Fungi (Basel)*, 6 (4), 356, (2020).
- Mustafa, F., Chopra, H., Baig, A.A., Avula, S.K., Kumari, S., Mohanta, T.K., Saravanan, M., Mishra, A.K., Sharma, N., Mohanta, Y.K., "Edible Mushrooms as Novel Myco-Therapeutics: Effects on Lipid Level, Obesity and BMI", *J Fungi (Basel)*, 8 (2), 211, (2022).
- Ohta, Y., Lee, J.B., Hayashi, K., Fujita, A., Park, D.K., Hayashi, T., "In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans", *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10194–199, (2007).
- Oliveira, R.S., Biscaia, S.M.P., Bellan, D.L., Viana, S.R.F. et al., "Structure elucidation of a bioactive fucomannogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*", *Carbohydrate Polymers*, 225, 115203 (2019).
- Opige, M., Kateyo, E., Kabasa, J.D., Olila, D., "Antibacterial activity of extracts of selected indigenous edible and medical mushrooms of eastern Uganda", *Int J of trop med.*, 1, 111–6, (2006).

Ovodov, Y.S., "Bioglycans and natural glycosides as a promising research topic in bioorganic chemistry", *Acta Naturae*, 2 (2), 28–36, (2010).

Padilha, M.M., Avila, A.A.L, Sousa, P.J.C., Cardoso, L.G.V., Perazzo, F.F., Carvalho, J.C.T., "Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill)", *J. Med. Food*, 359-64, (2009).

Pandimeena, M., Prabu, M., Sumathy, R., Kumuthakalavalli, R., "Evaluation of phytochemicals and in vitro antiinflammatory, anti-diabetic activity of the white oyster mushroom, *Pleurotus florida*", *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 5 (1), 16-21, (2015).

Papetti, A., Signoretto, C., Spratt, D.A., Pratten, J., Lingström, P., Zaura, E., Ofek, I., Wilson, M., Pruzzo, C., Gazzani, G., "Components in *Lentinus edodes* mushroom with anti-biofilm activity directed against bacteria involved in caries and gingivitis", *Food Funct.*, 20, 9 (6), 3489-99, (2018).

Patel, S., Goyal, A., "Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review", *3 Biotech*, 2, 1-15 (2012).

Peralta, G., Sánchez, M.B., Garrido, J.C., "Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia", *J Antimicrob Chemother.*, 60, 855–63, (2007).

Pfeffer, C.M., Singh, A.T.K., "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy", *Int J Mol Sci.*, 2, 19 (2), 448, (2018).

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., "Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health", *Int. J Biomed Sci Eng.*, 4, 89-96, (2008).

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G., "Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies", *Aging (Albany NY)*, 8 (4), 603-19, (2016).

Qu, J., He, Y., Shi, Y., Gai, L., Xiao, L., Peng F., Li, Z., Wang, X., Yuan, C., "Polysaccharides derived from *Balanophora polyandra* significantly suppressed the proliferation of ovarian cancer cells through P53-mediated pathway", *J Cell Mol Med.*, 24 (14), 8115-25, (2020).

Rasmussen, L.T., Seljelid, R., "Novel immunomodulators with pronounced in vivo effect caused by stimulation of cytokine release", *J Cell Biochem.*, 46, 60-8, (1991).

Reis, F.S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I.C., "Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples", *Food Chem Toxicol.*, 50, 1201-07, (2012).

Ren, L., Hemar, Y., Perera, C., Lewis, G., Krissansen, G.W., Buchanan, P.K., "Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms", *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.*, 3, 41-51, (2014).

- Reverberi, M., Fabbri, A.A., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Fanelli, C., "Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 207-15, (2005).
- Ribeiro, B., de Pinho, P.G., Andrade, P., Baptista, P., Valentão, P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study", *Microchem. J.*, 93, 29-35, (2009).
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Cordero, R.J., Casadevall, A., "Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties", *Front Microbiol.*, 2, 171, (2011).
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P., "The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence", *J. Funct. Foods*, 4, 687, (2012).
- Russell, A.D., "Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems", *J Hosp Infect.*, 43, 57-68, (1999).
- Ruthes, A.C., Smiderle, F.R., Iacomini, M., "Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects", *Carbohydr Polym*, 136, 358-75, (2016).
- Sahin, C., Mutlu, D., Nasirli, F., Mahmoudi, G., Zubkov, I.F., Arslan, S., Dogan, N.M., "New iridium bis-terpyridine complexes: synthesis, characterization, antibiofilm and anticancer potentials", *Biometals*, 34, 701-13, (2021).
- Sahin, E, Keskin, E, Akata, I., "Molecular characterization of a novel partitivirus hosted by the false morel mushroom *Gyromitra esculenta*", *Arch. Virol.*, 166 (4), 1247-51, (2021).
- Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A.C., Aldars-García, L., Reglero, G., Soler-Rivas, C., "Antiviral activities of boletus edulis, pleurotus ostreatus and lentinus edodes extracts and polysaccharide fractions against herpes simplex virus type 1", *J. Food Nutr. Res.*, 51, 225–35, (2012).
- Schepetkin, I.A., Quinn, M.T., "Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential", *Int. Immunopharmacol.*, 6, 317-33, (2006).
- Schneider, C., Rasband, W., Eliceiri, K., "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nat Methods*, 9, 671–75 (2012).
- Scott, W.L., Athena, W.L., "Apoptosis in cancer", *Carcinogenesis*, 21, 3, 485-95, (2000).
- Scuderi, P., "Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME)", *J. Immunol.*, 143, 168-73, (1989).

- Sevindik, M., Bal, C., "Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative Activities of Wild Mushroom, *Laeticutis cristata* (Agaricomycetes), from Turkey", *Int J Med Mushrooms*, 23 (11), 85-90, (2021).
- Shiao, M.S., "Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions" *Chem Rec.*, 3 (3), 172-80, (2003).
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Marchi, A., Grillenzoni, M., Cavalleri, G. et al., "Testing a low molecular mass fraction of a mushroom (*Lentinus edodes*) extract formulated as an oral rinse in a cohort of volunteers", *J Biomed Biotechnol.*, (2011).
- Singh, A.K., Pandey, P., Tewari, M., Pandey, H.P., Gambhir, I.S., Shukla, H.S., "Free radicals hasten head and neck cancer risk: A study of total oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade", *J Postgrad Med.*, 62 (2), 96-101, (2016).
- Singh, S.S., Wang, H., Chan, Y.S., Pan, W., Dan, X., Yin, C.M., Akkouch O., Ng T.B., "Lectins from edible mushrooms", *Molecules*, 20 (1), 446-69, (2014).
- Song, K.S., Li, G., Kim, J.S., Jing, K., Kim, T.D. et al, "Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis and alters Wnt/ $\beta$ -catenin in SW480 human colon cancer cells", *BMC Cancer.*, 22, 11, 307, (2011).
- Suabjakyong, P., Saiki, P., Van Griensven, L.J.L.D., Higashi, K., Nishimura, K., Igarashi, K., Toida, T., "Polyphenol extract from *Phellinus igniarius* protects against acrolein toxicity in vitro and provides protection in a mouse stroke model", *PLoS One*, 10:e0122733, (2015).
- Sullivan, R., Smith, J.E., Rowan, N.J., "Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine", *Perspectives in Biology and Medicine*, 49, 159-70, (2006).
- Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J., "Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity", *Carbohydr. Polym.*, 76, 548-56, (2009).
- Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., Ohno, N., "NMR characterization of the structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*", *Carbohydrate research*, 342 (17), 2611-18, (2007).
- Takezawa, K., Pirazzoli, V., Arcila, M.E., Nebhan, C.A., Song, X., et al. "HER2 Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in EGFR-Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site EGFR T790M Mutation", *Cancer Discov.*, 2, 922-33, (2012).

- Tang, Q.J., Zhang, J.S., Pan, Y.J., Werner, R., Fan, H., "Activation of mouse macrophages by the alkali-extracted polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum*", *Chin J Cell Mol Immunol.*, 20, 142-44, (2004).
- Tao, Y., Zhang, L., Cheung, P.C., "Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides", *Carbohydr Res.*, 341 (13), 2261-9., (2006).
- Tel, G., Ozturk, M., Duru, M.E., Turkoglu, A., "Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents", *Pharm. Biol.*, 53, 824-30, (2015).
- Tenover, F.C., "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria", *Am J Med.*, 119(6), 3, 10, 62-70, (2006).
- Tomasi, S., Lohézic-Le, D.F., Sauleau, P., Bézivin, C., Boustie, J., "Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines", *Pharmazie*, 59 (4), 290-3, (2004).
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., "Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians", 65 (2), 87-108, (2015).
- Trinchieri, G., "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity", *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 133-46, (2003).
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K., "Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill.", *Food Chemistry*, 101, 267-73, (2007).
- Tzianabos, A.O., "Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function", *Clinic Microbiol Rev.*, 13 (4), 523-33, (2000).
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84, (2007).
- Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O., "Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life", *Int. J. Microbiol.*, 14, (2015).
- Varaporn, C., Suttipun, K., Jean, G.L., Alejandra, M.L., Jean-Marc, C., Wasaporn, C., "Action modes of the immune modulating activities of crude mushroom polysaccharide from *Phallus atrovolvatus*", *Bioact. Carbohydr.*, 23, (2020).
- Vaz, J.A., Heleno, S.A., Martins, A., Almeida, G.M., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I.C.F.R., "Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines", *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2881-84, (2010).

- Verbeken, A., "Worldwide systematics of *Lactarius*: a state of art.", *Micol. Vegetazione Mediterr.*, 16 (1), 71-88, (2001).
- Vetvicka, V., Vetvickova, J., "Combination of glucan, resveratrol and vitamin C demonstrates strong anti-tumor potential", *Anticancer Res.*, 32 (1), 81-7, (2012).
- Wakshull, E., Brunke-Reese, D., Lindermuth, J., Fisette, L., Nathans, R.S., Crowley, J.J., Tufts, J.C., Zimmerman, J., Mackin, W., Adams, D.S., "PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor", *Immunopharmacology*, 41 (2), 89-107, (1999).
- Wang, G.Y., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito H., Mayuzum, H., "Antitumor active polysaccharides from the Chinese Mushroom Songshan Lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 894-900, (1993).
- Wang, H., Ng, T.B., Liu, Q., "Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*", *Peptides*, 25, 693-96, (2004).
- Wang, L.M., Cravo, O.H.T., Cecchini, M., "Impact of vaccination on carriage of and infection by antibiotic-resistant bacteria: a systematic review and meta-analysis", *Clin Exp Vaccine Res.*, 10 (2), 81-92, (2021).
- Wang, M., Kanako, N., Zhang, Y., Xiao, X., Gao, Q., Tetsuya K., "A unique polysaccharide purified from *Hericiium erinaceus* mycelium prevents oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human gastric mucosa epithelium cell", *PLoS One*, 12 (7), (2017).
- Wang, X.M., Zhang, J., Wu, L.H., Zhao, Y.L., Li, T., Li, J.Q., Wang, Y.Z., Liu, H.G.A., "Mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wildgrown mushroom from China", *Food Chem.*, 151, 279–85, (2014).
- Wasser, S.P., "Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 1323-32, (2011).
- Wasser, S.P., "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides", *Appl Microbiol Biotechnol.*, 60, 258-74 (2002).
- Wasser, S.P., Weis, A.L., "Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives", *Int. J. Med. Mushrooms*, 1, 31-62, (1999).
- Watanabe, K., Shuto, T., Sato, M., et al., "Lucidenic acids-rich extract from antlered form of *Ganoderma lucidum* enhances TNF $\alpha$  induction in THP-1 monocytic cells possibly via its modulation of MAP kinases p38 and JNK", *Biochem Biophys Res Commun.*, 408, 1, 18, (2011).

- WHO., "Antimicrobial Resistance [online]", (11 September 2022), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (2022).
- Wong, S.M., Wong, K.K., Chiu, L.C.M., Cheung, P.C.K., "Non-starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-reginum* inhibited the growth of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction", *Carbohydr Polym*, 68, 206-217, (2007).
- Wu, J., Zhou, J.X., Lang, Y.G., Yao, L., Xu, H., Shi, H.B., Xu, S.D., "A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms", *Int. J. Biol. Macromol.*, 51, 663-67, (2012).
- Yadomae, T., Ohno, N., "Structure-activity relationship of immunomodulating (1→3)-beta-d-glucans", *Rec. Res. Dev. Chem. Pharm. Sci.*, (1996).
- Yang, W.J., Pei, F., Shi, Y., Zhao, L.Y., Fang, Y., Hu, Q.H., "Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes*", *Carbohydrate Polymers*, 88, 474-80, (2012).
- Yang, Z., Pan, Y., Chen, J., Zhang, H., Wei, H., Wu, Z., Liu, L., "Anti-inflammatory, anti-oxidative stress effect of *Phascolosoma esculenta* oligosaccharides on *Escherichia coli*-induced sepsis mice", *Food Sci Biotechnol.*, 28 (6), 1871-1879, (2019).
- Yaqoob, A, Li, W.M., Liu, V., Wang, C., Mackedenski, S., Tackaberry, L.E., Massicotte, H.B., Egger, K.N., Reimer, K., Lee, C.H., "Grifolin, neogrifolin and confluentin from the terricolous polypore *Albatrellus flettii* suppress KRAS expression in human colon cancer cells", *PLoS One*, 15 (5), e0231948, (2022).
- Yasin, H., Zahoor, M., Yousaf, Z., Aftab, A., Saleh, N., Riaz, N., Shamsheer, B., "Ethnopharmacological exploration of medicinal mushroom from Pakistan", *Phytomedicine*, 15, 54, 43-55, (2019).
- Younis, A.M., Wu, F.S., El Shikh, H.H., "Antimicrobial activity of extracts of the oyster culinary medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher basidiomycetes) and identification of a new antimicrobial compound", *Int. J. Med. Mushrooms*, 17, 579-90, (2015).
- Yu, S., Weaver, V., Martin, K., Cantorna, M.T., "The effects of whole mushrooms during inflammation", *BMC Immunology*, 10, (2009).
- Yuuichi, U., Hitoshi, I., Makoto, H., "Antitumor effects of (1→3)-β-d-glucan and (1→6)-β-d-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.)", *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (1), (2000).
- Zaidman, B.Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S.P., "Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics", *Appl Microbiol Biotechnol.* 67 (4), 453-68, (2005).

- Zeng, P., Li, J., Chen, Y., Zhang, L., "The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs" *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 163, 423-44, (2019).
- Zeng, T., Zhang, Q., Yu, X., Gao, X., Qiu, Y., "Inhibition of cell migration and invasion and promotion of cell apoptosis by overexpression of programmed cell death 4 (PDCD4) in cervical cancer Siha cells", *Int J Clin Exp Pathol.*, 11 (9), 4676-83, (2018).
- Zengel, P., Ramp, D., Mack, B., Zahler, S., Berghaus, A., Muehlenweg, B., Gires, O., Schmitz, S., "Multimodal therapy for synergic inhibition of tumour cell invasion and tumour-induced angiogenesis", *BMC Cancer*, 11, 10, 92, (2010).
- Zhang, L., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Smith, P.T., Ananthan, R., Longvah, T., "Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis*", *Int. J. Biol. Macromolec.*, 51 (5), 1057-62, (2012).
- Zhang, L., Koyyalamudi, S.R., Reddy, N. (Eds), Isolation, Characterization, and Biological Activities of Polysaccharides from Medicinal Plants and Mushrooms", *Stud. Nat. Prod. Chem.*, (2014).
- Zhang, L., Reddy, N., Koyyalamudi, S.R. Chapter 5: Isolation, characterization and biological activities of polysaccharides from medicinal plants and mushrooms. In: *Stud. Nat. Prod. Chem.* Atta-ur-Rahman (Ed.), Elsevier Science Publishers, Oxford, UK, (2014).
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., Wang Q., "Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity", *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 4–19, (2007).
- Zhang, Q., Du, Z., Zhang, Y., Zheng, Z., Li, Q., Wang, K., "Apoptosis induction activity of polysaccharide from *Lentinus edodes* in H22-bearing mice through ROS-mediated mitochondrial pathway and inhibition of tubulin polymerization", *Food Nutr Res.*, 21, 64, (2020).
- Zhang, T., Du, Y., Liu, X., Sun, X., Cai, E., Zhu, H., Zhao, Y., "Study on antidepressant-like effect of protoilludane sesquiterpenoid aromatic esters from *Armillaria mellea*", *Nat. Prod. Res.*, 1–4, (2019).
- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., Hu, Q., "Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *Carbohydr Polym.*, 80 (3), 783-89, (2010).
- Zhao, S., Gao, Q., Rong, C., Wang, S., Zhao Z., Liu, Y., Xu, J., "Immunomodulatory Effects of Edible and Medicinal Mushrooms and Their Bioactive Immunoregulatory Products.", *J Fungi (Basel)*, 8, 6 (4), 269, (2020).



Zheng, J., Yang, B., Yu, Y., Chen, Q., Huang, T., Li, D., “*Ganoderma lucidum* Polysaccharides Exert Anti-Hyperglycemic Effect on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Through Affecting-Cells”, *Comb Chem High Throughput Screen*, 15 (7), 542–50, (2012).

Zhou, L.B., Chen, B., “Bioactivities of water-soluble polysaccharides from Jisongrong mushroom: anti-breast carcinoma cell and antioxidant potential”, *Int J Biol Macromol*, 48 (1), 1–4, (2011).

Zhu, Y., Chen, Y., Li, Q., Zhao, T., Zhang, M., Feng, W., Takase, M., Wu, X., Zhou, Z., Yan, L., Wu, X., "Preparation, characterization, and anti-*Helicobacter pylori* activity of Bi<sup>3+</sup>-*Hericium erinaceus* polysaccharide complex", *Carbohydr Polym.*, 22, 110, 231-7, (2014).

Zimmerman, J.W., Linderath, J., Fish, P.A., Palace, G.P., Stevenson, T.T., DeMong, D.E., "A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes", *J Biol Chem.*, 21, 273 (34), 22014-20, (1998).

## Yayın Listesi

### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

S.D. Kilincarslan, C. Sahin, **D. Mutlu**, F. Nasirli, S. Arslan, N.M. Dogan. "Synthesis, Characterization, Antibiofilm and Anticancer Activity of New Ruthenium Complexes with 2,2'-Bipyridine-4,4'-Dicarboxamide". Letters in Organic Chemistry, 2022, doi: 10.2174/1570178619666220329164106

C. Yılmaz, A.O. Pirdawid, C.F. Babat, M. Konus, D. Cetin, A. Kivrak, Muheb A.S. Algso, S. Arslan, **D. Mutlu**, C. Otur, A. Kurt Kızıldogan. "A Thiophene Derivative, 2-Bromo-5-(2-(methylthio)phenyl)thiophene, Has Effective Anticancer Potential with Other Biological Properties", ChemistrySelect, 2022, doi: 10.1002/slct.202200784

R. Liman, A.N. Kursunlu, M. Ozmen, S. Arslan, **D. Mutlu**, E.S. Istifli, Y. Acikbas. "Synthesis of water soluble symmetric and asymmetric pillar[5]arene derivatives: Cytotoxicity, apoptosis and molecular docking studies", Journal Of Molecular Structure, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133482>

A. Kurt-Kızıldoğan, N. Akarsu N, Ç. Otur, A. Kivrak, N. Aslan-Ertas, S. Arslan, **D. Mutlu**, M. Konus, C. Yılmaz, D. Cetin, T. Topal, N. Sahin. "A Novel 4H-Chromen-4-One Derivative from Marine Streptomyces ovisporus S4702T as Potential Antibacterial and Anti-Cancer Agent", Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2022, 22 (2), 362-370. doi: 10.2174/1871520621666210311085748.

S. Koldas, I. Demirtas, **D. Mutlu**, M.N. Atalar, H. Ünver, Ş. Arslan. "New cytotoxic chalcone derivatives from Astragalus ponticus Pall." Natural Product Research, 2022, doi: 10.1080/14786419.2021.2012771

D. Cetin, N.D. Kızıllkan, C. Yılmaz, C. Fidan, M. Algso, E. Kavak, A.Kivrak, A. Kurt-Kızıldoğan, C. Otur, **D. Mutlu**, A.H. Abdelsalam, S. Arslan, M. Konus. "Synthesis and biological activity of new indole based derivatives as potent anticancer, antioxidant and antimicrobial agents", Journal of Molecular Structure, 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.133168

F. Nasirli, A. Daikh, N.M. Dogan, S. Arslan, **D. Mutlu**, N. Segueni. "In vitro Evaluation of Cytotoxic Activity of Algerian propolis against Human Breast Adenocarcinoma (MDA-MB-231) Cells and Investigation of its Potential Mechanism of Action", Current Bioactive Compounds, 2022, doi: 10.2174/1573407218666220510105639

**D. Mutlu**, C. Cakir, M. Ozturk, S. Arslan. "Anticancer and apoptotic effects of polysaccharide isolated from Lactarius chrysorrheus Fr. in HepG2 and PANC-1 cell lines", Archives of Biological Sciences, 2022, doi: 10.2298/ABS220803030M

E. Kavak, **D. Mutlu**, O. Ozok, S. Arslan, A. Kivrak. "Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel Artemisinin-Thymol", Natural Product Research, 2022. doi: 10.1080/14786419.2020.1865954

C. Sahin, **D. Mutlu**, F. Nasirli, G. Mahmoudi, F.I. Zubkov, S. Arslan, N.M. Dogan. "New iridium bis-terpyridine complexes: synthesis, characterization, antibiofilm and anticancer potentials", Biometals, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00307-y>

S. Arslan, K. Kocabiyik, **D. Mutlu**, G. Semiz. "Assessment of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Salvia syriaca L. in Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (Caco-2)", Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2021, 20 (3), 235-242. <https://dx.doi.org/10.22037%2Fijpr.2020.114254.14759>

C. Yilmaz, S. Arslan, **D. Mutlu**, M. Konus, A. Kayhan, A. Kurt-Kızıldogan, C. Otur, O. Ozok, A. Kivrak. "Identification of 3-Bromo-1-Ethyl-1H-Indole as a Potent Anticancer Agent with Promising Inhibitory Effects on GST Isozymes", Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2021. doi: 10.2174/1871520620666200918111940

A. Kurt-Kizildogan, C. Otur, C. Yilmaz, S. Arslan, **D. Mutlu**, A. Kivrak, M. Algso, A. Kayhan, D. Cetin, M. Konus. "Synthesis, cytotoxicity, antioxidant and antimicrobial activity of indole based novel small molecule", Letters in Drug Design & Discovery, 2021. doi: 10.2174/1570180817999201109203226

A. Daikh, N. Segueni, N.M. Dogan, S. Arslan, **D. Mutlu**, I. Kivrak, S. Akkal, S. Rhouati. "Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis", Journal of Apicultural Research, 2020. doi: 10.1080/00218839.2019.1701777

M. Konus, D. Cetin, C. Yilmaz, S. Arslan, **D. Mutlu**, A. Kurt-Kızıldogan, C. Otur, O. Ozok, M. AS Algso, A. Kivrak. "Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel thiophene-based indole derivatives as potential antibacterial, GST inhibitor and apoptotic anticancer agents", ChemistrySelect, 2020. doi: 10.1002/slct.202001523

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler**

B. Kabalay, **D. Mutlu**, S. Arslan, G. Semiz, K. Kocabiyik. 2018, Chemical composition and Cytotoxicity of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae* P. H. Davis Essential Oil Towards Colon Carcinoma. The 4th International Symposium EuroAsian Diversity. Kiev, Ukraine.

B. Kabalay, **D. Mutlu**, S. Arslan, G. Semiz, K. Kocabiyik. 2018, Essential oil composition analysis and cytotoxic activity of *Salvia frugida* Boiss. from Turkey. The 4th International Symposium EuroAsian Diversity. Kiev, Ukraine.

**D. Mutlu**, S. Arslan, B. Kabalay, G. Terzioglu, A. R. Tufekcioglu, I. Demirtas. 2018, Chemical constituent of Small Nettle (*Urtica urens*) seed oil and its cytotoxic activity. The 4th International Symposium EuroAsian Diversity. Kiev, Ukraine.

**D. Mutlu**, S. Arslan, H.Aksit, I. Demirtas. 2018, Luteolin dependent inhibition of CYP1A1: application of in vitro and in silico modeling approaches. The 4th International Symposium EuroAsian Diversity. Kiev, Ukraine.

**D. Mutlu**, S.Arslan, H. Aksit, I. Demirtas. 2015, In vitro assessment of human CYP1A1 inhibition potential of Resveratrol and Silychristin. 9th Congress of the Turkish Toxicology Society. Cesme, Turkey.

#### **Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler**

#### **Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler**

S. Arslan, **D. Mutlu**. Kanser tedavisi için arı zehri ve melittin'in terapötik potansiyeli. Atayoğlu AT, editör. Apiterapi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.212-5.

#### **Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

K. Hurkan, S. Arslan, M.N. Atalar, A. Aydin, I. Demirtas, **D. Mutlu**, B. Tabar, M.H. Alma. Trakya University Journal of Natural Sciences, 2 (22), 155-161. 2021.