

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GANODERMA LUCİDUM EKSTRAKTLARININ
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
TAMOKSİFEN VE DOKSORUBİSİN İLE
SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Doktora Tezi

Sevcan ATAY

DANIŞMAN
Prof. Dr. Handan AK

İZMİR
(2015)

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince özveri, anlayış ve sabır ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof. Dr. Handan AK'a, kendimi geliştirmem için elinden gelen çabayı gösteren, karşılaştığım her problemde yanımda olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN'a bana olan inançları ve güvenleri için sonsuz teşekkürler.

Doktora tezimde emekleri geçen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR ve Doç. Dr. Erbil KALMIŞ'a yardımları için çok teşekkür ederim. Doktora eğitimimde üzerimde emeği olan tüm E.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

İhtiyaç duyduğumda her zaman yanımda olan ve yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Ali Burak ÖZKAYA'ya, tez çalışmamda emeği geçen başta sevgili arkadaşlarım Öykü GÖNÜL ve Duygu GENÇALP olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve AREL personeline teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını her zaman yanımda olan, sevgi, hoşgörü ve ilgi ile benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam İbrahim ATAY ve kardeşlerim Mutlu ATAY ve Nilgün ALPER'e ithaf ediyorum.

2 Haziran 2015

Sevcan ATAY

ÖZET

Ganoderma Lucidum Ekstraktlarının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Tamoksifen ve Doksorubisin İle Sinerjistik Etkilerinin Araştırılması

Ganoderma lucidum, yeneyebilen bir tıbbi mantar türü olup anti-metastatik ve anti-karsinojenik etkileri ile tanınmakta ve Asya ülkelerinde alternatif ve tamamlayıcı tıpta uzun yıllardır kullanılmaktadır. Buna karşın *G. lucidum*'un meme kanseri tedavisinde tamoksifen ve doksorubisin ile kombine kullanımı hakkında bir araştırma mevcut değildir. Bu çalışmada *G.lucidum*'dan elde edilen altı farklı ekstraktın MCF-7 östrojen reseptör pozitif ve MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine olan etkileri WST-8 metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı üzerinde en etkili ekstraktın her iki hücre hattında da *G. lucidum* eter ekstraktı olduğuna karar verilmiştir. Eter ekstraktının invazyon ve migrasyon üzerine olan etkileri Boyden Chamber Assay ile değerlendirilmiştir. Bu ekstraktın MCF-7 hücre hattında hücre mobilitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı fakat MDA-MB-231 hücre hattında yüksek oranda göç eden hücre sayısını azalttığı bulunmuştur. Her iki hücre hattında da DMSO kontrol ve eter ekstraktı uygulanmış hücreler arasında invaze olan hücre sayısı açısından bir farklılık bulunmamıştır. Eter ekstraktının apoptozis ve hücre döngüsü üzerine olan etkileri akış sitometri yöntemi ile incelenmiştir. *G. lucidum* eter ekstraktının meme kanseri hücrelerinde apoptozisi anlamlı olarak tetiklediği bulunmuştur. Bunlara ek olarak, eter ekstraktı ile inkübasyon her iki hücre hattında da hücre döngüsü dinamiklerini anlamlı olarak değiştirmiştir. Ardından meme kanseri hücrelerinde eter ekstraktının tamoksifen ve/veya doksorubisin ile etkileşimleri incelenmiştir. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ve terapötikler arasındaki etkileşimler MacSynergy II yazılımı ve kombinasyon indeks analizi ile değerlendirilmiştir. Eter ekstraktı MCF-7 meme kanseri hücre hattında tamoksifen ile kombine edildiğinde tamoksifenin hücre canlılığı üzerine olan etkilerini artırmış, fakat doksorubisin'in etkisini inhibe etmiştir. *G. lucidum* eter ekstraktı MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında da doksorubisin ile antagonistik etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Ganoderma lucidum*, meme kanseri, tamoksifen, doksorubisin, MCF-7, MDA-MB-231.



ABSTRACT

Investigating synergistic effects of *Ganoderma lucidum* extracts in combination with tamoxifen and doxorubicin in breast cancer cell lines.

Ganoderma lucidum, an edible medicinal fungus, has been known with its anti-metastatic, anti-carcinogenic bioactivities and widely used in Asian countries in complementary and alternative medicine. However, there is no information regarding its combined usage with tamoxifen and doxorubicin in breast cancer treatment. In this study, effects on cell viability of six distinct extracts obtained from *G.lucidum* were assessed by WST-8 method in MCF-7 estrogen receptor positive and MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell lines. *Ganoderma lucidum* ether extract was the most effective extract on inhibition of cell viability among others in both cell lines. Ether extract was then evaluated in terms of its anti-metastatic activity using Boyden Chamber Assay. Ether extract significantly decreased the number of migrated cells in MDA-MB-231; however did not affect MCF-7 mobility. There was no difference in invaded cell number between DMSO and ether extract treated cells in both cell lines. Apoptosis and cell cycle analysis were performed by flow cytometry. We found that ether extract is capable of inducing apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Additionally, incubation with ether extract significantly changed the cell cycle dynamics in both cell lines. We then assessed the interactions between ether extract and tamoxifen citrate and/or doxorubicin in breast cancer cell lines. The interactions between *G. lucidum* ether extract and chemotherapeutics were examined by combination index analysis and MacSynergy II software. Ether extract increased the anti-proliferative effect of tamoxifen although exhibited strong antagonism with doxorubicin in MCF-7 cell line. Ether extract also showed antagonistic effect with doxorubicin in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, breast cancer, tamoxifen, doxorubicin, MCF-7, MDA-MB-231

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
GRAFİKLER DİZİNİ	X
KISALTMALAR LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	4
1.1. Meme Kanseri ve Sınıflandırması.....	4
1.2. Meme Kanserinin İmmüno-histokimyasal Sınıflandırması ve Hedefli Terapi Yöntemleri.....	5
1.3. Kanser Araştırmalarında Kullanılan Mantarlar.....	9
1.3.1. <i>Ganoderma lucidum</i> 'un Kanser Tedavisinde Kullanımı	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. <i>Ganoderma lucidum</i> ekstraktlarının hazırlanması	20
2.1.1. Preliminer Fitokimyasal Tarama.....	21
2.2.1. Hücre Kültürü Gereçleri.....	21
2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar	22
2.2.3. Hücre Kültürü Protokolleri	22
2.3. WST-8 ile Canlılık Tayini Yöntemi.....	24
2.3.1. Canlılık Tayini Gereçleri.....	25
2.3.2. Canlılık Tayininde Kullanılan Cihazlar	25
2.3.3. Canlılık Tayini Protokolü.....	25
2.4. Akış Sitometrik Yöntemler	26

2.4.1.	Akış Sitometri Yöntemlerinde Kullanılan Gereçler.....	27
2.4.2.	Akış Sitometri Yöntemlerinde Kullanılan Cihazlar.....	27
2.4.3.	Akış Sitometri ile Apoptoz Tayini	27
2.4.4.	Akış sitometri ile Hücre Yaşam Döngüsü Tayini Protokolü	28
2.5.	Migrasyon ve İnvazyon Analizi.....	28
2.5.1.	Migrasyon ve İnvazyon Analizinde Kullanılan Gereçler.....	28
2.5.2.	Migrasyon ve İnvazyon Analizinde Kullanılan Cihazlar.....	29
2.5.3.	Migrasyon ve İnvazyon Analizi Protokolü	29
2.6.	İlaç Kombinasyon Analizleri	30
2.6.1.	İlaç Kombinasyon Analizinde Kullanılan Gereçler	30
2.6.2.	İlaç Kombinasyon Analizinde Kullanılan Cihazlar	30
2.6.3.	İlaç Kombinasyon Analizi Protokolü.....	30
2.5.	İstatistiksel Analiz.....	32
3.	BULGULAR.....	33
3.1.	Canlılık Tayini Sonuçları	33
3.1.1.	<i>Ganoderma lucidum</i> Ekstratlarının MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	33
3.1.2.	<i>Ganoderma lucidum</i> Ekstratlarının MDA-MB-231 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	38
3.1.3.	MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattında Doksorubisinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	42
3.1.4.	MCF-7 Hücre Hattında Tamoksifenin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri....	43
3.2.	Akış Sitometri Analiz Sonuçları	44
3.2.1.	MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Eter Ekstraktının Apoptoz Üzerine Etkileri	44

3.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Eter Ekstraktının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri	45
3.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Apoptoz Üzerine Etkileri	47
3.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri	48
3.3. Migrasyon ve İnvazyon Analizi Sonuçları.....	50
3.3.1. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkileri	50
3.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkileri	51
3.4. İlaç Kombinasyon Analizlerinin Sonuçları	52
3.4.1. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Tamoksifen ile Kombinasyonu.	52
3.4.2. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Doksorubisin ile Kombinasyonu	55
3.4.3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Doksorubisin ile Kombinasyonu	58
3.5. <i>Ganoderma lucidum</i> Eter Ekstraktının Preliminer Fitokimyasal Tarama Sonuçları	61
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
6. KAYNAKLAR	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Mantarlardan elde edilen biyoaktif maddelerin anti-kanser etkileri.....	2
Şekil 2. Tamoksifenin moleküler yapısı.	6
Şekil 3. Doksorubisinin moleküler yapısı.	9
Şekil 4. MCF-7 hücrelerine 100µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri, DMSO kontrol ekstrakt verilen hücrelere eşit oranda DMSO uygulanan hücreleri belirtmektedir. X eksenini FITC, Y eksenini propidiyum iyodür'e ait florasana sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q1) nekrotik ya da ölü hücreleri ifade etmektedir.	44
Şekil 5. MCF-7 hücrelerine 100µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri ifade etmektedir. Grafiklerde pikler hücre sayısını ifade etmektedir. X eksenini propidiyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir.	46
Şekil 6. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri, DMSO kontrol ekstrakt verilen hücrelere eşit oranda DMSO uygulanan hücreleri belirtmektedir. X eksenini FITC, Y eksenini propidiyum iyodür'e ait florasana sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q1) nekrotik ya da ölü hücreleri ifade etmektedir.	47
Şekil 7. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri ifade etmektedir. Grafiklerde pikler hücre sayısını ifade etmektedir. X eksenini propidiyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir.	49
Şekil 8. <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı ve tamoksifen kombinasyonlarına ait %95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri (A) ve kontür pikleri (B) şeklinde gösterilmiştir. Teorik aditif yüzey (%0 beklenen inhibisyon) Bliss bağımsızlık matematik modeli'ne dayanılarak MacSynergy II yazılımı ile hesaplanmıştır. Pikler hesaplanan aditif yüzeyin (grafikte x ekseninde 0 değeri olarak gösterilmiştir) üzerinde ise sinerjizm, altında ise antagonizmi ifade etmektedir.	53
Şekil 9. <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı ve doksorubisin kombinasyonlarına ait %95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri (A) ve kontür pikleri (B) şeklinde gösterilmiştir. Teorik aditif yüzey (%0 beklenen inhibisyon) Bliss bağımsızlık matematik modeli'ne dayanılarak MacSynergy II yazılımı ile hesaplanmıştır. Pikler hesaplanan aditif yüzeyin	

(grafikte x ekseninde 0 değeri olarak gösterilmiştir) üzerinde ise sinerjizm, altında ise antagonizmi ifade etmektedir.56

Şekil 10. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ve doksorubisin kombinasyonlarına ait %95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri (A) ve kontür pikleri (B) şekilde gösterilmiştir. Teorik aditif yüzey (%0 beklenen inhibisyon) Bliss bağımsızlık matematik modeli'ne dayanılarak MacSynergy II yazılımı ile hesaplanmıştır. Pikler hesaplanan aditif yüzeyin (grafikte x ekseninde 0 değeri olarak gösterilmiştir) üzerinde ise sinerjizm, altında ise antagonizmi ifade etmektedir.59



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	35
Grafik 2. <i>Ganoderma lucidum</i> metanol ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	35
Grafik 3. <i>Ganoderma lucidum</i> etilasetat ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	36
Grafik 4. <i>Ganoderma lucidum</i> etanol ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	36
Grafik 5. <i>Ganoderma lucidum</i> su ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	37
Grafik 6. <i>Ganoderma lucidum</i> etanol-su ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	37
Grafik 7. <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	39
Grafik 8. <i>Ganoderma lucidum</i> metanol ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	39
Grafik 9. <i>Ganoderma lucidum</i> etilasetat ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	40
Grafik 10. <i>Ganoderma lucidum</i> etanol ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	40
Grafik 11. <i>Ganoderma lucidum</i> su ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	41
Grafik 12. <i>Ganoderma lucidum</i> etanol-su ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	41
Grafik 13. Doksorubisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında 48. saatte hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	42
Grafik 14. Tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücre hattında 48. saatte hücre canlılığı üzerine olan etkileri.....	43
Grafik 15. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmiştir.	45
Grafik 16. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmiştir.	46

Grafik 17. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmiştir.	48
Grafik 18. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmiştir.	49
Grafik 19. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının hücrelerin migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri.....	50
Grafik 20. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı uygulamasının hücrelerin migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri.....	51
Grafik 21: <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. Cl değerleri şu şekilde değerlendirilir: Cl <0.9: Sinerjizm, 0.9 < Cl <1,1: Aditif Etki, Cl >1,1: Antagonizm.....	54
Grafik 22: <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. Cl değerleri şu şekilde değerlendirilir: Cl <0.9: Sinerjizm, 0.9 < Cl <1,1: Aditif Etki, Cl >1,1: Antagonizm.....	57
Grafik 23: <i>Ganoderma lucidum</i> eter ekstraktı ile doksorubisin kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. Cl değerleri şu şekilde değerlendirilir: Cl <0,9: Sinerjizm, 0,9 < Cl <1,1: Aditif Etki, Cl >1,1: Antagonizm.....	60

KISALTMALAR LİSTESİ

- AKT:** Protein kinaz B
- AP-1:** Aktivatör protein 1
- CI:** Kombinasyon indeks
- C-MET:** Hepatosit büyüme faktörü
- DMSO:** Dimetilsülfoksit
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- EGDT:** ergosta-7,22-diene-2 β ,3 α ,9 α -triol
- EGF:** Epitelyal büyüme faktörü
- ER:** Östrojen reseptörü
- ERK:** Mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz 1
- Fa:** Etkilenen fraksiyon
- FBS:** Fötal sığır serumu
- FGFR:** Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
- HER:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü
- HRE:** Hormon cevap elementi
- IC₍₅₀₎:** %50 canlılık inhibisyonuna yol açan doz
- IGFR:** İnsülin büyüme faktörü reseptörü
- Kip1:** Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü 1B
- Log:** Logaritma
- MAPK:** mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz
- MDM2:** p53 bağlanma proteini MDM2
- mTOR:** Rapamisin'in mekanistik hedefi
- NADH:** Nikotinamid adenin dinükleotit
- NaOH:** Sodyum hidroksit
- NQO1:** NAD(P)H:kuinon oksidoredüktaz 1
- Nrf2:** Nükleer faktör benzeri-2
- P21:** Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü 1

P27: Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü 1B

p53: Tümör protein 53

PI3K: Fosfotidil-inozitol-3-kinaz

PR: Progesteron reseptörü

Ras: Fare sarkoma viral onkogen homologu

SOD: Süperoksit dismutaz

TKI: Tirozin kinaz inhibitörü

uPA: Ürokinaz plazminojen aktivatörü

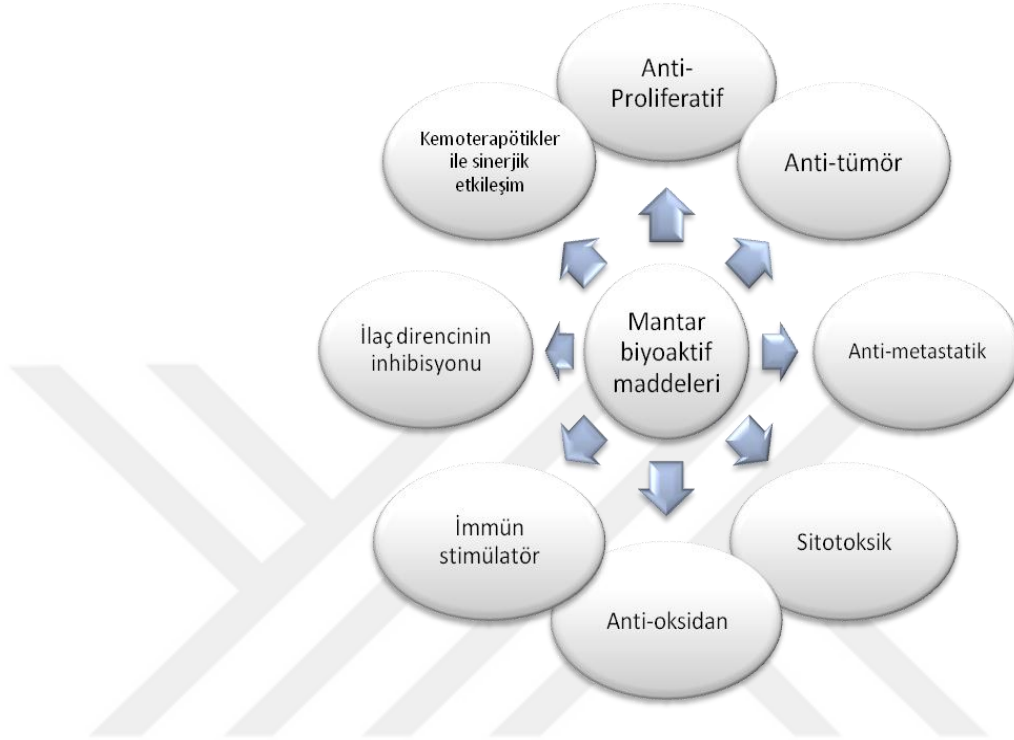
WAF-1: Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü 1

WST-8: 2-(2-metoksil-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu

1. GİRİŞ

Kanser Dünya çapında en çok ölüme sebebiyet veren hastalıklardan biridir. Günümüzde kanser tedavisi cerrahi operasyon, genel kemoterapi ve radyasyon terapisi ile gerçekleştirilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinin kanser hücrelerine spesifik olmamaları, yaşamı tehdit edici yan etkilerinin bulunması ve her hastada beklenen sonucu vermemesi nedeni ile daha etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesi amacıyla yeni anti-kanser ajanlara gereksinim giderek artmaktadır. Son yıllarda mantarlardan elde edilen birçok biyoaktif molekülün normal hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermeden kanser hücrelerini hedeflediğinin bulunması bu alana olan ilginin giderek artmasına neden olmuştur. Yapılan araştırmalar mantarlardan elde edilen anti-kanser özellikteki moleküllerin kimyasal yapılarını ortaya çıkarmıştır. Genellikle türe spesifik olan bu moleküllerin farmakolojik olarak aktif oldukları kanıtlanmıştır (1). Mantarlardan elde edilen biyoaktif maddelerin kanser tedavisinde tekil, kemoterapötiklerle veya radyasyon ile kombine olarak kullanımının hastalığın tedavisinde ve konvansiyonel terapinin yan etkilerinin azaltılmasında faydalı olduğunu belirten birçok çalışma mevcuttur (2-6). Bunlarla birlikte, bulgular bazı mantarların ticari anti-kanser ilaçlar ile sinerjik etkilerinin bulunduğunu ve ilaç direnci gelişen hastalarda etkili bir tedavi stratejisi oluşturduğunu göstermektedir (7-10).

Mantarların önemli anti-kanser özellikleri şu şekilde özetlenebilir: i) Anti-oksidan özellikleri ile onkogenezin engellenmesi, ii) Kanser hücrelerine spesifik direk sitotoksik aktivite, iii) Kanser hücrelerine karşı gelişen immün cevabın artışı, iv) Tümör metastazının engellenmesi, v) Kemoterapötiklere karşı gelişen ilaç direncinin inhibisyonu ve kemoterapötikler ile sinerjik etkileşim, vi) Kemoterapötiklerin yan etkilerinin azaltılması, vii) Kanser sebebi ile gelişen kaşeksi gibi rahatsızlıkların tedavisi, viii) Kanser hastalarının yaşam kalitelerinin ve sürelerinin artışı (11-17), (Şekil 1).



Şekil 1. Mantarlardan elde edilen biyoaktif maddelerin anti-kanser etkileri.

Ganoderma lucidum (Reishi mantarı) yüzyıllardır Kore, Japonya ve Çin’de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış, *Basidiomycetes* sınıfına dâhil olan yenebilen tıbbi bir mantar türüdür. *G. lucidum* biyolojik olarak aktif polisakkaritler, glikoproteinler, aminopolisakkaritler, proteoglikanlar ve triterpenler gibi birçok alt birimden oluşmakta ve her bir alt birimin yüksek anti-kanserojen etkilerinin olduğu günümüze değin yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır (18).

Bu çalışmada kanser tedavisinde kullanım potansiyeli taşıyan ve yeni toksik olmayan ve daha etkili anti-kanser ajanların geliştirilmesinde rol oynayabilecek *Ganoderma lucidum* tıbbi mantarının meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı, apoptoz, hücre döngüsü, migrasyon ve invazyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Bunlarla birlikte hücre canlılığının inhibisyonunda diğer ekstraktlara göre daha yüksek etki gösterdiği belirlenen *G. lucidum* ekstraktının klinikte meme kanseri tedavisinde rutin

olarak kullanılan hormon terapi ajanı tamoksifen ve bir kemoterapötik olan doksorubisin ile sinerjistik etkileşimleri incelenmiştir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Meme Kanseri ve Sınıflandırması

Meme kanseri kadınlarda major morbidite ve mortalite nedeni olan yaygın bir kanser türüdür (19). Meme kanserinin etiyolojisi ve patogenezi hala tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır. Meme kanseri sınıflandırması farklı kriterler ve amaçlar içeren şablonlar ile gerçekleştirilmektedir. En çok kullanılan majör kategoriler tümörün histopatolojik tipine, sınıfına (grade) ve belirli proteinler ile genlerin ekspresyonlarına göre düzenlenmiştir. Kanser hücre biyolojisi hakkında elde edilen bilgi arttıkça meme kanseri alt tür sayısında da artış meydana gelmektedir.

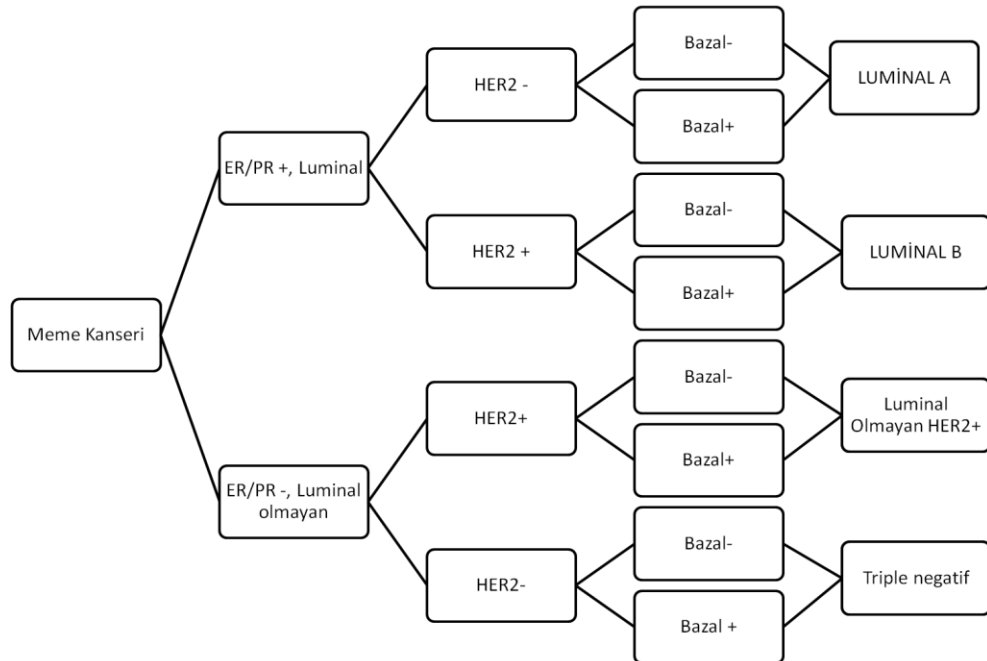
Meme kanseri sınıflandırmasının temel amacı tümör tipine en uygun tedavi stratejisini seçebilmektir. Tümör tipine spesifik tedavi stratejilerinin etkinliği yapılan randomize kontrollü denemeler ile belirlenmiştir. Bir tümör tipine yönelik geliştirilen tedavi stratejisi bir başka sınıfa ait tümörde aynı etkiyi göstermeyebilir (20). Bazı meme kanseri hücreleri oldukça agresif ve yaşamı tehdit edici karakteristik özelliklere sahiptir. Dolayısı ile bu tip özellikler taşıyan kanser türlerinin tedavisinde de oldukça agresif ve yan etkileri yüksek tedavi stratejileri kullanılmaktadır (21, 22). Diğer meme kanseri türleri ise daha düşük agresiflik göstermekte ve lumpektomi gibi agresif olmayan tedavi stratejileri ile tedavi edilebilmektedirler (23, 24).

Tedavi algoritmaları meme kanseri sınıflandırmasındaki spesifik alt sınıflara özel olarak geliştirilmiştir. Bir sınıflandırma yaklaşımı, tedavi yokluğunda genel sağkalım gibi hastalığın klinik sonlanımını tahmin edebilen ve doğruluk oranı yüksek bir prognostik faktör olmalı veya belirli bir tedavi yöntemine karşı gelişebilecek yanıtı tahmin edebilecek düzeyde etkili olmalıdır (25). Bu nedenle bir sınıflandırma yaklaşımı geliştirilirken oldukça dikkatli şekilde test edilmeli ve onaylanmalıdır.

1.2. Meme Kanserinin İmmüno-histokimyasal Sınıflandırması ve Hedefli Terapi Yöntemleri

Klinikte meme kanseri tedavi stratejisinin seçiminde genellikle temeli immüno-histokimyasal belirteçlere dayanan bir sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu yaklaşıma ek olarak inflamatuvar meme kanseri türlerinde olduğu üzere hastanın fiziksel muayenesi esnasında etkilenen memede inflamasyon görülmesi gibi bulgulardan da faydalanılmaktadır (26).

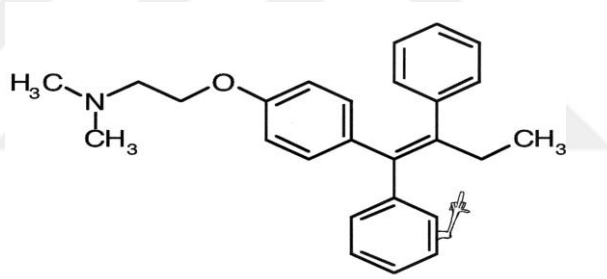
İmmüno-histokimyasal sınıflandırma ile meme kanserinin alt türlerin oluşturulmasında kanser hücrelerinin östrojen reseptörü (ER) , progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi membran reseptörlerini yüksek oranda taşımaları veya taşımamaları kanser hücrelerini karakterize etmektedir (Şekil 1) , (27).



Şekil 1. Meme kanserinin imminohistokimyasal sınıflandırması (28).

Meme kanseri alt türlerinin biyolojileri birbirlerinden farklılık göstermekte ve her alt türe özgü moleküler hedefler belirlenerek yeni, daha etkili ve spesifik terapötikler keşfedilebilmektedir. Bu terapötikler arasında spesifik hedefleri (HER1, HER2, HER3, IGF Reseptörü (IGFR), C-MET, FGF Reseptörü (FGRF)) inhibe eden tirozin kinaz inhibitörleri (TKIs), hücre içi sinyal yollarını (PI3K, AKT, mTOR, ERK) inhibe eden ajanlar, angiogenez inhibitörleri ve DNA'ya müdahale eden ajanlar yer almaktadır (29-31).

Bu terapötiklerden anti-HER2 ajanı olan transtuzumab ve anti-ER ajanı olan tamoksifen yüksek aktiviteleriyle günümüzde standart meme kanseri tedavi yöntemleri arasında yer almaktadırlar (Şekil 2), (32, 33).



Şekil 2. Tamoksifenin moleküler yapısı.

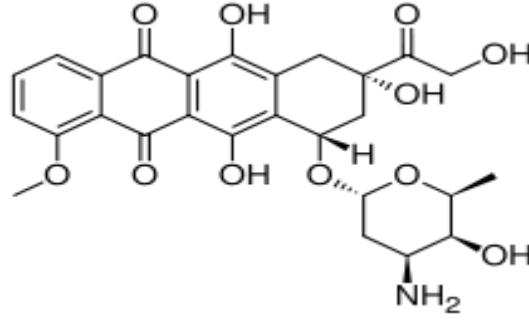
Östrojen reseptörü pozitif (ER+) tümörler meme kanseri vakalarının % 60-80'ini oluşturmaktadır (34, 35). Günümüzde meme kanserinin tedavisinde kullanılan endokrin terapileri genellikle östrojen reseptörünü baskılamaya yönelik olarak geliştirilmiştir. Östrojen reseptörünün baskılanmasında kullanılan iki tedavi stratejisi mevcuttur: i) Östrojen reseptörü ile antagonistik etki gösteren tamoksifen gibi anti-östrojenlerin kullanımı ve ii) östrojen reseptör ekspresyonunu down-regüle eden fulvestrant gibi anti-östrojenlerin kullanımı (36).

Östrojen reseptörünün farklı genler tarafından kodlanan iki farklı formu hücrelerde eksprese edilmektedir. Bu formlar ER alfa ve beta'dır. Reseptörler hormon yokluğunda genellikle sitozolde bulunmaktadırlar. Östrojen steroid yapıda bir hormon olması dolayısı ile direkt olarak fosfolipid yapıda olan hücre membranından geçebilir ve reseptörüne bağlanabilir. Reseptöre hormon bağlanması reseptörün sitozolden nukleusa translokasyonu ile başlayan bir dizi olayı tetiklemektedir. Hormon tarafından aktive olan reseptör ardından dimerize olur ve ER ER α ($\alpha\alpha$) , ER β ($\beta\beta$) homodimerleri ve ER $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) heterodimeri olmak üzere üç farklı dimer oluşturabilir. Dimer fomundaki reseptör DNA üzerinde hedef genlerin promotor bölgelerinde bulunan hormon cevap elementleri (hormone response element, HRE) olarak bilinen spesifik bölgelere bağlanarak gen ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Bazı östrojen reseptörleri ise sitozol yerine hücre membranı üzerinde bulunmaktadır. Bu tip reseptörler ligandına bağlandığında sitozoldeki reseptörlere göre oldukça yüksek hızda cevap verebilmektedir. Östrojen, östrojen reseptörüne bağlandığında PI3K /AKT, Nf-kB ve Ras-MAPK yolaklarını aktifleyerek hücre büyümesini, proliferasyonu ve anti-apoptozisi uyarmaktadır (37, 38). Tamoksifen (trifeniletillen) östrojen reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde hastalığın tüm aşamalarında yaygınlıkla kullanılan seçici östrojen reseptörü modülatörü olup (39), seçici olarak östrojen reseptörüne bağlanmakta ve östrojen bağlanmasıyla uyarılan sinyal yolaklarını baskılamaktadır (40). Günümüzde yüksek kanser riski taşıdığı belirlenen kadınlarda meme kanseri gelişme riskine karşı önlem olarakta kullanılabileceği belirtilmektedir (41).

Trastuzumab (Herceptin) HER2 + meme kanseri tedavisinde kullanılan etkili bir hedefli terapi ajanıdır. HER2 hücre membranında mitojenlerle dimer oluşturarak aktiflenen ve hücre içine sinyal gönderen bir yüzey proteindir. HER2 sinyali PI3/Akt ve MAPK sinyal yolaklarını aktifleyerek invazyonu, anti-apoptozu ve anjiogenezi artırmaktadır (42). Kanser hücrelerinde HER2 ekspresyonu normal hücrelerden oldukça fazla olabilmektedir (43, 44). HER2'nin over-ekspresyonu güçlü proliferatif sinyal oluşturmakta ve tümör formasyonunu başlatmaktadır. Trastuzumab HER2/neu ektodomeynine seçici olarak bağlanıp inhibe eden bir monoklonal antikordur (45). Trastuzumab ile muamele edilen hücreler P27Kip1 üzerinden hücre döngüsünün G1

fazında tutularak proliferasyonları düşmektedir. Trastuzumab ayrıca PI3K sinyal kaskadını azaltmakta ve anti-anjiyogenik faktörleri indükleyerek ve pro-anjiyogenik faktörleri baskılayarak anjiogenezi inhibe etmektedir (46, 47).

Bu tür yan etkileri düşük hedefli terapilerden başka agresif meme kanseri türlerini tedavi etmede kullanılan yan etkileri yüksek kemoterapötikler de bulunmaktadır. Doksorubisin (Adriamycin) bir antrasiklin olup kanser kemoterapisinde kullanılan ve bakteri türlerinden semisentez yolu ile elde edilen bir ajandır (48, 49). Ölümcül kardiyak toksisitesi ve doz bağımlı kardiyomiyopatiye sebep olması nedeni ile yan etkileri oldukça yüksek bir ilaç olarak bilinmektedir (50). Doksorubisinin etki mekanizması iki basamakta incelenebilir: i) Doksorubisin DNA'ya interkalasyon yaparak Topoizomeraz II aracılı DNA tamirini engeller ve ii) serbest radikal üretimine sebep olarak hücre membranlarına, DNA'ya ve proteinlere zarar verir (51). Kısaca özetlemek gerekirse, doksorubisinin semikuinon adı verilen stabil olmayan bir moleküle okside olması ve tekrar doksorubisine dönüşmesi esnasındaki proseste yüksek oranda serbest oksijen radikali meydana gelmektedir. Reaktif oksijen ürünleri lipid peroksidasyonuna ve hücre zarı hasarına neden olarak DNA hasarına ve oksidatif strese yol açmakta, bu da hücrelerde apoptozu tetiklemektedir (52). Oksidasyonda görev alan *NADH dehidrogenaz*, *nitrik oksit sentetaz*, *ksantin oksidaz* ve serbest radikalleri deaktive eden *glutasyon peroksidaz*, *katalaz* ve *süperoksit dismutaz* enzimlerini kodlayan genlerin bu yolu modüle edebilecek aday genler olduğu düşünülmektedir (53, 54). Doksorubisinin diğer etki mekanizması ise nükleusa transfer olarak topoizomeraz-II enzimini inhibe etmesi, DNA hasarına ve hücre ölümüne yol açmasıdır (55). Doksorubisin'in moleküler yapısı Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Doksorubisinin moleküler yapısı.

Doksorubisin diğer kemoterapötikler gibi çok nadir tekil olarak kullanılmaktadır. *In vivo* çalışmalarda genellikle doksorubisin taksanlar, platinyum ilaçlar, nitrojen mustard analogları, floropirimidinier ve vinka alkaloidleri gibi diğer anti-neoplastik ajanlar ile birlikte kullanılmaktadır (56, 57). Klinikte ise doksorubisin, kombinasyonları çoğunlukla kardiyotoksisite ile sonuçlanan paklitaksel ve doseataksel gibi taksan grubuna dair ilaçlar ve transtuzumab ile birlikte kullanılmaktadır (58).

1.3. Kanser Araştırmalarında Kullanılan Mantarlar

Mantarların anti-kanser özellikleri ve kanser destek tedavisinde kullanım potansiyelleri uzun yıllardır araştırılmaktadır. Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi konvansiyonel tıpta rutin olarak kullanılan iki tedavi yöntemidir. Bu yöntemlere bağlı kemik iliği baskılanması, gastrointestinal bozukluklar, alopesi, halsizlik başta olmak üzere kardiyak, solunumsal ve nörolojik pek çok yan etki ortaya çıkabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan tedavi stratejilerinin yüksek yan etkileri nedeni ile hastaların tedaviye uyumu güçleşmekte ve hastaların yaşam kalitesi düşmektedir. Buna bağlı olarak alternatif veya tamamlayıcı kanser tedavileri arayışı gün geçtikçe artmaktadır. *In vitro* ortamda anti-kanser özellikleri araştırılan onlarca mantar türü bulunmakla birlikte insanlar üzerindeki etkilerinin belirlendiği araştırmalar oldukça azdır. Aşağıda kanser

destek tedavisinde kullanım potansiyeli olan ve kanser hastalarında etkileri araştırılmış olan mantar türleri ve anti-kanser özellikleri özetlenmiştir.

Grifola frondosa (Maitake mantarı)

Maitake mantarı olarak ta bilinen *Grifola frondosa* türünün immün sistemi güçlendirici, anti-tümöral ve hipoglisemik (59) etkisi yapılan araştırmalar ile ortaya çıkarılmıştır. *Grifola frondosa*'dan elde edilen beta glukan'ların mürin tümör modellerinde bu maddelerin enjeksiyonu veya oral alımı ile sistemik anti-tümör immün cevabı indüklediği gösterilmiştir (60). Bir diğer araştırmada, % 5 NaOH (sodyum hidroksit) ile saflaştırılan bir beta glukan türevinin (GFPBW1) sarkoma modeli geliştirilmiş ve immün yetmezliği bulunan farelerde anti-tümöral aktivitesini Dektin-1/ Syk/ NF- κ B sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği ortaya çıkarılmıştır (61). Cisplatin ile tedavi edilen fare kanser modelinde *Grifola frondosa*'nın sadece cisplatin verilen kontrol grubuna göre, ilacın anti-tümöral ve anti-metastatik etkisini anlamlı olarak artırdığı ve cisplatin tarafından indüklenen miyelotoksisite ve nefrotoksisitede azalma sağladığı belirtilmektedir (62). Kemik iliğinden elde edilmiş dendritik hücreler ve mürin kolon kanser modeli üzerinde yapılan çalışmalar *Grifola frondosa* heteropolisakkaridi Z fraksiyonunun hücresel immüniteniteyi indükleyerek terapötik ve kanserden koruyucu özellik gösterdiği belirtilmektedir (63). *Grifola frondosa*'dan elde edilen düşük molekül ağırlıklı protein fraksiyonunun (MLP fraksiyonu) kolon kanseri fare modelinde IL-12 ve IFN-gama üretiminde artışa ve tümör büyümesinde anlamlı düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir (64). MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mantar ekstraktı (D fraksiyonu) ile inkübasyonunun kanser hücrelerinde BAK-1 ve sitokrom c'nin direk olarak katıldığı bir apoptotik yolağı tetiklediğini ortaya çıkarmıştır (65). *Grifola frondosa*'dan elde edilen suda çözünen ekstraktların TMK-1 insan gastrik kanser hücre hattında hücre proliferasyonunun inhibisyonunu sağlamakta ve kaspaz-3 bağımlı ve bağımsız yollar üzerinden apoptozu tetiklemektedir (66).

Faz I/II doz yükseltme çalışmalarında 34 post menopozal, meme kanseri tedavisi başarılı geçmiş kişilere 3 hafta boyunca günde iki defa oral olarak 0,1, 0,5, 1.5, 3, veya 5 mg/kg Maitake polisakkaritlerinin verilmesi sonucunda immünolojik fonksiyonda doz

bağımlı anlamlı artış gözlenmiş, çalışmaya alınan kişilerden birinde yan etki olarak mide bulantısı ve şişlik, bir diğesinde ise kaşıntı ve döküntü meydana geldiği belirtilmiştir (67). Kanser hastalarında kemoterapi nedeniyle gelişen immünsupresyon tedavisinde kullanım potansiyeli olan Maitake'nin insanlarda kullanımının güvenilirliği ve etkisi üzerine yapılan sistematik çalışmalar oldukça azdır.

Phellinus sp.

Phellinus türlerinin anti-tümöral, anti-metastatik ve immün sistemi güçlendirici etkileri bulunmakta, özellikle cinsten elde edilen polisakkaritler, protein-glukan, protein-polisakkarit kompleksleri ve fenolik bileşeni *hispolon* birçok kanser türünde proliferatif sinyal yollarını baskılamaktadır. *P. linteus* türünden elde edilen protein bağlı polisakkaritin (PI), SW480 kolon kanseri hücrelerinde ve fare modelinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ederek tümör büyümesini, invazyonu ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (68). Bu polisakkarit ile yapılan bir başka çalışmada, polisakkaritin DU145 insan prostat kanseri fare modellerine iki günde bir 12 gün boyunca enjeksiyonunun tümör regresyonunu ve apoptozisi indükleyerek tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (69). *Phellinus rimosus* (PR) mantarından elde edilen bir tür protein bağlı polisakkaritin (PPC-Pr) ise, Dalton'un asidik lenfoması fare modelinde solid tümörlere karşı koruyucu ve hastalığı iyileştirici özelliklere sahip olduğunun bulunması ile potansiyel bir terapötik olabileceği vurgulanmıştır (70). *Phellinus* türlerinin insanlar üzerindeki etkilerini aydınlatan çalışmalar çok az olsa da bazı ilginç bulgular göze çarpmaktadır. Hepatosellüler karsinoma'nın spontan regresyonu oldukça sıradışı bir durum olarak kabul edilmektedir. 79 yaşında, erkek, multipl akciğer metastazı olan bir karaciğer kanseri hastası hastaneye başvurmuş fakat herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Hastanın bağımsız olarak bir ay boyunca *Phellinus linteus* miselleri tüketmesinden 6 ay sonra tümörün tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (71). Bir başka vaka raporunda ise, 69 yaşında, hepatosellüler karsinoma teşhisi konmuş ve radyoterapi uygulanmış hastanın 18 ay boyunca *P. linteus* mantarını tüketmesinden sonra tümörün spontan regresyona uğradığı belirtilmektedir (72). Hızlı gelişmiş kemik metastazı bulunan hormona dirençli prostat kanseri hastasında ise *P. linteus* tüketiminin

etkili sonuç gösterdiği belirtilmektedir (73). Bu vaka raporları *P. linteus*'un anti-tümöral aktivitesine dikkat çekmekle birlikte, etkisinin altında yatan mekanizmayı açıklamada yetersizdir. Dolayısıyla bu mantar veya mantarlardan elde edilen bileşenlerin insanlar üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir.

Coriolus versicolor (Trametes versicolor)

Hindi kuyruğu olarakta bilinen *Coriolus versicolor* veya diğer adıyla *Trametes versicolor*'un birçok kanser tipi üzerinde anti-tümöral etki gösterdiği bilinmektedir. *Coriolus versicolor* insanlar üzerindeki etkileri en fazla araştırılmış mantarlardan biri olup, bazı ülkelerde klinik kullanımı da mevcuttur. *Coriolus versicolor* metanol ekstraktının B-16 melanoma fare modelinde kanser hücrelerine karşı direk anti-tümöral ve anti-proliferatif etki gösterdiği ve makrofaj anti-tümör aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (74). Son yıllarda yapılan çalışmalar prostat kanserinin nüksünde ve hastalık ilerlemesinde kendini yenileyebilen ve kütleli kanser hücrelerine farklılaşabilen kanser kök hücrelerinin önemli rolü olduğunu ortaya çıkarmıştır (75). Bu hücreler farklı kanser kemoterapötiklerine karşı oldukça dirençli olup, tedavideki başarısızlığa ve hastalığın tekrarına katkıda bulunmaktadır. (76). 2011 yılında yapılan bir çalışmada *Coriolus versicolor* mantarının aktif komponenti, polisakkaropeptit (PSP)'in PC-3 prostat kanseri hücre hattında zaman ve doz bağımlı olarak kanser kök hücrelerini hedeflediğini ve *in vivo* ortamda da kanser kök hücrelerinin tümör gelişimini baskıladığı ve oral kullanım ile tamamen prostat tümör oluşumunu baskılayan kemopreventif etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (77). PSP ile kanin hemangiosarkoma üzerinde yapılan çift kör randomize çalışma sonucunda PSP'in yüksek oranda metastazı önlediği ve kanin hemangiosarkomada en yüksek yaşamsal oranın elde edildiği ve gelişmiş tedavi yöntemlerinin olmadığı bölgelerde tekil ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (78). PSP güncel kullanımı olan kemoterapötiklerin bazıları ile sinerjik etki göstermektedir. Örneğin, ZR-75-30 meme kanseri hücre hattında doksorubisin ve etoposidin anti-proliferatif ve sitotoksik etkilerini artırdığı gözlenmiştir (8). PSP, Japonya'da klinik olarak anti-kanser ajanlarla birlikte gastrik kanser ameliyatından sonra halen kullanılmaktadır. Standart primer onkolojik tedavi görmeden önce *Trametes*

versicolor mantarını 6-9 gr/gün dozunda oral olarak tüketen meme kanseri hastalarında lenfosit sayısının ve doğal öldürücü (natural killer) aktivitesinin arttığı tespit edilmiş, bu mantarın immün sistemi güçlendirerek standart kemoterapötik tedaviye yardımcı olabileceği belirtilmiştir (79). PSK, polisakkarit krestin, uzun zamandır Asya'da ve son zamanlarda batı ülkelerinde de kanser tedavisinde immün sistemi güçlendiren etkileri nedeniyle kullanılan bir mantar ekstraktıdır. PSK'nin oral yoldan alımının farelerde meme kanseri gelişimini anlamlı ölçüde inhibe ettiği ve immün sistemi stimüle ettiği gösterilmiştir (80). Yapılan bir çalışmada, 349 evre 2/3 kanser hastasında PSK'nın konvansiyonel terapi ile kombine etkisi araştırılmış ve MHC sınıf I negatif hastalarda PSK immünokemoterapisinin 3 yıl içindeki reküransı % 20 azalttığı gösterilmiştir (9). *Trametes versicolor*'dan saflaştırılan PSK'nın TRAMP-C2 prostat kanseri taşıyan fare modelinde dosetaksel tarafından indüklenen tümör supresyonunu ve anti-tümör immün cevabını artırdığı gösterilmiştir (6). SKBR3 ve MDA-MB-231 meme kanseri fare modellerinde ise, PSK'nın oral yoldan alımının transtuzumab monoklonal antikor tedavisinin anti-tümör etkisini anlamlı olarak artırdığı belirtilmekte ve bu etkiyi doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (10). PSK'nın insan pankreatik adenokarsinoma hücreleri üzerinde immün modülatör etki ve gemstabin ile aditif etki göstermektedir (81). *Coriolus versicolor*'un insanlar üzerindeki etkisinin araştırıldığı 13 klinik denemenin meta analiz sonuçlarına göre, mantarın özellikle meme, gastrik ve kolorektal kanser hastaları üzerinde yaşamsal faydaları olduğu çıkarımı yapılmıştır (82). Bu veriler ışığında *C. versicolor*, kanser tedavisinde konvansiyonel terapiye yardımcı veya bir immünoterapötik olarak umut verici gözükmemektedir.

Lentinula edodes (Shiitake mantarı)

Lentinula edodes mantarının anti-tümöral fonksiyonları immün stimülatör özelliği ile bağlantılıdır. *Lentinula edodes* misel ekstraktlarından (LEM) elde edilen tirozin ilişkili protein 2 peptidinin B16 melanoma taşıyan farelere oral yoldan ve aşı yolu ile kombine uygulanması melanoma gelişimini anlamlı olarak baskılamıştır. LEM anti-tümöral aktivitesini CD8 (+) T hücre bağımlı olarak gerçekleştirmekte ve tümör taşıyan

konakta regülatör T hücre yüzdesini artırmaktadır (83). Kemoterapinin 4. haftasında olan 10 kanser hastasında LEM'in oral yoldan alımının hastaların bağışıklık fonksiyonlarında artış sağladığı ve hastaların hayat kalitelerinde iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir (84). Bir gastrik, 7 kolorektal kanser hastasında LEM'in oral yoldan alımının sadece kematerapi gören kontrol grubuna göre kemoterapinin yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir (85). *Lentinula edodes*'in kolon-26/C-26 hücreleri singenik fare modellerinde oral yoldan alımı ile farelerde anti-tümör T hücre cevabının yenilenmesini sağlaması sebebiyle ekstraktın insan kolon kanseri immunoterapisinde kullanım potansiyelinin bulunduğu düşünülmektedir (86). Bir diğer çalışmada, hastalığın tekrarının önlenmesi için kemoterapi alan 3 meme kanseri, 2 gastrointestinal kanser, 2 gastrointestinal kanser hastasında oral yoldan *Lentinula edodes* alımının hiçbir yan etkisin olmadığı, sadece kemoterapi alan hastalara göre kemoterapi + *Lentinula edodes* alan hastaların yaşam kalitelerinin ve immün fonksiyonlarının arttığı belirtilmektedir (87).

Lentinan özellikle bu cinsten elde edilen anti-tümöral aktiviteye sahip beta-(1--3)-D-glukan türü olup, Japonya'da klinik olarak gastrik kanser tedavisinde 5-fluorouracil ile kombine olarak kullanılmaktadır. Lentinus edodes'ten elde edilen lentinan'ın oral anti-neoplastik S-1 floroprimidin ile kombine tedavisi OSCC ksenograft mürin modelinde ve insan OSCC hücrelerinde yüksek anti-tümöral aktivite göstermiştir (88). Lentinan'ın BNML lösemi mürin modelinde, hastalığın terminal safhasında idarubicin ve cytarabine ile kombine edildiğinde ortalama yaşam süresini arttırdığı ve kaşeksiyi azalttığı gösterilmiştir (15). Lentinan ile kemoterapötiklerin kombine klinik denemeleri kanser hastalarında oldukça olumlu sonuçlar vermiştir. 2012 yılında yapılan bir araştırmada 50 özofageal karsinoma hastası çalışmaya alınmış, kontrol grubunu oluşturacak 25 hastaya 5 gün boyunca 1000 mg/gün tegafur tedavisi, çalışma grubunu oluşturan 25 hastaya ise 1000 mg/gün tegafur tedavisi ve 250 ml normal tuz çözeltisi içerisinde çözünmüş 1 mg lentinan tedavisi uygulanmıştır (14). Tedavinin ikinci küründe, çalışma grubundaki hastalarda tedaviye daha iyi yanıt alındığı gözlenmiş, çalışma grubundaki hastaların genel durumları, semptomları ve immün yanıtlarında anlamlı

olarak gelişme gözlemlendiği belirtilmiştir (14). Bir başka araştırmada ise 20 gastrik kanser hastası 12 hafta boyunca lentinan, S-1 ve paklitaksel tedavisi görmüş, çalışma grubundaki hastaların yalnızca S-1+ paklitaksel kullanan kontrol grubuna göre yaşam kalitesinde anlamlı artış gözlenmiştir (89). Bu araştırmaların sonuçları lentinanın klinikte kemoterapötikler ile kombine kullanımının hastalar üzerinde herhangi bir toksik etki göstermeden, yaşam kalitesinin ve immün cevabın artışı sağladığı yönündedir. Yapılan diğer klinik denemeler sonucunda SDL'nin (Superfin dispersed lentinan) oral kullanımının karaciğer kanseri hastalarında (n=36) (90) ve pankreatik kanser hastalarında (n=29) (16) yaşam süresi üzerinde anlamlı etkisinin bulunduğu gösterilmiştir. Kolorektal kanser hastalarında (n=80) oral yoldan SDL alımının kemoterapinin yan etkilerini azalttığı ve hastaların yaşam kalitelerinin arttığı belirtilmektedir (91).

Schizophyllum commune

Schizophyllum commune farklı kanser türlerine sahip hastalar üzerinde yaşam süresini uzatan etkileri bulunması nedeniyle dikkat çeken bir mantar türüdür. Bu mantardan izole edilen bioaktif bileşenlerin en etkili olanları hidrofobin ve schizophyllan gibi görünmektedir. *Schizophyllum commune* mantarından elde edilen hidrofobin SC3 proteininin sarkoma ve melanoma geliştirilmiş fare modellerinde tümörlerde kontrole göre mitotik aktiviteyi baskıladığı (1.6 kat melanoma, 2.3 kat sarkoma), vital kütleyi azalttığı (2.3 kat melanoma, 4.3 kat sarkoma) belirtilmekte kemoterapi ve radyasyon ile kombinasyonunun faydalı olabileceğinden bahsedilmektedir (92). Schizophyllan (SCH), *Schizophyllum commune*'den elde edilen β -D-glukan türevi bir molekül olup, ER pozitif meme kanseri oluşturulmuş fare modelinde tek dozu 4 haftalık tamoksifen tedavisine eşdeğer anti-tümöral aktivite göstermiştir (93). Evre 3/4 baş ve boyun kanseri hastalarında SCH kullanımının bölgesel lenf nodlarında immunolojik aktivite ve tümör içeren lenf nodlarında yardımcı T hücre sayısının artışı sağladığı belirtilmektedir (94). Bu sonuçlar farklı kanser türlerinde yapılan diğer klinik denemelerin sonuçları ile de korele görülmektedir. Yapılan diğer klinik denemelerde, SCH adjuvan immunoterapisinin evre 2/3 servikal kanser

hastalarında (n=382) rekürans ve yaşam süresini uzattığı (95), gastrik kanser hastalarında (n=234) kemoterapötikler ile SCH kombine tedavisi ile hastalarda daha iyi prognoz gözlemlendiği (96) ve ovaryum kanseri hastalarında (n=24) interferon-alpha/beta ve SCH adjuvan terapisinin hastalarda anlamlı olarak yaşam süresini uzattığı belirtilmektedir (17).

Amanita sp.

Falloidin *Amanitaceae* ailesinden zehirli bir mantar olan *Amanita phalloides*'ten (Ölüm meleği mantarı) elde edilen polar, hücre içine girebilen bir siklik heptapeptittir (97). Falloidin sıkı şekilde aktin filamentlerine bağlanarak (K_d 40 nM) depolimerizasyona karşı stabilize etmektedir (98-100). Falloidin (2-4uM, pH 6.1-6.2) HeLa, JC ve M4A4 hücre hatlarına traslokasyonu ile 3 saat sonucunda bu hücre hatlarında % 90 oranında hücre büyümesinde inhibisyon meydana gelmektedir (97). Lösemi hastalarında yapılan 21 aylık amanitin tedavi sürecinde lökemik hücrelerin sayısı 10^5 / uL seviyesinde stabil kalmıştır. Lösemi ilişkili semptomlar ve karaciğer hasarına raslanmamıştır (101).

1.3.1. *Ganoderma lucidum*'un Kanser Tedavisinde Kullanımı

Ganoderma lucidum (Reishi, Lingzhi) yüzyıllardır Kore, Japonya ve Çin'de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış, *Basidiomycetes* sınıfına dahil yenebilen tıbbi bir mantar türüdür.

G. lucidum biyolojik olarak aktif polisakkaritler, glikoproteinler, aminopolisakkaritler, proteoglikanlar ve triterpenler gibi birçok alt birimden oluşmakta ve her bir alt birimin anti-kanserojen etkilerinin olduğu günümüze değin yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. *G. lucidum*'dan elde edilen polisakkaritler, doğal öldürücü hücreler, T hücreler, B hücreler ve makrofaj bağımlı immün sistem cevabını aktive ederek dolaylı yoldan onkogenezis ve tümör metastazını baskılamaktadır (102).

G. lucidum ekstraktları aynı zamanda farmakolojik olarak aktif olan yüzden fazla anti-proliferatif etkili triterpen türevidir (103). Örneğin, *Ganoderik asit DM*,

MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunu ve koloni formasyonunu inhibe etmekte, DNA hasarına, G1 hücre döngüsü tutulumuna ve apoptozise yol açmaktadır (104). *Ganodermanontriol* bir diğer *G. lucidum* triterpeni olup, HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde kolon kanseri tedavisinde önemli bir hedef gen olan beta-katenin ve siklin D1'in transkripsiyonel aktivitesini ve protein ekspresyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmekte, HT-29 ksenogreft modelinde ise herhangi bir yan etki göstermeksizin tümör büyümesini baskılamaktadır (105). *Ganoderik asit A* ve *C*'nin ise hücre transformasyonunda görevli Ras onkoprotein aktivasyonunda gerekli bir enzim olan *farnesil protein transferaz*'ı inhibe ettiği belirtilmiştir (106). *Ganodermanontriol*'un, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 5,8 ve 9.7 μM $\text{IC}_{(50)}$ değerlerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilirken (107), bir başka çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında *ürokinaz plazminojen aktivatörü* (uPA)'nın supresyonu ve *uPA reseptörü*'nün transkripsiyonel inhibisyonu yolu ile hücre adhezyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (108). *Ganoderma lucidum*'dan saflaştırılan triterpen türevi *GLT*'nin kolon karsinogenez hayvan modellerinde kolit ilişkili kanserden koruyucu özellik gösterdiği belirtilmektedir (109). Yapılan bir başka çalışmada ise *G. lucidum* total triterpen fraksiyonunun anlamlı bir toksisite göstermeden serbest radikalleri temizleyerek vücudun antioksidant savunma sistemini güçlendirmesi nedeni ile antioksidant olarak kullanım potansiyeli olduğu belirtilmektedir (110).

Reishi'nin, OVCAR-3 insan ovaryum kanser hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği, siklin D1 ekspresyonunda azalmaya sebep olarak hücre döngüsünde tutulumu sebep olduğu ve *Nrf2* aracılı sinyal yolağı üzerinden *SOD*, *katalaz* ve *NAD(P)H:kuinon oksidoredüktaz 1 (NQO1)* antioksidanlarını indüklediği gösterilmiştir (111). Yapılan bir başka araştırmada ise, epitelyal ovaryum hücre hatlarında Reishi'nin doz bağımlı olarak hücre canlılığını, koloni formasyonunu, migrasyonu ve sferoid formasyonunu inhibe ettiği ve bu hücreler üzerinde cisplatinin etkisini artırdığı belirtilmektedir (112).

Bir Reishi bileşeni olan *ergosta-7,22-diene-2 β ,3 α ,9 α -triol*'un (EGDT), HL-60 insan promyelositik hücrelerinde DNA fragmentasyonu, kaspaz 3 aktivitesi gibi tipik apoptotik süreçleri tetiklediği ve Lewis karsinoma modeli oluşturulan farede tümör boyutunu anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (113). *G. lucidum*'dan elde edilen ekstraktların kanser spesifik sinyal yollarında etkili olduğu yapılan bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir. Yüksek metastaz gösteren kanser türlerinin bir karakteristik özelliği de *AP-1* ve *NF-kB* gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonudur. *AP-1* ve *NF-kB* inhibisyonu *ürokinaz tip plazminojen aktivatörü* (uPA)'nın baskılanmasına neden olmakta ve sonuçta yüksek invazivlik gösteren kanser hücrelerinde migrasyon inhibe olmaktadır (114, 115). *Ganoderma lucidum* ekstraktları yüksek oranda invaziv olan meme ve prostat kanserlerinde aktif halde bulunan *AP-1* ve *NF-kB*'i inhibe etmektedir. Ayrıca *G. lucidum*, meme ve prostat kanserlerinde uPA ve reseptörü uPAR'ın ekspresyonunu down regüle ederek hücre motilitesini inhibe etmektedir (116).

Yapılan diğer araştırmalarla bu ekstraktların, *P21/WAF-1* yolağına etki ederek meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün G1 safhasında tutuluma yol açtığı (117), hepatoma hücrelerinde *Bax* ekspresyonunu artırarak apoptozisi tetiklediği ve *protein kinaz C*'yi hedefleyerek G2 evresinde tutuluma sebep olduğu gösterilmiştir (118). Ling Zhi-8, *Ganoderma lucidum* mantarının misellerinden izole edilen ve klonlanan (rekombinant LZ-8) immünomodülatör ve anti-tümör özellikli bir protein olup A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde p53 bağımlı G1 tutulumuna yol açtığı belirtilmekte, rLZ-8'in yabanıl tip p53'e sahip ve *MDM2* proteinini yüksek oranda eksprese eden kanser tiplerinde etkili olabileceği savunulmaktadır (119). LZ-8 proteininin rekombinant üretimi ile elde edilen rLz-8, SGC-7901 insan gastrik kanser hücre hattında kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak endoplazmik retikulum stres aracılı otofajik hücre ölümünü tetiklemektedir (120).

Reishi, tümör büyümesi üzerindeki etkilerini protein sentezini baskılayarak, yaşamsal ve translasyonda görev alan bazı proliferatif sinyal yollarını etkileyerek de gerçekleştirmektedir. Reishi mantarından elde edilen ekstraktların, inflamatuvar meme kanseri IBC SUM-149 hücre hattında (EGF +, agresif fenotipe sahip meme kanseri

hücreleri) erken dönemde *mTOR* downstream efektörlerinin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı belirtilmektedir (121). İmmün yetmezliği olan farelere Reishi ekstraktları ile IBC SUM-149 hücrelerinin ko-injeksiyonu tümör hacmini ve ağırlığını %50 oranında düşürmüştür (121). *G. lucidum* etanol ekstraktları AGS insan gastrik karsinoma hücrelerinde apoptozu, *AKT* sinyal yolağının inaktivasyonu ile ilişkili olarak ölüm reseptörü aracılı ekstrasik ve mitokondri aracılı intrinsik kaspaz yollarının aktivasyonu ile tetiklemektedir (122). Triterpen ekstraktlarının HT-29 kolon kanseri hücreleri ve ksenograft kolon kanseri modelinde G0/G1 hücre tutulumuyla birlikte tip II-otofaji'yi tetiklediği gösterilmiştir (123). *Ganoderik asit T* HCT-116 kolon karsinoma hücre hattında ve yüksek metastatik özellik gösteren 95-D insan akciğer kanser hücrelerinde proliferasyonu, adhezyonu ve migrasyonu inhibe etmektedir (124). Yapılan *in vivo* çalışmalar, *Ganoderik asit T*'nin hayvan ve Lewis akciğer karsinoma modellerinde tümör büyümesini suprese ettiği ve invazyon ve metastazı baskıladığını göstermektedir (124). *Ganoderma lucidum* Faz I/II çalışmalarına başlanmış spesifik biyoaktif moleküller içermektedir. 2003 yılında yapılan bir araştırmada, *Ganoderma lucidum*'dan saflaştırılan Ganopoly adlı ticari ürünün (polisakkarit ekstraktı) 12 hafta boyunca ileri seviye kanser hastalarında günde üç defa 1800 mg kullanımının hastalarda immün cevabın anlamlı olarak artırdığı gözlenmiştir (125).

Bu araştırmalar *Ganoderma lucidum* total ekstratlarının veya alt bileşiklerinin kanser tedavisinde ve kanserden korunmada faydalı olabileceğini göstermektedir. *Ganoderma lucidum*'un anti-tümöral etki yolları ile günümüzde yaygın olarak kullanılan etkinliği kanıtlanmış kanser terapötiklerinin etki yolları karşılaştırıldığında sinerjik etki gösterebileceği görülmektedir.

Bugüne değin *Ganoderma lucidum*'un günümüzde farklı tiplerdeki kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılan doksorubisin ve tamoksifen ile sinerjik etkileşimi araştırılmamıştır. Bu çalışmada *Ganoderma lucidum* ekstraktının tamoksifen ve doksorubisin kanser terapötikleri ile kombinasyonunun meme kanseri hücre hatlarında sinerjik etkileşimi araştırılacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *Ganoderma lucidum* ekstraktlarının hazırlanması

Bu çalışmada anti-kanser özellikleri incelenen bir tıbbi mantar türü olan *Ganoderma lucidum* makro-mantarının basidiokarp formu Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan mantar üretim laboratuvarının altyapısından yararlanılarak üretildi. *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktları Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmakognozi Ana Bilim Dalında hazırlandı. Bunun için, *Ganoderma lucidum* örnekleri kurutuldu ve toz haline getirildi. Su ekstraktları % 2 infüzyon ile, etanol:su (1:1), etanol, metanol, dietil eter, etil asetat ekstraktları ise solvent/makrofungi oranı 15/1 olacak şekilde maserasyon ile elde edildi. Elde edilen tüm ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreler ile filtrelendi. Ekstraksiyon solventleri uçurularak jel benzeri yapıya sahip mantar ekstratları elde edildi. Elde edilen ekstraktlar liyofilize edilerek ürün verim tayini için tartıldı. Yüzde ürün verimi kuru ağırlığa göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

Ürün verimi (%): (Solvent uçurulduktan sonra ekstraktın ağırlığı/ *G. lucidum* toz ağırlığı) x100.

Liyofilize halde alınan *G. lucidum* ekstraktları (Metanol, Etanol, Metanol-Su, Etanol-Su, Eter, Su, Etil asetat ekstraktları) tartılarak konsantrasyonları 1g/ ml olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürüldü. Stok ekstrakt çözeltileri -80 °C'de saklandı. Stok ekstrakt çözeltilerinden deneylerde kullanılacak ikinci bir stok son konsantrasyonu 1 mg/ 0.9 ml olacak şekilde serumsuz RPMI ile hazırlandı. İkinci stoklar 0.02 µm'lik filtreler ile steril Falkon tüpler içerisine filtrelendi. Filtrelemenin ardından çözeltiliye % 10 oranında fetal sıgır serumu (FBS) eklendi. İkinci stok ekstrakt çözeltileri - 80 °C'de saklandı. Deneylerde kullanılan ekstrakt çözeltileri bu ikinci stok ekstrakt çözeltilerinin büyüme ortamı ile seyreltilmesi ile elde edildi.

2.1.1. Preliminer Fitokimyasal Tarama

Canlılık denemelerinde en etkili bulunan *G. lucidum* ekstraktı için prelininer fitokimyasal içerik taraması Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmakognozi Ana Bilim Dalı'nda Trease ve Evans ile Harborne tarafından tanımlanmış standart prosedür kullanılarak gerçekleştirildi (126, 127).

2.2. Hücre Kültürü

Bu alışmada *Ganoderma lucidum* tıbbi mantarının anti-karsinojenik etkileri ve kemoterapötikler ile sinerjistik etkileşimleri *in vitro* meme kanseri modellerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) araştırılmıştır. Hücre kültüründe kullanılan gereç ve yöntemler aşağıda anlatılmıştır.

2.2.1. Hücre Kültürü Gereçleri

➤ Hücre Hatları

- MCF-7 : Meme adenokarsinom, aderan, ER(+) PR(+) Her2 (-)
- MDA-MB-231 : Meme adenokarsinom, aderan, ER (-) PR (-) Her2 (-)

➤ Hücre Kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

- Bakır (II) sülfat penta hidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Sigma)
- FBS-fetal bovine serum (Lonza)
- Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (Lonza)
- P/S-Penisilin/Streptomisin (Lonza)
- RPMI (Lonza)
- TrypsinEDTA (Lonza)

2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar

- Isıtıcı (Stuart Orbital Karıştırıcı)
- İnkübatör (Thermo Forma Series II ve Thermo Steri-Cycle)
- Laminar Flow Kabin (Thermo MSC.12 ve Thermo MSC.Advantage)
- Mikroskop (Olympus IX71)
- Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf 5810R)

2.2.3. Hücre Kültürü Protokolleri

2.2.3.1. Hücre Büyüme Ortamının Hazırlanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının büyüme ortamları 500 ml RPMI içerisine %10 FBS (50 ml) , %1 Penisilin/Streptomisin (5 ml) eklenerek hazırlandı.

Deneylerde kullanılan serumsuz RPMI, 500 ml RPMI içerisine %1 Penisilin/Streptomisin (5 ml) eklenerek hazırlandı.

2.2.3.2. Hücre Dondurma (Saklama) Ortamının Hazırlanması

Hücreleri dondururken kullanılan ortam % 45 FBS, % 45 Büyüme Ortamı, % 10 DMSO ile hazırlandı. Taze olarak hazırlanmış ve buz içerisinde soğutularak kullanılmıştır.

2.2.3.3. İnkübatör Ortamının hazırlanması

Hücreler 25 ve 75 cm² lik kapakları filtreli flasklarda büyüme ortamı içerisinde büyütüldü. Hücreler 37 °C’de , % 5 kısmi CO₂ basıncı ve % 95 nem içeren inkübatörde kültüre edildi. İnkübatörün nem içeriği inkübatörün tabanına %0.1’lik Bakır (II) Sülfat penta hidrat (CuSO₄•5H₂O) çözeltisi konularak sağlandı. Bakır (II) sülfat çözeltisinden buharlaşan su ultra saf su ile tamamlanarak inkübatör içerisindeki nem idamesi sağlandı.

2.2.3.4. Hücrelerin Rutin Kontrolü

Hücreler hem çıplak gözle hem de mikroskopla günlük kontrol edildi. Çıplak göz ile hücre büyüme ortamının rengi ve berraklığı kontrol edildi. Berraklığını kaybeden

büyüme ortamında bulunan hücreler kontaminasyon riskine karşı önlem olarak mikroskopta kontrol edildikten sonra atıldı. Rengi sararan büyüme ortamında bulunan hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra eğer yoğunlukları %80'in üzerinde ise deneylerde kullanılmayacak ise seyreltilerek pasajlandı veya dondurularak saklandı. Deneylerde kullanılacak hücreler toplanıp sayılarak deney protokolüne uygun sayıda flasklara ekildi.

➤ **Hücre Ortamının Değiştirilmesi:**

Flask içerisindeki eski ortam her 3 günde bir uzaklaştırılarak taze büyüme ortamından 25 cm² flask için 3 ml, 75 cm² flask için 7 ml flaska ilave edildi.

➤ **Hücrelerin Toplanması:**

Flaskın içindeki ortam uzaklaştırılarak flask içerisindeki adheran hücreler önceden 37 °C'ye ısıtılmış olan steril PBS ile veya serumsuz RPMI ile yıkanarak yıkama ortamı dökülerek uzaklaştırıldı. Akış sitometri yönteminde kullanılacak hücreler için flask içerisindeki ortam ve yıkama solüsyonu atılmayıp toplandı. Yıkama aşamasının ardından flaska önceden 37 °C'ye ısıtılmış olan Tripsin-EDTA eklendi (25 cm² flask için 2 ml, 75 cm² flask için 4 ml). Flasklar tripsin aktivasyonu için 5 dakika inkübatörde inkübe edildi. Ardından süspanse hale gelen hücreler serumlu RPMI ile toplanarak 15 ml'lik Falcon tüplere aktarıldı. Falcon tüpler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kabin içerisinde uzaklaştırıldıktan sonra tüp içerisinde kalan hücre pelleti taze büyüme ortamı ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler deneylerde kullanılmak üzere veya hücrelerin idamesi için pasajlandı.

2.2.3.5. Pasajlama

Toplanıp süspanse edilen hücreler, hücrelerin idamesi için pasajlanacak ise % 80 yoğunluktaki flasktan elde edilen hücreler 1/5 oranında seyreltilerek yeni flaska ekildi. Ekim sonrası yeni pasajlara taze büyüme ortamı eklendi. Eğer hücreler deneylerde kullanılacak ise ekimden önce süspansiyondaki hücreler sayıldı. Deney protokolüne uygun miktarda hücre yeni flaska ekildi ve uygun miktarda büyüme ortamı flaska eklendi.

2.2.3.6. Hücre Sayımı

Toplanıp süspanse edilen hücrelerden ≈ 10 'ar μ l Neubauer lamının her iki tarafına yüklendi. Lamin üst ve alt taraflarındaki (her biri 16 küçük kareden oluşan) 4 kare (toplam 8 kare) sayıldı. Sayım değerlerinin ortalaması alındı. Mililitre başına düşen hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Mililitredeki hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü* x 10^4

*Tripan mavisinin oranı 1:1 olduğundan bu değer 2'dir.

Sayılan hücreler denemelerde kullanılma amacıyla 96 kuyucuklu plaklara (10×10^3 hücre/kuyucuk) ya da 25 cm^2 flasklara (20×10^4 hücre/flask) ekildi. 96 kuyucuklu flasklarda toplam hacim 100μ l, 25 cm^2 flasklarda toplam hacim 3 ml büyüme ortamıdır.

2.2.3.7. Hücrelerin Dondurulması

Toplanan hücreler taze hazırlanmış ve buz içerisinde bekletilen dondurma ortamı ile süspanse edilerek "cryo" tüplere 1'er ml dağıtıldı. Tüpler -20°C 'de 3 saat bekletildikten sonra -80°C 'de saklandı.

2.2.3.8. Hücrelerin Çözülmesi

-80°C 'den alınan dondurulmuş hücreler kabin içerisinde önceden 37°C 'ye ısıtılmış olan büyüme ortamı ile pipetlenerek hızlı bir şekilde çözündürüldü ve Falcon tüp içerisindeki taze büyüme ortamı içerisinde süspanse edildi. Falcon tüp içerisindeki süspansiyon 1200 rpm 'de 5 dakika santrifüj edildi. DMSO içeren süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı. Hücre pelleti büyüme ortamı ile süspanse edilerek 25 cm^2 'lik flaska ekildi.

2.3. WST-8 ile Canlılık Tayini Yöntemi

Altı farklı *Ganoderma lucidum* ekstraktının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkileri WST-8 metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

2.3.1. Canlılık Tayini Gereçleri

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- WST-8 Reaktifi (Sigma)

2.3.2. Canlılık Tayininde Kullanılan Cihazlar

- Orbital Karıştırıcı (STUART S1500)
- Spektrofotometre (Thermo Multiskan-ex)

2.3.3. Canlılık Tayini Protokolü

Hücreler % 80 yoğunluğa ulaştıktan sonra toplandı, taze büyüme ortamı içerisinde süspanse edildi ve sayıldı. Hücre süspansiyonu konsantrasyonu 20×10^4 hücre/ml olacak şekilde taze büyüme ortamı ile seyreltildi. 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 50 µl olacak şekilde (10^4 hücre/kuyucuk) hücre süspansiyonu dağıtıldı. 6 adet kuyucuğa kör olarak kullanılması için sadece 50 µl büyüme ortamı eklendi. 96 kuyucuklu plaklar hücrelerin plak yüzeyine yapışması için 1 gün inkübe edildi. Bir gün sonra hücrelerin sağlığı mikroskop altında kontrol edildi, hücreler sağlıklı ise deneye devam edildi.

Stok konsantrasyonları 1g/ml olan DMSO içerisinde çözünmüş altı farklı *Ganoderma lucidum* ekstraktının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine olan etkileri araştırıldı. Bunun için her bir ekstraktın stok çözeltileri büyüme ortamı ile seyreltilerek son konsantrasyonları 2-20-200 ng/ml, 2-20-200 µg/ml olacak şekilde 6 farklı doz hazırlandı.

Tamoksifen DMSO içerisinde stok solüsyonu 2 mM olacak şekilde çözdürüldü. Doksorubisin serumsuz RPMI içerisinde stok solüsyonu 2 mM olacak şekilde çözdürüldü. MCF-7 hücre hattında tamoksifen ve doksorubisin'in, MDA-MB-231 hücre hattında ise sadece doksorubisin'in hücre canlılığı üzerine olan etkileri incelendi. Kemoterapötiklerin dozları *G. lucidum* ekstraktlarında olduğu gibi hazırlandı.

Tamoksifen için DMSO kontrol grubu kullanılırken doksorubisin RPMI içerisinde çözündüğü için sadece genel kontrol grubu kullanıldı.

Hazırlanan her bir dozdan kuyucuklara 50 µl eklendi. Böylelikle bir gün önce kuyucuklara hücreler ile eklenen 50 µl büyüme ortamı ile 1:1 oranında seyrelen dozların son konsantrasyonları 1-10-100 ng/ml, 1-10-100 µg/ml olmuş oldu. Her bir doz altı tekrarlı çalışıldı. Her bir doz konsantrasyonunun içerdiği DMSO miktarı kadar DMSO içeren dört tekrarlı kontrol grupları oluşturuldu. Altı hücre içeren kuyucuğa sadece 50µl büyüme ortamı eklendi ve genel kontrol grubu (işlem uygulanmamış kontrol grubu) olarak kullanıldı. Kör olarak kullanılan bir gün önce sadece 50µl büyüme ortamı eklenmiş kuyucuklara 50 µl büyüme ortamı eklenerek son hacim diğer kuyucuklarda olduğu gibi 100 µl 'ye tamamlandı.

Her bir ekstrakt ve kemoterapötik için üç farklı zaman noktasında (24, 48 ve 72 sa.) ölçüm yapabilmek için 3 farklı plak hazırlandı. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 10 µl WST-8 reaktifi eklendi. Plaklar orbital karıştırıcıda 37 °C'de, 50 rpm'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklarda meydana gelen turuncu renk değişimi gözlemlendiğinde, plaklar 560 nm eksitasyon /590 nm emisyon filtre seti kullanılarak spektrofotometrik olarak okundu. 30 dakika inkübasyon ardından genel kontrol grubunun absorbansı ortalama 0.6 değerine ulaşmayan plaklar 5'er dakika aralıklarla inkübe edilmeye devam edilerek bu aralıklarda absorbans değerleri kontrol edildi. Plaklardan elde edilen absorbans değerleri Microsoft Excel yazılımında analiz edilerek canlılık grafikleri oluşturuldu.

2.4. Akış Sitometrik Yöntemler

Hücreler % 80 yoğunluğa eriştikten sonra toplandı ve sayıldı. 25 cm²'lik flasklara 20 x 10⁴ hücre 3 ml taze büyüme ortamı içerisinde ekildi. Bir gün hücrelerin flask yüzeyine yapışması için beklendi. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılıkları ve yoğunlukları kontrol edildi. Sağlıklı oldukları gözlenen hücreler akış sitometri çalışmalarında kullanıldı.

2.4.1. Akış Sitometri Yöntemlerinde Kullanılan Gereçler

Apoptoz tayini

- Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD)
- PBS

Hücre Yaşam Döngüsündeki Değişiklikler

- Cycletest Plus Kit (BD)

2.4.2. Akış Sitometri Yöntemlerinde Kullanılan Cihazlar

- Facs ARIA II Akış Sitometre (BD)
- İnkübatör (Thermo Forma Series II ve Thermo Steri-Cycle)
- Laminar Flow Kabin (Thermo/MSC.12 ve Thermo MSC.Advantage)

2.4.3. Akış Sitometri ile Apoptoz Tayini

Genel kontrol grubu, DMSO kontrol grubu ve *Ganoderma lucidum* ekstraktı ile muamale edilmiş örnek grubu olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Hücreler apoptoz tayini için ekildikten bir gün sonra flasklardaki büyüme ortamları dökülerek uzaklaştırıldı. Genel kontrol grubuna sadece taze büyüme ortamı eklendi. Örnek grubuna *Ganoderma lucidum* ekstraktının IC₍₅₀₎ dozu ile muamele edildi. DMSO kontrol grubuna örnek grubunun içerdiği miktarda DMSO ile muamele edildi (Flasklar içerisindeki son volüm 3 ml'dir). Flasklar 48 saat inkübe edildikten sonra hücreler toplandı. Elde edilen hücre pelleti PBS ile iki kez yıkandı. Hücre pelleti kit içerisindeki bağlama tamponundan (binding buffer 1x) 500 µl ile süspanse edildi. Süspansiyondan 100 µl alınarak üzerine 5 µl FITC ile işaretlenmiş Annexin-V ve 5 µl propidyum iyodür çözeltisi ilave edilerek düşük seviyede 5 saniye vortekslendi. Hücrelerin boyanması için tüpler oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta bekletildi. Ardından örnekler üzerine 400 µl bağlama tamponundan eklenerek akış sitometride analiz gerçekleştirildi. Her bir analiz için 20000 hücre kullanıldı.

2.4.4. Akış sitometri ile Hücre Yaşam Döngüsü Tayini Protokolü

Genel kontrol grubu, DMSO kontrol grubu ve *Ganoderma lucidum* ekstraktı ile muamale edilmiş örnek grubu olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Hücreler hücre yaşam döngüsü tayini için ekildikten bir gün sonra flasklardaki büyüme ortamları dökülerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin yaşam döngülerinin senkronizasyonu için flasklar içerisine serumsuz RPMI eklenerek bir gün inkübe edildi. Ertesi gün serumsuz ortam dökülerek uzaklaştırıldı. Genel kontrol grubuna sadece taze büyüme ortamı eklendi. Örnek grubuna *Ganoderma lucidum* ekstraktının IC₍₅₀₎ dozu ile muamele edildi. DMSO kontrol grubuna örnek grubunun içerdiği miktarda DMSO ile muamele edildi (Flasklar içerisindeki son volüm 3 ml'dir). Flasklar 48 saat inkübe edildikten sonra hücreler toplandı. Elde edilen hücre pelleti PBS ile iki kez yıkandı. Hücre pelletleri kitin içeriğindeki A solüsyonundan 250 µl ile süspanse edildi. Süspansiyon 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyonun ardından süspansiyona kit içeriğindeki B solüsyonundan 200 µl eklendi ve nazikçe pipetlendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 200 µl kit içeriğindeki +4 °C'de saklanan solüsyon C eklendi ve nazikçe pipetlendi. Süspansiyon karanlıkta +4 °C'de 15 dakika bekletildi. Ardından örnekler nazikçe vorteksenerek akış sitometride analiz edildi. Her bir analiz için 20000 hücre kullanıldı.

2.5. Migrasyon ve İnvazyon Analizi

Hücreler % 80 yoğunluğa eriştikten sonra toplandı ve sayıldı. 25 cm²'lik flasklara 20 x 10⁴ hücre 3 ml taze büyüme ortamı içerisinde ekildi. Bir gün hücrelerin flask yüzeyine yapışması için beklendi. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılıkları ve yoğunlukları kontrol edildi. Sağlıklı oldukları gözlenen hücreler migrasyon ve invazyon analizi çalışmalarında kullanıldı.

2.5.1. Migrasyon ve İnvazyon Analizinde Kullanılan Gereçler

- 24-Well Cell Migration and Invasion Assay Combo Kit (CytoSelect)

2.5.2. Migrasyon ve İnvazyon Analizinde Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (Thermo Multiskan-ex)
- Orbital Karıştırıcı (STUART S1500)

2.5.3. Migrasyon ve İnvazyon Analizi Protokolü

Ganoderma lucidum ekstraktı IC_{50} dozu ve eşit oranda DMSO ile muamele edilecek 2 grup hücre oluşturuldu. Hücreler migrasyon ve invazyon analizi için ekildikten bir gün sonra flasklardaki büyüme ortamı dökülerek uzaklaştırıldı. Hücreler serumsuz RPMI içerisinde bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler toplanarak serumsuz RPMI içerisinde 0.1×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda süspanse edildi. *Ganoderma lucidum* ekstraktı ve DMSO direkt olarak hücre süspanسیونuna eklendi ve pipetlendi. Migrasyon ve invazyon analizi için alt kısmı farklı membranlar ile kaplı iç kuyucuklar kullanıldı. 24 kuyucuklu plakta kuyucuklara 500 µl serumlu büyüme ortamı eklendi. Hücre süspanسیونlarından 300 µl alınarak migrasyon ve invazyon iç kuyucuklarına eklendi. Plaklar hücre kültürü inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plaklardaki iç kuyucuklar içerisindeki ortam pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. İç kuyucuklar içerisindeki göç etmeyen hücreler ucu steril su ile ıslatılmış steril pamuklu çubuklar ile silinerek uzaklaştırıldı. İç kuyucuklar içerisinde 400 µl hücre boyama solüsyonu (cell stain solution) bulunan temiz kuyucuklara aktarıldı ve 10 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından boyanmış iç kuyucuklar su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı. İç kuyucuklar ardından oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Her bir iç kuyucuk temiz bir kuyucuğa aktarıldı. Kuyucuklara 200 µl çıkarma tamponu (extraction buffer) eklendi ve 10 dakika orbital karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 rpm’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuktan iç kuyucuklar uzaklaştırıldı. Kuyucuklar içerisindeki örneklerden 100 µl alınarak 96 kuyucuklu plaklara aktarıldı. Örneklerin absorbansı 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaydedildi. Her bir örnek 3 tekrarlı çalışıldı. Absorbans değerleri Microsoft Excel yazılımı ile değerlendirilerek grafikleri çizildi.

2.6. İlaç Kombinasyon Analizleri

2.6.1. İlaç Kombinasyon Analizinde Kullanılan Gereçler

- Cell Counting Kit 8 (Sigma)
- Doksorubisin hidroklorid (Sigma)
- Tamoksifen sitrat (Sigma)

2.6.2. İlaç Kombinasyon Analizinde Kullanılan Cihazlar

- Orbital Karıştırıcı (STUART S1500)
- Spektrofotometre (Thermo Multiskan-ex)

2.6.3. İlaç Kombinasyon Analizi Protokolü

Hücreler toplanarak sayıldı. Hücre süspansiyonu konsantrasyonu 20×10^4 hücre/ml olacak şekilde taze büyüme ortamı ile seyreltildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 50 µl olacak şekilde dağıtıldı. Plaklar hücre kültürü inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.

G. lucidum ekstraktının iki farklı meme kanseri hücre hattındaki $IC_{(50)}$ dozunun 4 katı ayrı ayrı hazırlandı. Bu dozlardan büyüme ortamı kullanılarak 1/2 oranında ardışık seyreltme ile 5'er doz hazırlandı. Benzer şekilde tamoksifen ve doksorubisin için de $IC_{(50)}$ dozlarının 4 katından ardışık seyreltme ile 5'er doz hazırlandı.

96 kuyucuklu plaklara yatay ekseninde sağdan sola doğru 6 sütun boyunca *G. lucidum* ekstraktının dozları her bir kuyucuğa 25 µl olacak şekilde dağıtıldı. İlk sütuna 25 µl büyüme ortamı eklendi (*G.lucidum* ekstraktı doz: 0 µg/ml).

96 kuyucuklu plaklara dikey ekseninde aşağıdan yukarıya doğru 6 sıra boyunca kemoterapötik dozları her bir kuyucuğa 25 µl olacak şekilde dağıtıldı. En aşağıdaki ilk sıraya 25 µl büyüme ortamı eklendi (Kemoterapötik doz: 0 µM).

Her bir kombinasyon 5 tekrarlı çalışıldı (Her bir ilaç kombinasyonu için 5 farklı plak hazırlandı). Böylelikle genel kontrol grubunun canlılığı üzerinde ilaçların tekil ve

25 farklı doz kombinasyonunun etkilerinin istatistiksel analizi için gerekli kombinasyonlar gerçekleştirilmiş oldu.

Plaklar hücre kültürü inkübatöründe 48 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 10 µl WST-8 reaktifi eklenerek plaklar orbital karıştırıcıda 37 °C’de, 50 rpm’de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklarda meydana gelen turuncu renk değişimi gözlemlendiğinde, plaklar 560 nm eksitasyon /590 nm emisyon filtre seti kullanılarak spektrofotometrik olarak okundu. 30 dakika inkübasyon ardından genel kontrol grubunun absorbansı ortalama 0.6 değerine ulaşmayan plaklar 5’er dakika aralıklarla inkübe edilmeye devam edilerek bu aralıklarda absorbans değerleri kontrol edildi. Plaklardan elde edilen absorbans değerlerinden Microsoft Excel yazılımında yüzde canlılık verileri hesaplandı. Bu veriler MacSynergy II ve CalcuSYN (Biosoft, Ferguson, MO, USA) yazılımları kullanılarak ilaç kombinasyonlarının sinerjistik etkileşimleri belirlendi.

2.6.3.1. CalcuSyn ile İlaç Kombinasyon Analizi

MS Excel’de hesaplanan tekil ilaçların ve kombinasyonların dozları ve yüzde canlılık üzerine etkileri CalcuSyn Programına girildi. İlaçların tekil doz yanıtı eğrileri ve kombinasyon ilaç yanıtı eğrileri Chou ve Talalay’ın medyan etki prensibine göre hazırlandı. Bu verilerden kombinasyon index- etkilenen fraksiyon (combination index-fraction affected, CI-Fa) grafikleri çizildi. Kombinasyon indeks (CI) değerleri aşağıdaki gibi yorumlandı:

- $CI < 0,9$: Sinerjizm,
- $0,9 < CI < 1,1$: Aditif Etki,
- $CI > 1,1$: Antagonizm.

2.6.3.2. MAcSynergy II ile İlaç Kombinasyon Analizi

Dört plaktan elde edilen canlılık verileri Microsoft Excel’de değerlendirilerek yüzde canlılık değerleri elde edildi. Plak düzeni ve her bir tekil ilaç ve kombinasyon

dozuna karşılık gelen etki programa tanıtıldı. Program ile üç boyutlu doz cevap eğrileri çizildi. Tahmini aditif etkileşimler tekil ilaçların doz cevap eğrileri baz alınarak oluşturuldu. Hesaplanan aditif yüzey deneysel olarak elde edilen doz cevap yüzeyinden çıkarıldı. Oluşturulan üç boyutlu grafikte tahmini aditif yüzey y düzleminde 0 değerini ifade etmektedir. Bu yüzeyin üzerinde kalan piklerin karşılık geldiği dozlar sinerjistik, altında kalan piklere karşılık gelen doz kombinasyonları antagonistik olarak değerlendirildi. Doz-cevap verileri % 95 güven aralığında değerlendirilerek üç boyutlu grafik çizilmiştir.

2.5. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Canlılık tayininde her bir dozun DMSO uygulanmış kontrolüne göre yüzde canlılık inhibisyonu Microsoft Excel’de hesaplandı. Uygulama yapılmamış hücrelere göre ekstrakt uygulanmış hücre gruplarındaki canlılık inhibisyonundaki istatistiksel anlamlılık post test ile birlikte tek yönlü ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi. Apoptoz, hücre döngüsü, migrasyon ve invazyon tayinlerinde istatistiksel anlamlılık t testi ile belirlendi. Tüm grafikler Microsoft Excel yazılımı ile çizildi. Test sonuçları değerlendirilirken 0.05’in altındaki p değerleri anlamlı kabul edildi ($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***)).

3. BULGULAR

3.1. Canlılık Tayini Sonuçları

Ganoderma lucidum makro-mantarından elde edilen altı ekstraktın MCF7 östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücre hattı ile MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında canlılık inhibisyonu üzerine etkileri WST-8 [2-(2-metoksil-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum,monosodyum tuzu] reaktifi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunun için Cell Counting Kit 8 (Sigma) ticari kiti kullanılmıştır.

3.1.1. *Ganoderma lucidum* Ekstratlarının MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Ganoderma lucidum ekstratlarının MCF-7 östrojen pozitif meme kanseri hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için altı farklı *G. lucidum* ekstraktının her birinden ardışık seyreltme ile altı doz hazırlandı. Her bir dozun içerdiği DMSO miktarı kadar DMSO içeren altı kontrol dozu hazırlandı. DMSO kontrol dozlarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi için uygulama yapılmamış hücre grubu “non-treated” kullanıldı. *G. lucidum* dozları ve genel kontrol altı tekrarlı, DMSO kontrol dozları dört tekrarlı çalışıldı. İçerisinde sadece büyüme ortamı bulunan altı kuyucuk kör olarak kullanıldı. Her bir ekstraktın üç farklı zaman noktasında (24, 48 ve 72 saat) hücre canlılığı üzerine etkileri belirlendi.

Tipik olarak *G. lucidum* ekstraktları canlılık üzerine etkilerini 10-100 µg/ ml doz aralığında gösterdi. MCF-7 hücreleri *G. lucidum* ekstraktları ile 24 saat inkübe edildikten sonra 100 µg/ ml dozunda eter ekstraktının hücre canlılığı üzerinde bir etkisi gözlenmezken (% 1.6 canlılık inhibisyonu), etil asetat, etanol ve etanol-su ekstraktlarının sırası ile % 12, % 13 ve % 13 oranında canlılık inhibisyonuna yol açtığı belirlendi. Bunlara karşın, 24 saat inkübasyonun ardından en yüksek dozda metanol ve su ekstraktlarının MCF-7 hücre canlılığını sırası ile % 7 ve % 49 oranında artırdığı belirlendi.

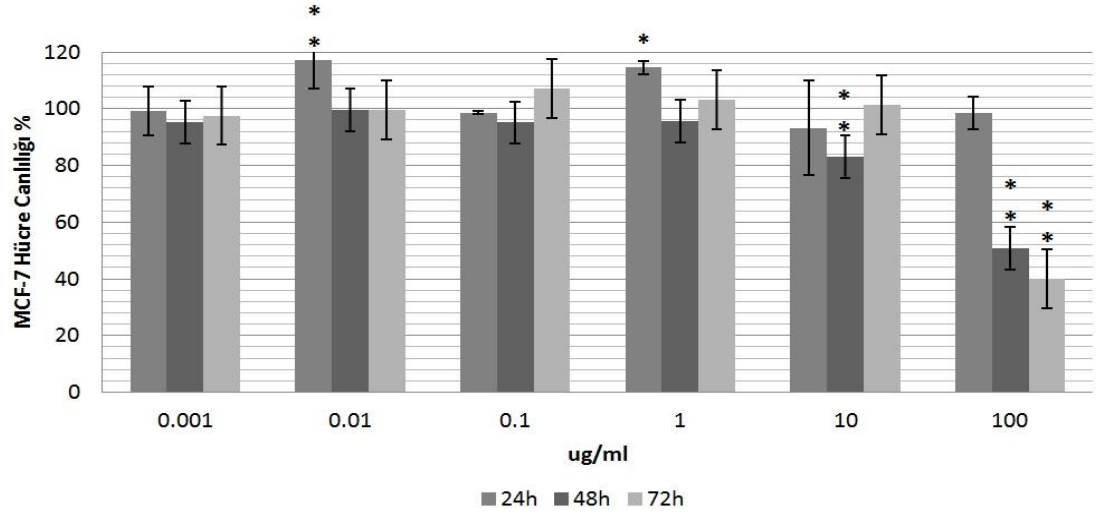
MCF-7 hücrelerinin *G. lucidum* ekstraktları ile 48 saat inkübasyonunun ardından yapılan analizde en yüksek dozda eter ekstraktı hücre canlılığını % 50 oranında inhibe ederken, metanol, etil asetat, etanol ve su ekstraktları sırası ile hücre canlılığını % 45, % 32, % 26 ve % 35 oranında inhibe etti.

72 saatin sonunda yapılan canlılık analizi sonucunda eter ekstraktı % 61, metanol ekstraktı % 45, etilasetat ekstraktı % 52, etanol ekstraktı % 14, su ekstraktı % 21 canlılık inhibisyonuna sebep oldu.

Ganoderma lucidum eter ekstraktının 48 ve 72. saatte sırası ile 100 µg/ml ve 12,82 µg/ml IC₍₅₀₎ dozu ile diğer ekstraktlara göre canlılık inhibisyonunda daha etkili olduğu bulundu. MCF-7 hücrelerinde gerçekleştirilen diğer deneylerde eter ekstraktının 48. saatteki IC₍₅₀₎ dozu (100 µg/ml) kullanıldı.

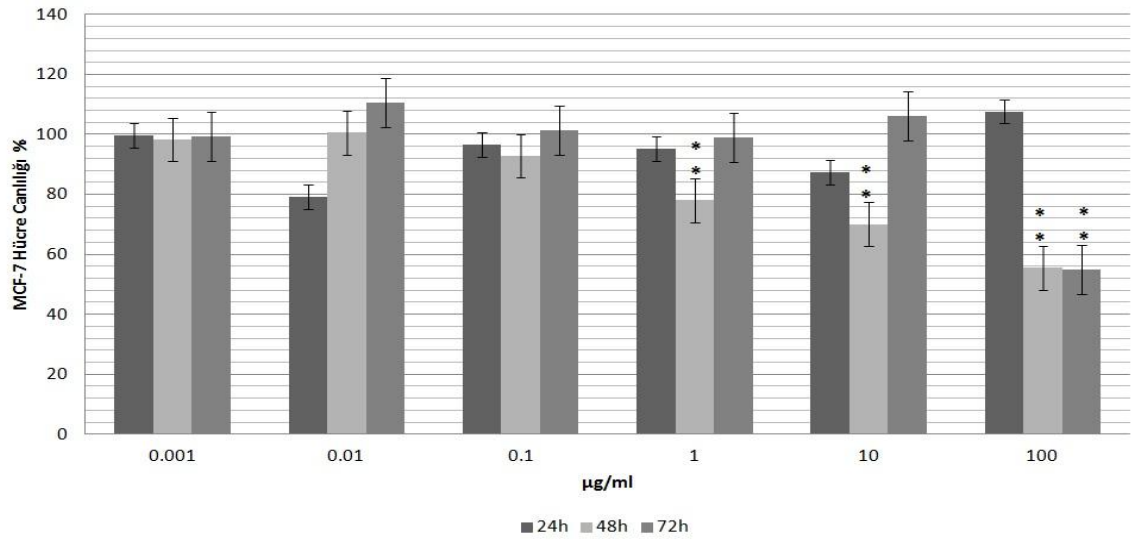
Ganoderma lucidum ekstraktlarının MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri Grafik 1-6'da gösterilmiştir.

Eter Ekstraktı



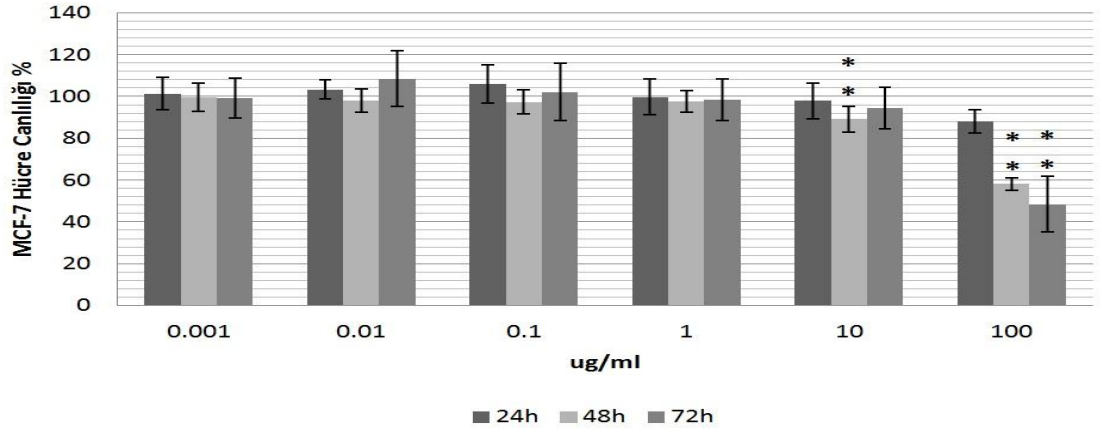
Grafik 1. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Metanol Ekstraktı



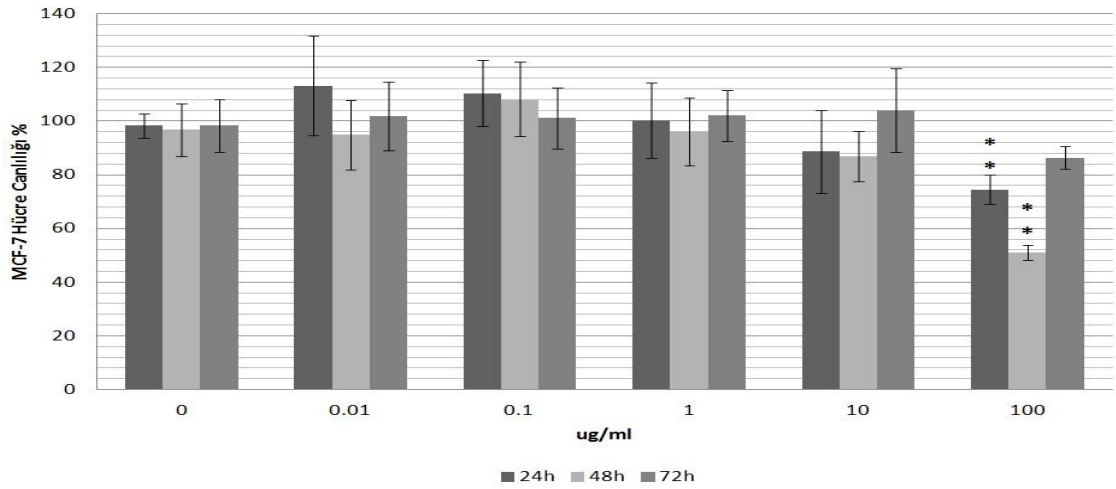
Grafik 2. *Ganoderma lucidum* metanol ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

Etilasetat Ekstraktı



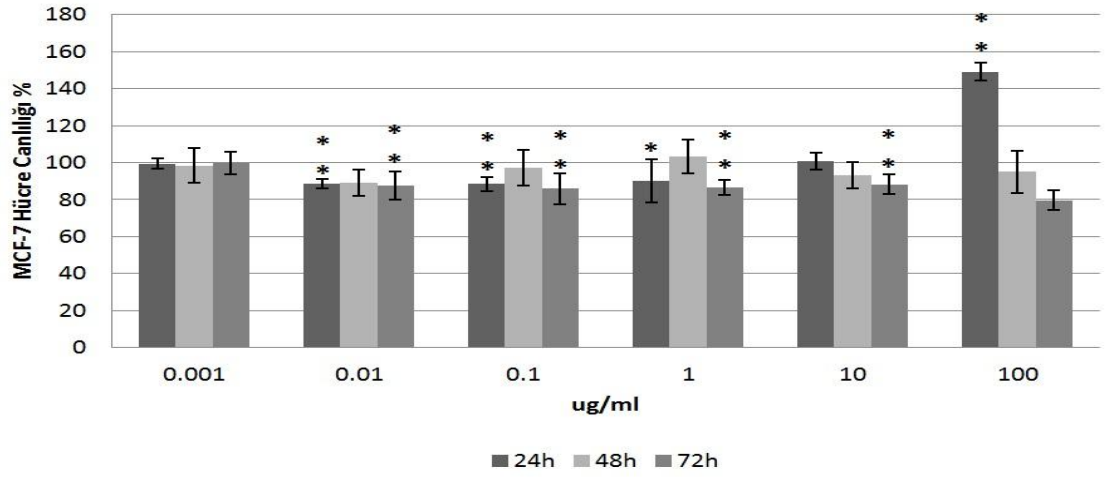
Grafik 3. *Ganoderma lucidum* etilasetat ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

Etanol Ekstraktı



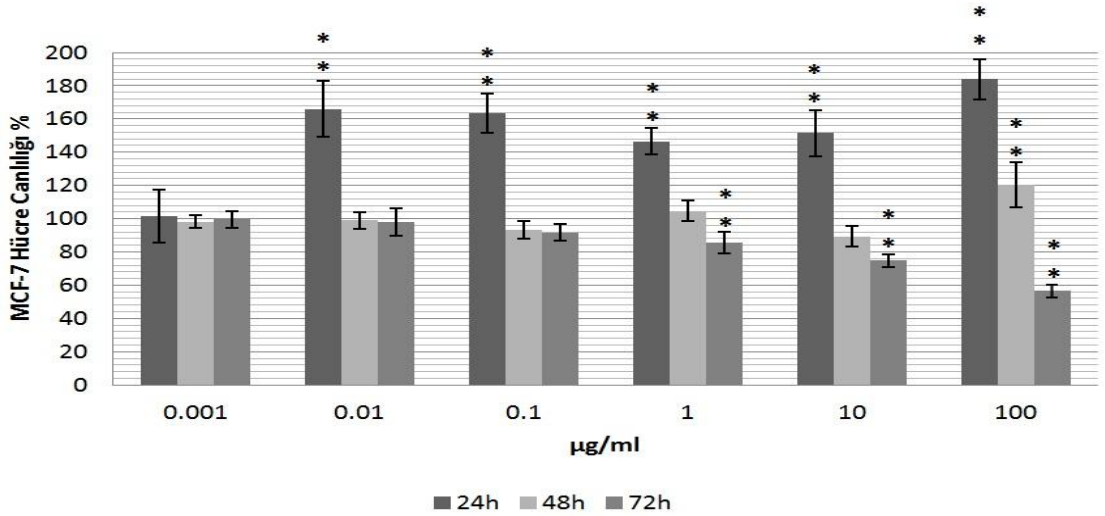
Grafik 4. *Ganoderma lucidum* etanol ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

Su Ekstraktı



Grafik 5. *Ganoderma lucidum* su ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

Etanol-Su Ekstraktı



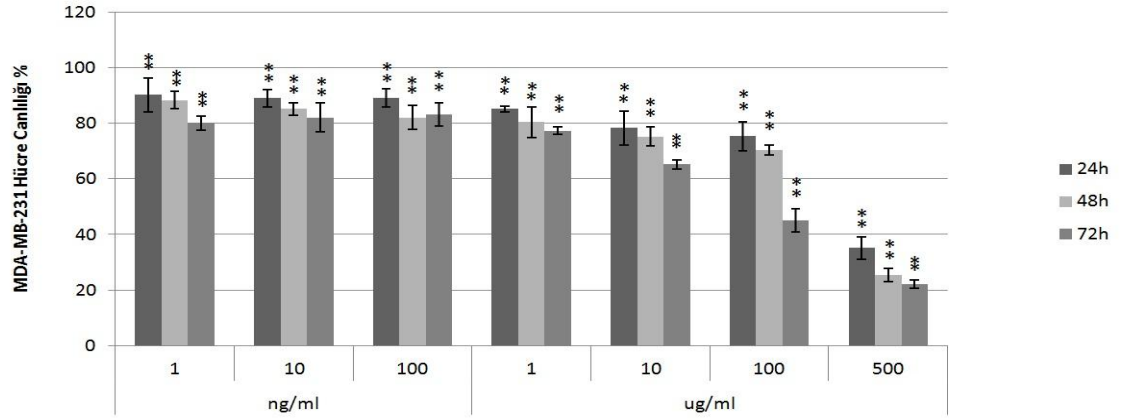
Grafik 6. *Ganoderma lucidum* etanol-su ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

3.1.2. *Ganoderma lucidum* Ekstratlarının MDA-MB-231 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Ganoderma lucidum ekstratlarının MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için altı farklı *G. lucidum* ekstraktının her birinden ardışık seyreltme ile altı doz hazırlandı. Her bir dozun içerdiği DMSO miktarı kadar DMSO içeren altı kontrol dozu hazırlandı. DMSO kontrol dozlarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi için uygulama yapılmamış hücre grubu (non-treated) kullanıldı. *G. lucidum* dozları ve genel kontrol altı tekrarlı, DMSO kontrol dozları dört tekrarlı çalışıldı. İçerisinde sadece büyüme ortamı bulunan altı kuyucuk kör olarak kullanıldı. Her bir ekstraktın üç farklı zaman noktasında (24, 48 ve 72 sa.) hücre canlılığı üzerine etkileri belirlendi. MDA-MB-231 hücre hattında ekstraktların etkileri MCF-7 hücrelerine göre düşük olduğundan dolayı en yüksek doz olarak 500 µg/ml olacak şekilde ek bir doz çalışıldı.

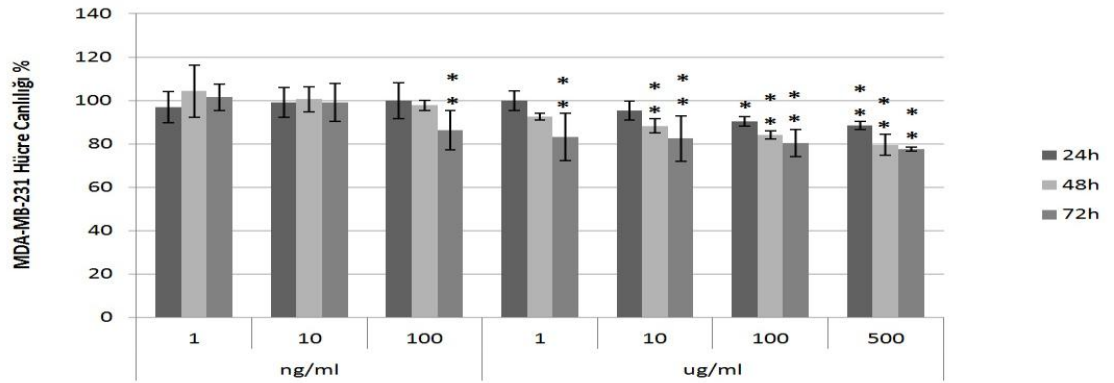
Etilasetat ve eter ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre MDA-MB-231 hücre hattında daha etkili olduğu gözlemlendi. Eter ekstraktının 48. saatte IC₍₅₀₎ dozunun 250 µg/ml, 72. saatte ise 150 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında *Ganoderma lucidum* ekstraktlarının hücre canlılığı üzerine etkileri Grafik 7-12’de gösterilmektedir.

Eter Ekstraktı



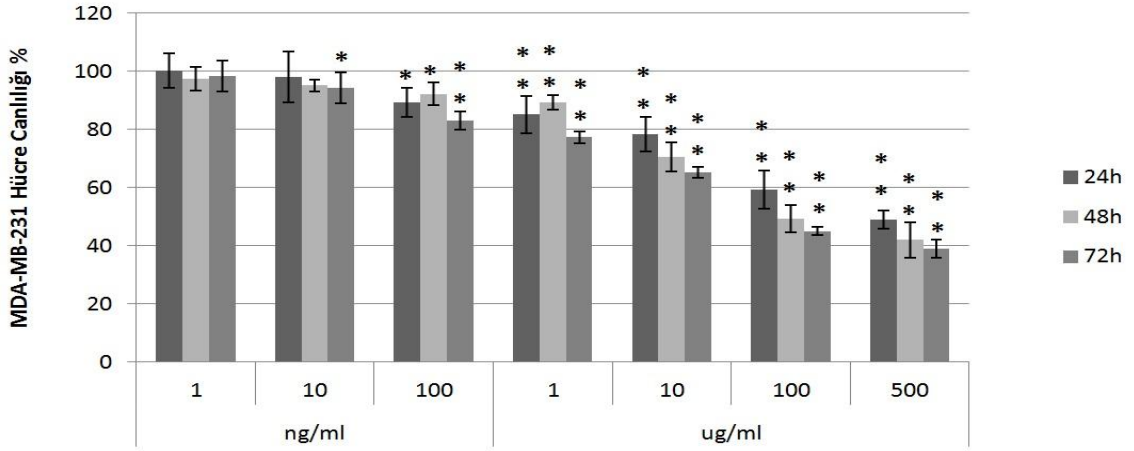
Grafik 7. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

Metanol Ekstraktı



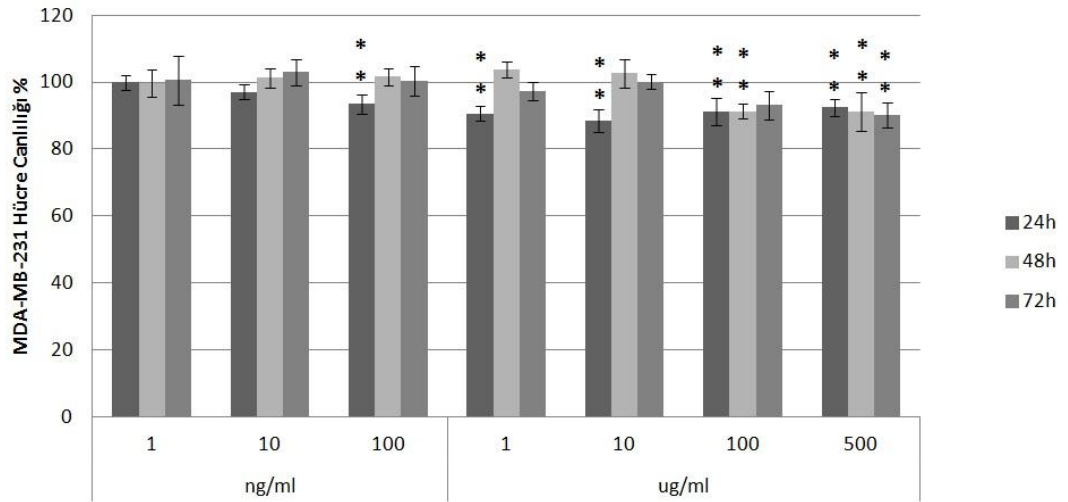
Grafik 8. *Ganoderma lucidum* metanol ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Etilasetat Ekstraktı



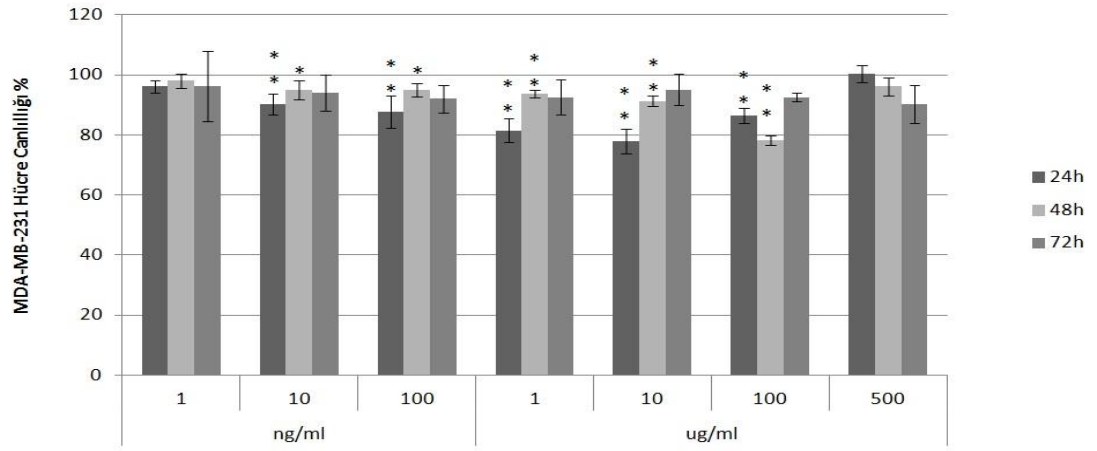
Grafik 9. *Ganoderma lucidum* etilasetat ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. * p <0.05, ** p <0.01.

Etanol Ekstraktı



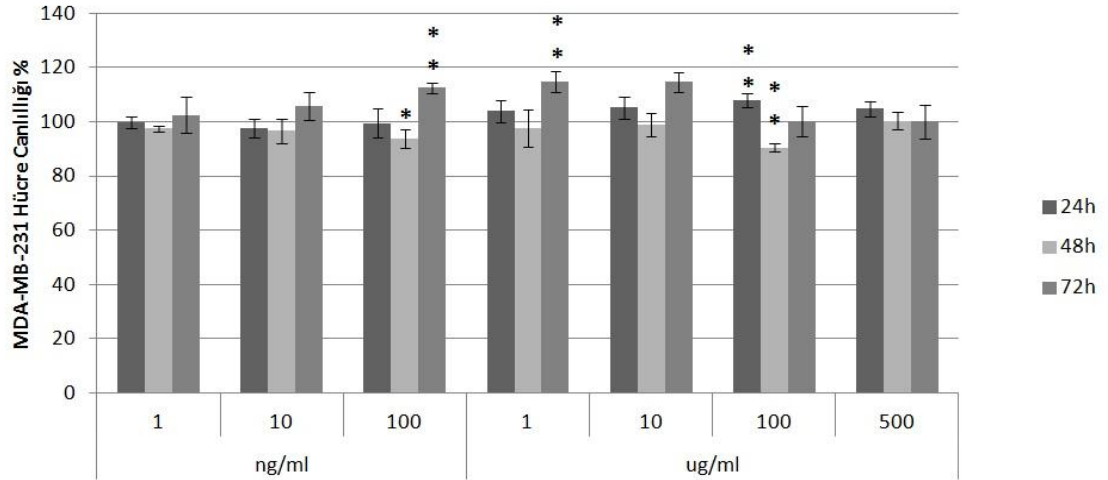
Grafik 10. *Ganoderma lucidum* etanol ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. * p <0.05, ** p <0.01.

Su Ekstraktı



Grafik 11. *Ganoderma lucidum* su ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. * p < 0.05, ** p < 0.01.

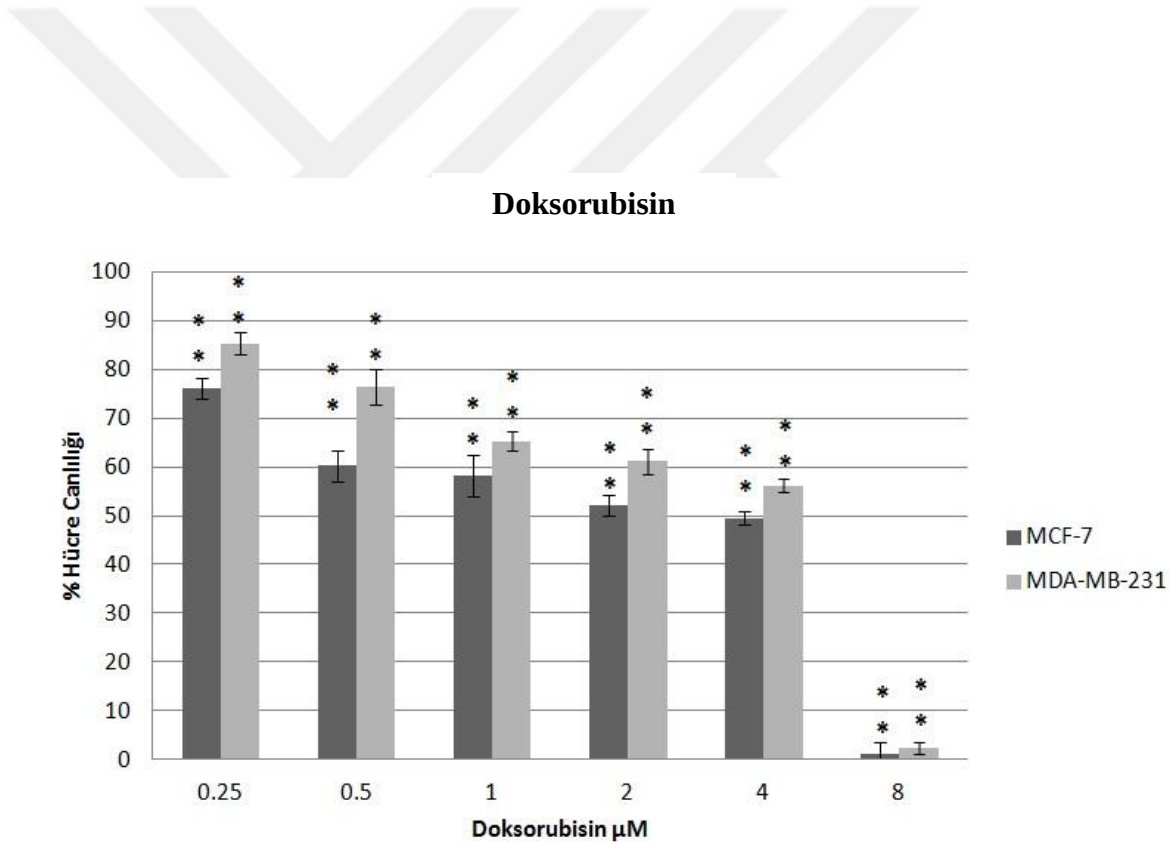
Etanol-Su Ekstraktı



Grafik 12. *Ganoderma lucidum* etanol-su ekstraktının MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

3.1.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattında Doksorubisinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

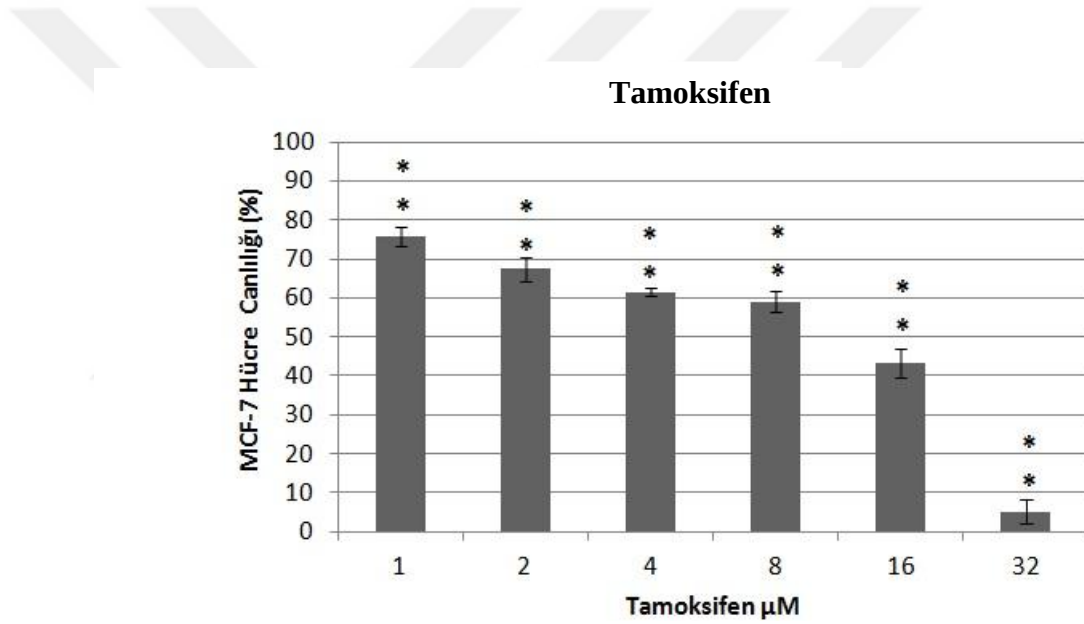
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ½ seyreltme ile hazırlanan doksorubisin dozları ile 48 saat inkübe edildikten sonra canlılık grafiği Microsoft Excel’de oluşturuldu (Grafik 13). MCF-7 hücrelerinin 48 saat doksorubisin ile inkübasyonu sonucunda yapılan incelemede doksorubisinin MCF-7 hücre hattında IC₍₅₀₎ dozunun 4µM olduğu, MDA-MB-231 hücre hattında ise 6 µM olduğu bulunmuştur.



Grafik 13. Doksorubisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında 48. saatte hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p < 0.01.

3.1.4. MCF-7 Hücre Hattında Tamoksifenin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MCF-7 hücreleri ½ seyreltme ile hazırlanan tamoksifen dozları ile 48 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılık grafiği Microsoft Excel’de oluşturuldu (Grafik 14). Tamoksifenin MCF-7 hücre hattında 48. saatte IC₍₅₀₎ dozunun 12.95 µM olduğu belirlendi.

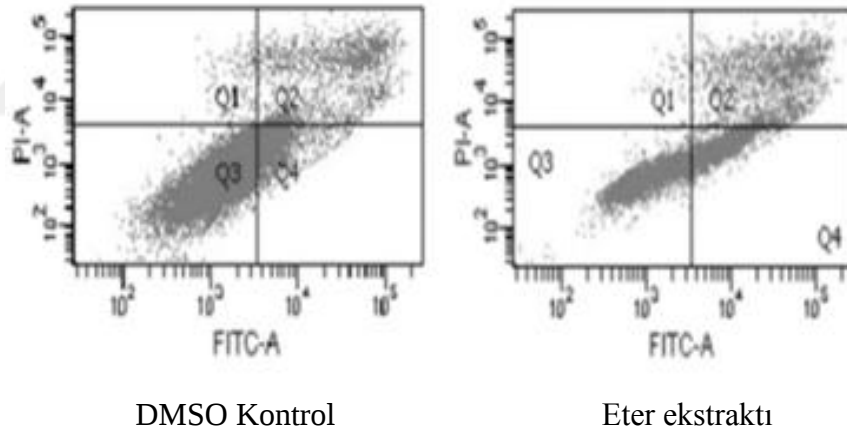


Grafik 14. Tamoksifenin MCF-7 meme kanseri hücre hattında 48. saatte hücre canlılığı üzerine olan etkileri. ** p <0.01.

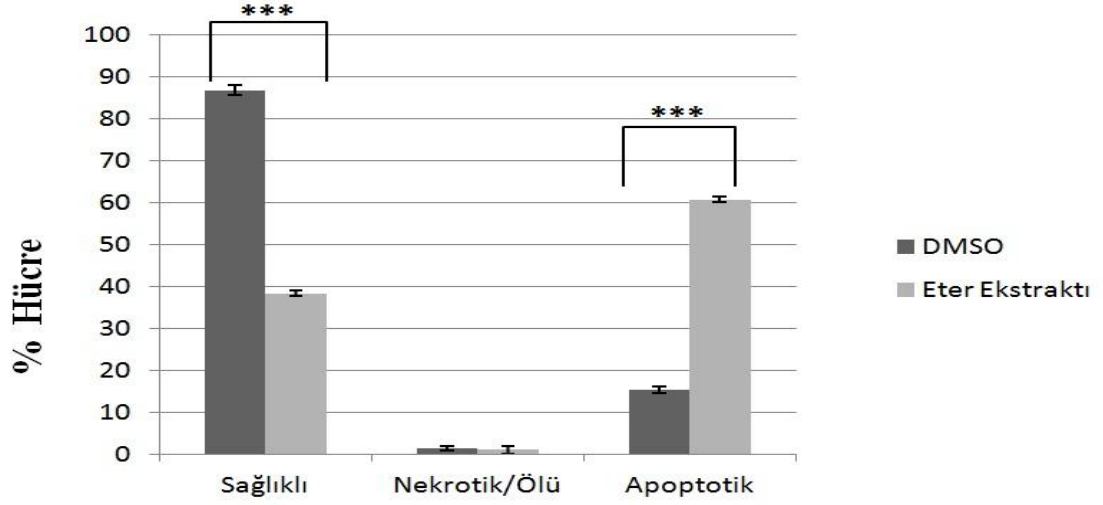
3.2. Akış Sitometri Analiz Sonuçları

3.2.1. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Eter Ekstraktının Apoptoz Üzerine Etkileri

MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulaması 48. saatte hücrelerde % 45.4 oranında apoptozu tetiklemiştir. Eter ekstraktı apoptotik hücelere karşılık gelecek şekilde ($p<0.0001$) DMSO kontrole göre sağlıklı hücre sayısında % 48.5 oranında bir düşüşe sebep olmuştur ($p<0.0001$). Eter ekstraktının nekrotik hücre oranı üzerine anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (%1.4'lük düşüş, $p=0.5661$), (Şekil 4, Grafik 15).



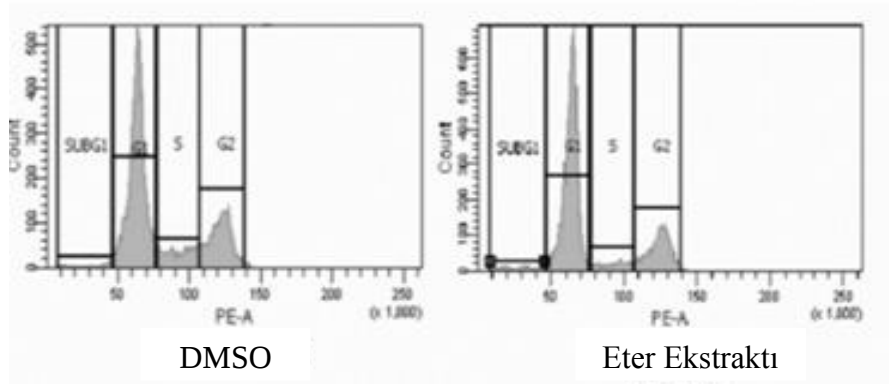
Şekil 4. MCF-7 hücrelerine 100µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri, DMSO kontrol ekstrakt verilen hücelere eşit oranda DMSO uygulanan hüceleri belirtmektedir. X eksenini FITC, Y eksenini propidiyum iyodür'e ait floresan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q1) nekrotik ya da ölü hücreleri ifade etmektedir.



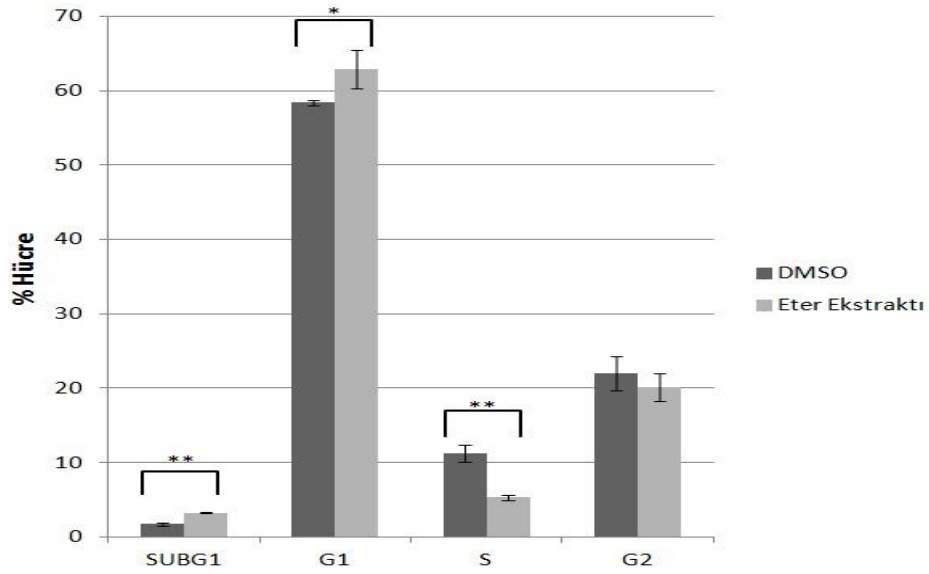
Grafik 15. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmektedir.

3.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Eter Ekstraktının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri

MCF-7 hücrelerinin eter ekstraktı ile inkübe edilmesi SubG1 ve G1 safhasında bulunan hücre popülasyonlarına ait hücre sayısında sırası ile % 1.5 ve % 4.5 oranında artışa, S ve G2 fazındaki hücre sayısında ise sırası ile % 5.9 ve % 1.9 oranında azalmaya sebep olmuştur (SubG1: $p=0.0003$, G1: $p=0.04$ S: $p=0.0009$, G2: $p=0.3$), (Şekil 5, Grafik 16).



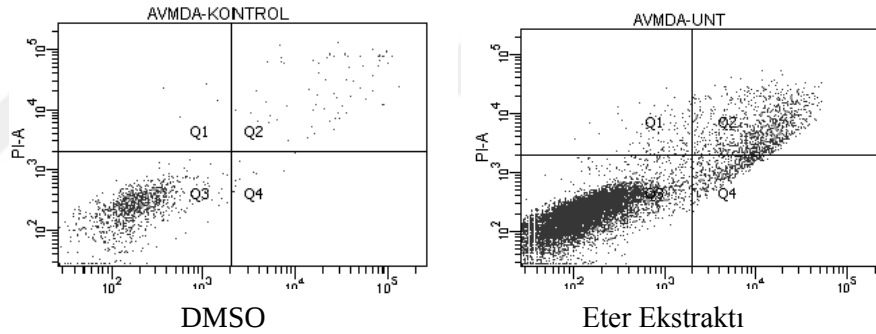
Şekil 5. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri ifade etmektedir. Grafiklerde pikler hücre sayısını ifade etmektedir. X eksenı propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasın sinyali göstermektedir. Y eksenı ise hücre sayısını belirtmektedir.



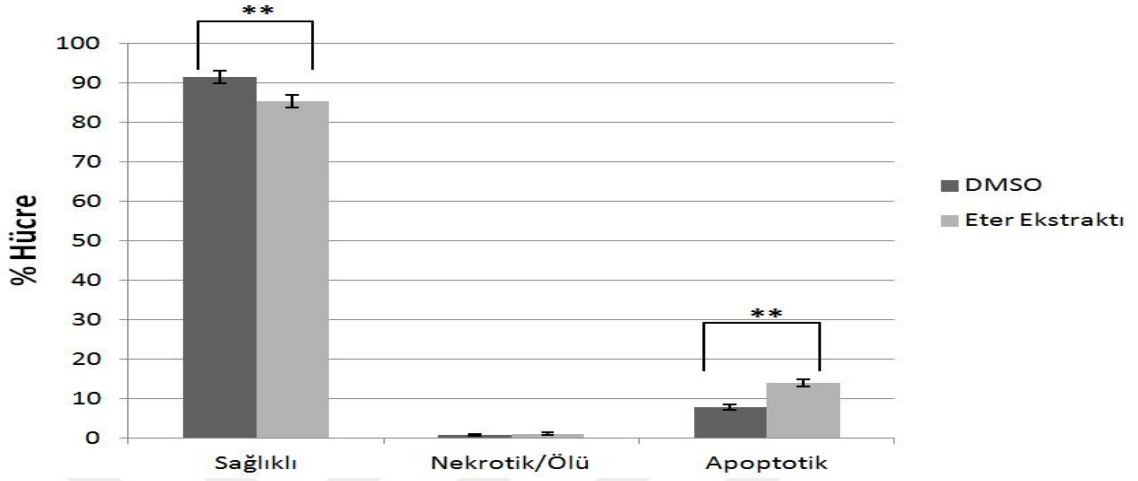
Grafik 16. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmektedir.

3.2.3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Apoptoz Üzerine Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulaması 48. saatte hücrelerde % 6.04 oranında apoptozu tetiklemiştir. Eter ekstraktı apoptotik hücrelere ($p=0.0007$) karşılık gelecek şekilde DMSO kontrole göre sağlıklı hücre sayısında % 6 oranında bir düşüşe sebep olmuştur ($p=0.0083$). Nekrotik hücre oranında ise % 0.4'lük bir artış gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.4052$), (Şekil 6, Grafik 17).



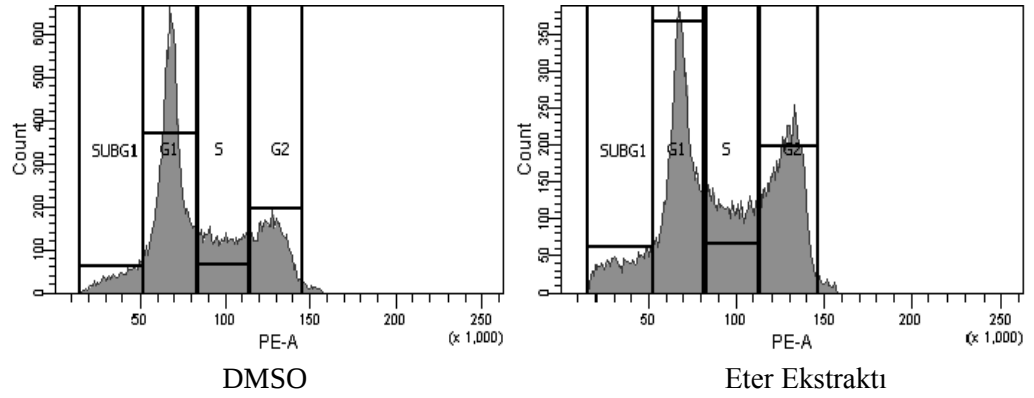
Şekil 6. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri, DMSO kontrol ekstrakt verilen hücrelere eşit oranda DMSO uygulanan hücreleri belirtmektedir. X eksenini FITC, Y eksenini propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q1) nekrotik ya da ölü hücreleri ifade etmektedir.



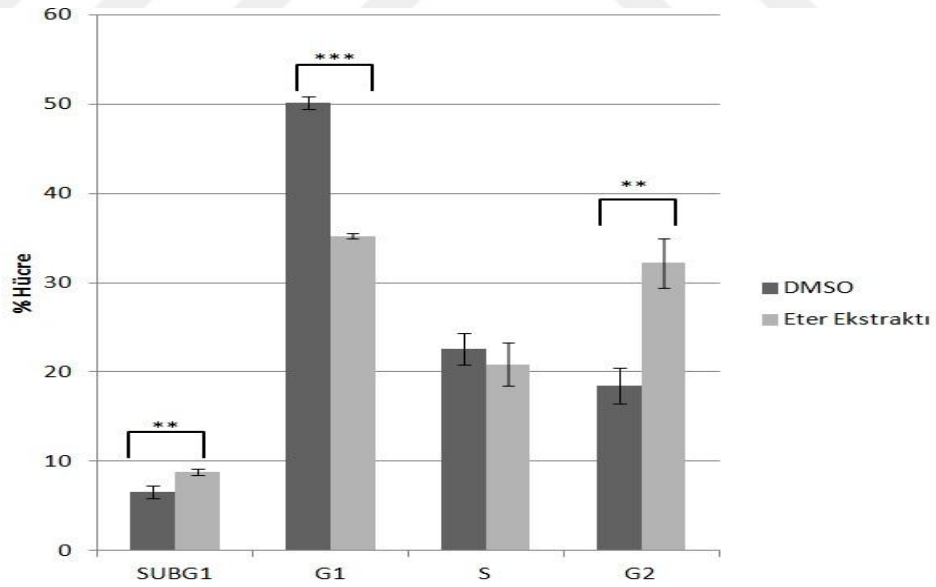
Grafik 17. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının 48. saatte apoptoz üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmektedir
 ** p < 0.01.

3.2.4. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri

MDA-MB-231 hücrelerinin eter ekstraktı ile inkübe edilmesi SubG1 ve G2 safhasında bulunan hücre popülasyonlarına ait hücre sayısında sırası ile % 2.3 ve % 13.7 oranında artışa, S ve G1 fazındaki hücre sayısında ise sırası ile % 1.8 ve % 14.9 oranında azalmaya sebep olmuştur. S fazındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken (p=0.3634), SubG1 ve G2 fazındaki artış ile G1 fazındaki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (SubG1: p= 0.0064, G1: p<0.0001, G2:p=0.0021), (Şekil 7, Grafik 18).



Şekil 7. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstrektı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri. Kontrol uygulama yapılmamış hücreleri ifade etmektedir. Grafiklerde pikler hücre sayısını ifade etmektedir. X eksenı propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenı ise hücre sayısını belirtmektedir.

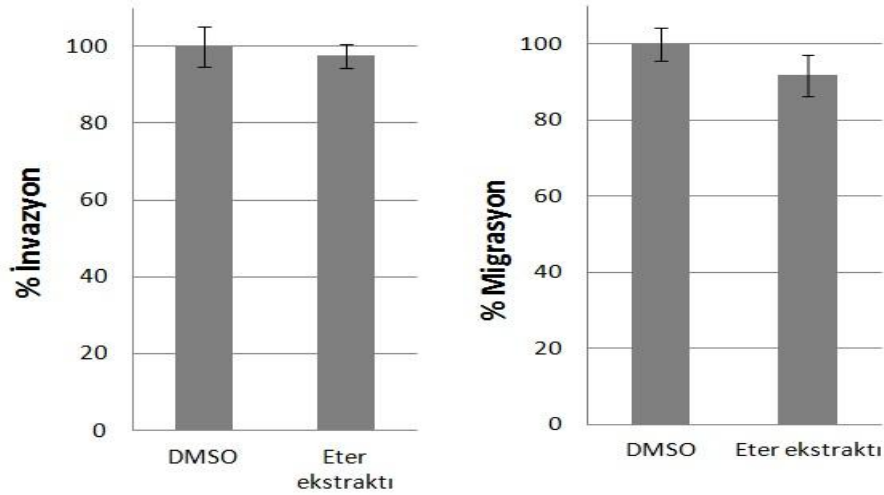


Grafik 18. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstrektı uygulamasının 48. saatte hücre döngüsü üzerine etkileri grafiksel olarak ifade edilmiştir.
 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

3.3. Migrasyon ve İnvazyon Analizi Sonuçları

3.3.1. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkileri

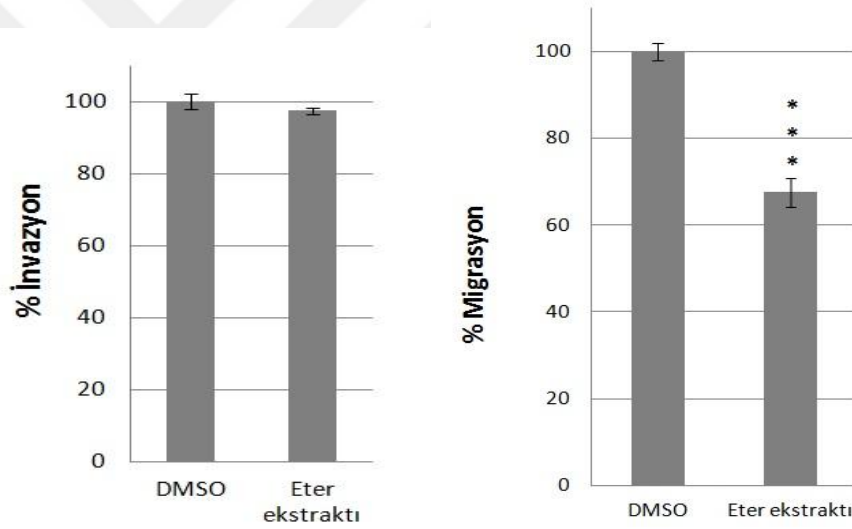
Eter ekstraktının MCF-7 hücre motilitesi üzerine etkileri Boyden Chamber kullanılarak belirlendi. Boyden Chamber sistemi kanser hücrelerinin 24 saat içerisindeki migrasyon oranını ve 48 saat içerisindeki invazyon oranını ölçebilecek bir yöntemdir. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı MCF-7 hücrelerinin Boyden Chamber membranından invazyon ve migrasyon ile geçen hücre sayısını sırası DMSO kontrole göre ile % 2.5 ve % 8.2 oranında azaltmıştır. Fakat hücre mobilitesindeki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (migrasyon: $p=0.1065$, invazyon: $p=0.5244$) (Grafik 19).



Grafik 19. MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının hücrelerin migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri.

3.3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkileri

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 250 µg/ml eter ekstraktı ile inkübasyonu sonucunda eter ekstraktının DMSO kontrole göre % 32.52 oranında hücre migrasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği ($p=0.0001$), fakat hücre invazyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ($p=0.1320$, % 2.49) bulunmuştur (Grafik 20).



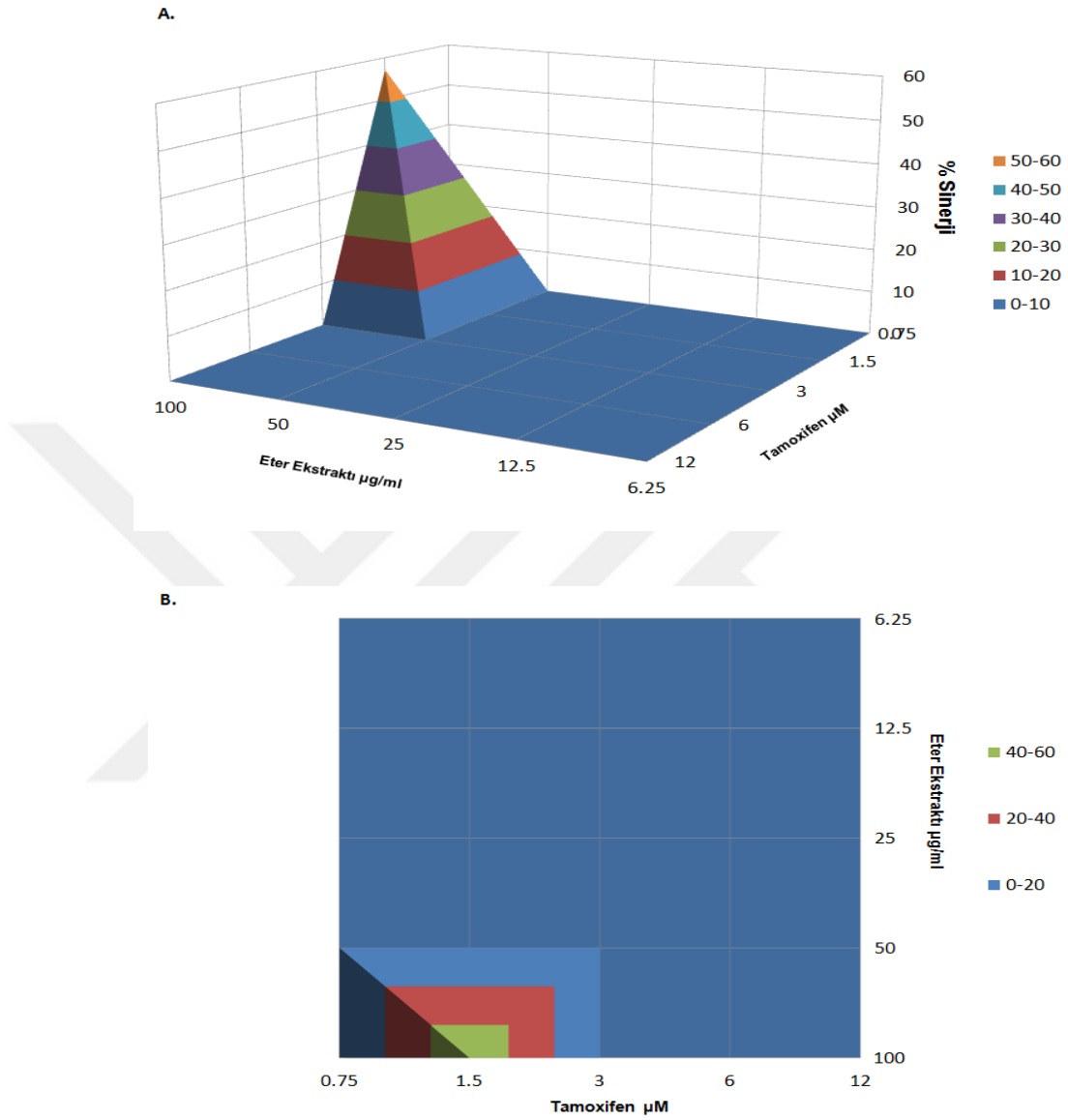
Grafik 20. MDA-MB-231 hücrelerine 250 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulamasının hücrelerin migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri. *** $p < 0.001$.

3.4. İlaç Kombinasyon Analizlerinin Sonuçları

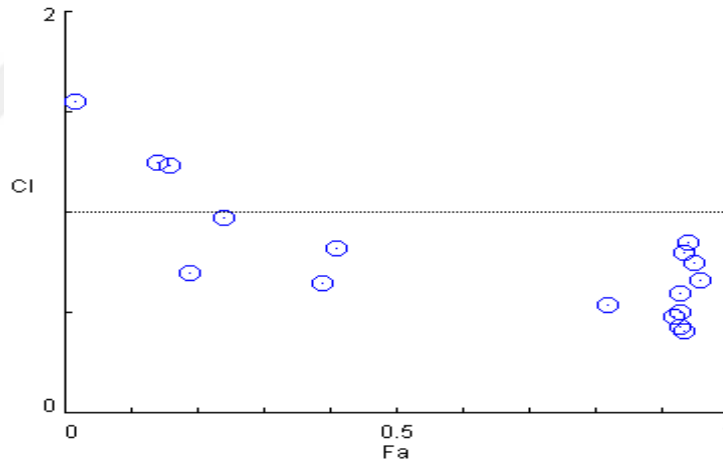
Ganoderma lucidum eter ekstraktı ile tamoksifen ve doksorubisin arasındaki etkileşimler CalcuSyn ve MacSynergy II yazılımlarına ait algoritmalar kullanılarak değerlendirildi.

3.4.1. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Tamoksifen ile Kombinasyonu

Ganoderma lucidum eter ekstraktının MCF-7 hücre hattında tamoksifen ve doksorubisinin canlılık inhibisyonu üzerine etkilerini artırıp artırmadığını belirlemek amacıyla kemoterapötik-eter ekstraktı kombinasyonlarının doz yanıtları kombinasyon index analizi (combination index analysis) ve MacSynergy II ile değerlendirildi. MacSynergy II kullanım klavuzuna göre % 95 güven aralığında belirlenen sinerji piklerinin sinerji değerleri $50 \mu\text{M}^2\%$ ve $100 \mu\text{M}^2\%$ (log değerleri >5 and < 9) ise ılımlı sinerjik etkiyi belirtmekte ve bu sinerjik etkinin *in vivo* ortamda da etkili olabileceği öngörülmektedir. Şekil 5 A ve B' de görüldüğü üzere *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyonuna ait % 95 güven aralığındaki sinerji pikleri ılımlı sinerjik etkileşim göstermektedir (sinerji değeri: $57.12 \mu\text{M}^2 \%$, log değeri: 5.18). Eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyon dozlarının hiçbirinde antagonistik etki gözlenmemiştir (antagonizm değeri: $0 \mu\text{M}^2\%$).



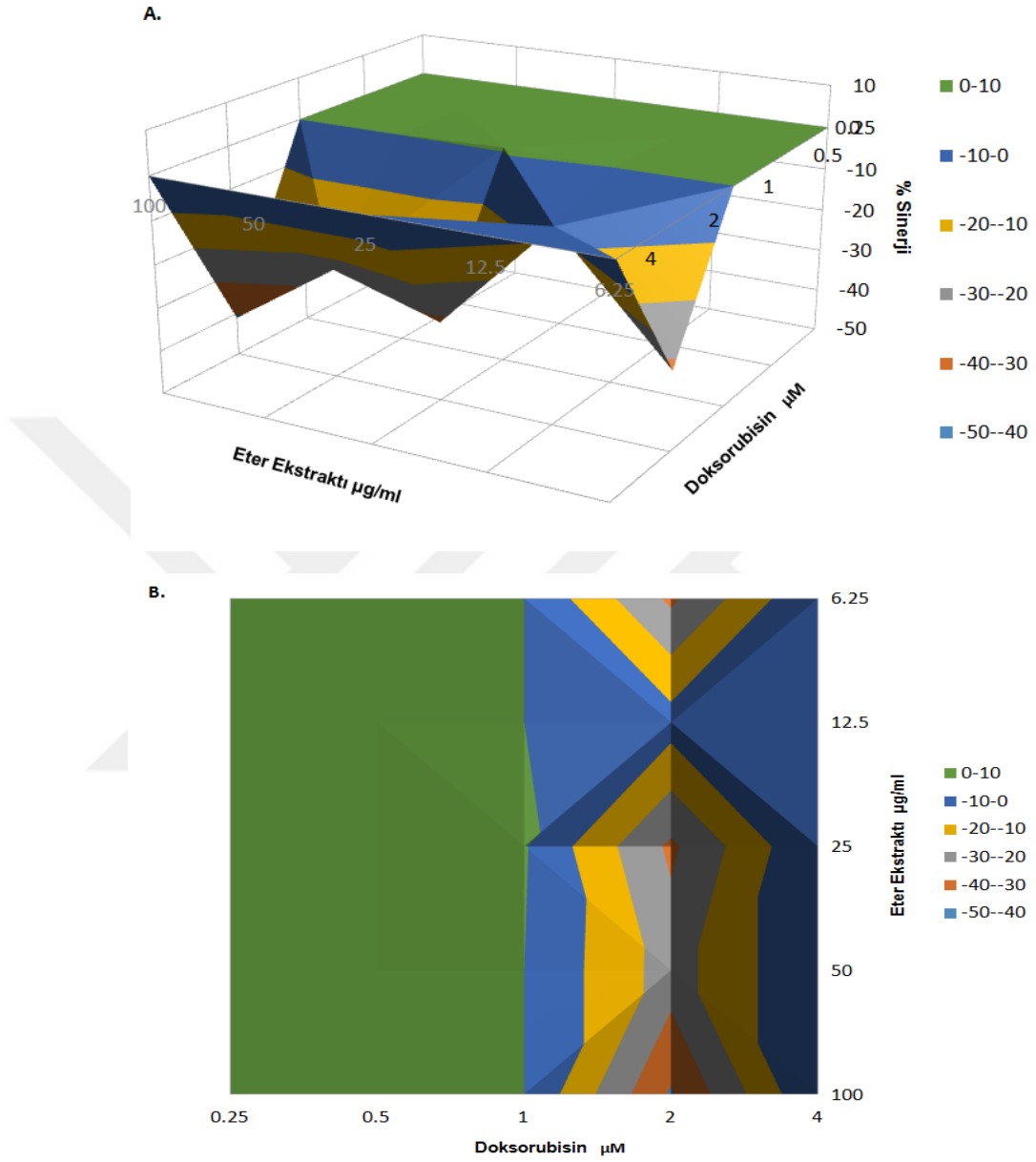
Grafik 21’de CalcuSyn yazılımı ile gerçekleştirilen kombinasyon indeks analizine ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon (CI-Fa) grafiği gösterilmektedir. Grafikte birçok doz kombinasyonunun sinerjik etkiyi ifade eden CI değerinin ‘0.9 değerinden düşük’ olduğu görülmektedir. Bununla birlikte CI değerleri incelendiğinde en düşük ve bazı yüksek tamoksifen konsantrasyonları içeren kombinasyonlarda CI değerinin genellikle antagonistik etkiyi ifade eden ‘1.1 değerinin üzerinde’ olduğu belirlenmiştir. Fakat bu antagonistik etkileşimler MacSynergy II yazılımına göre anlamlı olmayıp aditif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5).



Grafik 21: *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. CI değerleri şu şekilde değerlendirilir: $CI < 0.9$: Sinerjizm, $0.9 < CI < 1.1$: Aditif Etki, $CI > 1.1$: Antagonizm.

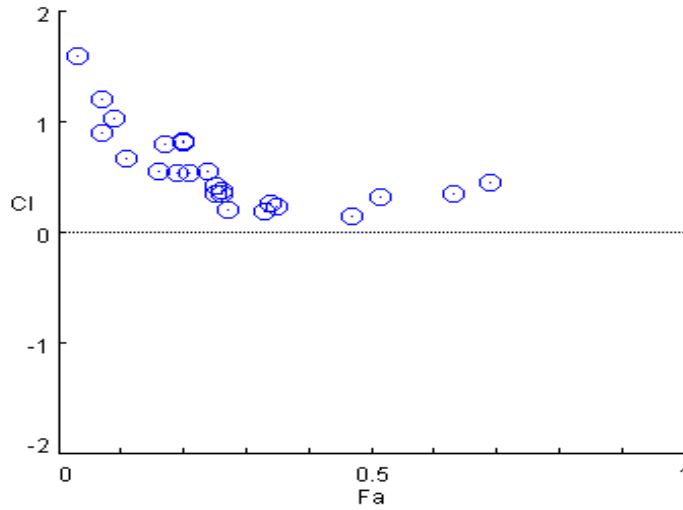
3.4.2. MCF-7 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Doksorubisin ile Kombinasyonu

Tamoksifen-*Ganoderma lucidum* eter ekstraktı kombinasyon verilerinin aksine, MacSynergy II yazılımı kullanılarak yapılan değerlendirme sonucunda eter ekstraktı-doksorubisin kombinasyonları yüksek oranda antagonistik bulunmuştur. Şekil 9A ve B’de doksorubisin-eter ekstraktı kombinasyonlarının % 95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri kuvvetli antagonistik etkiyi göstermektedir (sinerji değeri: 0.7 uM²%, log değeri: 0.06; antagonizm değeri: -135.08 uM²%, log değeri: -12.24). MacSynergy II kullanım kılavuzunda belirtildiği üzere antagonizm değerinin -100 uM²%’  n altında bulunması kuvvetli antagonistik etkiyi belirtmekte ve bu kombinasyonların *in vivo* ortamda da benzer etki gösterebileceği öngörülmektedir.



Şekil 9. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ve doksorubisin kombinasyonlarına ait % 95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri (A) ve kontür pikleri (B) şekilde gösterilmiştir. Teorik aditif yüzey (% 0 beklenen inhibisyon) Bliss bağımsızlık matematik modeli'ne dayanılarak MacSynergy II yazılımı ile hesaplanmıştır. Pikler hesaplanan aditif yüzeyin (grafikte x ekseninde 0 değeri olarak gösterilmiştir) üzerinde ise sinerjizm, altında ise antagonizmi ifade etmektedir.

Calculusyn yazılımı ile gerçekleştirilen kombinasyon indeks analizi sonucunda elde edilen veriler MacSynergy II yazılım sonuçları ile uyumlu olarak eter ekstraktı ile doksorubisin arasında kuvvetli antagonistik etki varlığını göstermektedir. Grafik 22’te görüleceği üzere eter ekstraktı-doksorubisin kombinasyon dozlarının hepsinin antagonistik ($CI > 1.1$: Antagonizm) etkileşim göstermektedir.

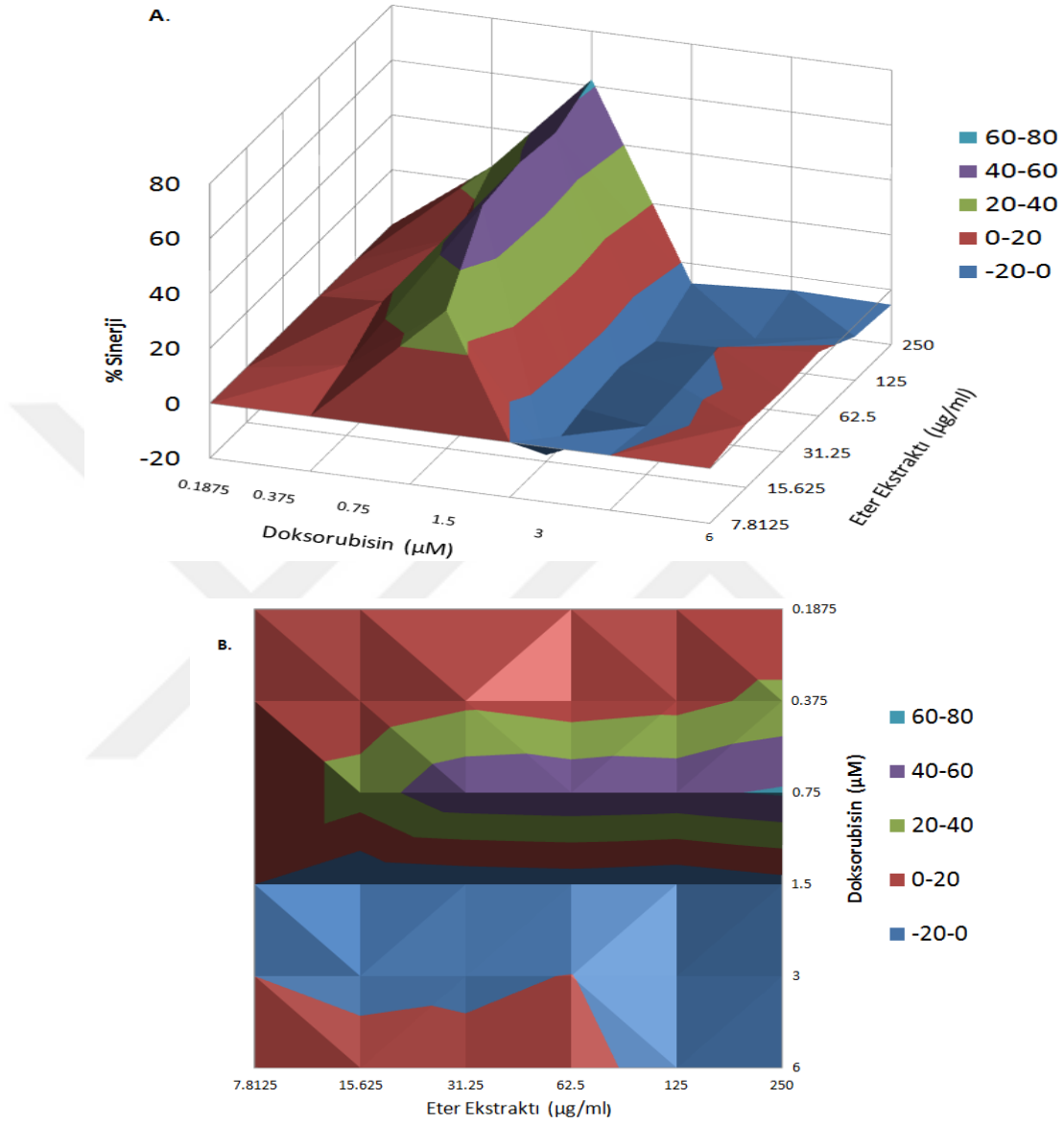


Grafik 22: *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ile tamoksifen kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. CI değerleri şu şekilde değerlendirilir: $CI < 0.9$: Sinerjizm, $0.9 < CI < 1.1$: Aditif Etki, $CI > 1.1$: Antagonizm.

3.4.3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Eter Ekstraktının Doksorubisin ile Kombinasyonu

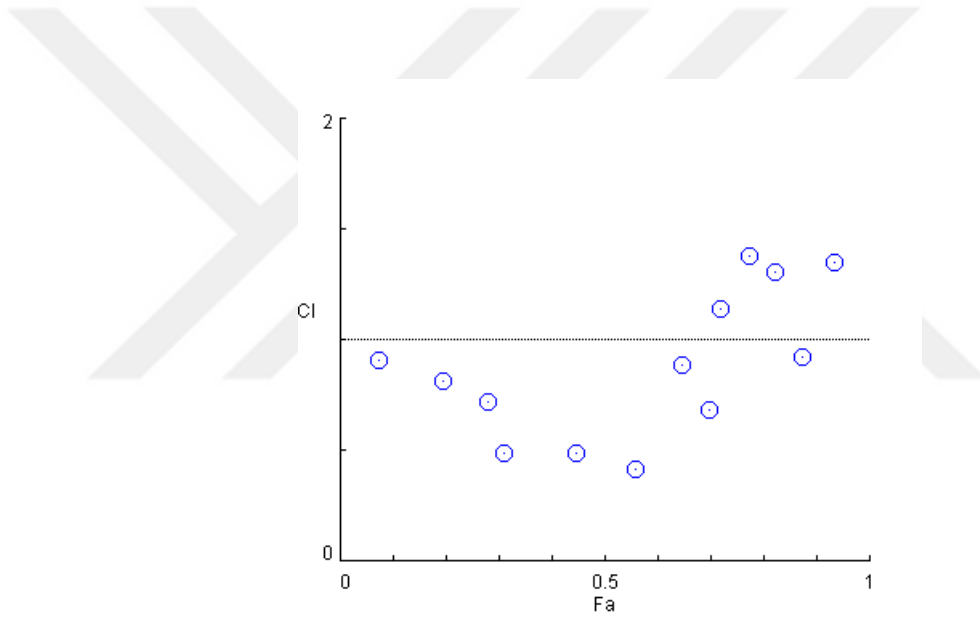
MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde doksorubisin ve eter ekstraktı arasındaki sinerjistik etkileşim CalcuSyn ve MacSynergy II yazılımları ile değerlendirilmiştir. İlaç kombinasyonlarında 6 μ M doksorubisin en yüksek doz konsantrasyonu olarak kullanılmıştır. Bu dozun ½ seri dilüsyonları ile elde edilen 6 seri doz ile 250 μ g/ml eter ekstraktından benzer şekilde hazırlanan 6 doz kombine edilmiştir. Canlılık verileri MS Excel’de yüzde canlılık olarak hesaplandıktan sonra veriler MacSynergy II yazılımına girilmiştir.

Şekil 10A ve B’de doksorubisin-eter ekstraktı kombinasyonlarının % 95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri görülmektedir. Elde edilen veriler düşük doksorubisin dozları içeren kombinasyonlarda yüksek sinerjik etkiyi gösterirken, yüksek doksorubisin dozları içeren kombinasyonlarda kısmi antagonistik etki göstermektedir. Sonuç olarak MacSynergy II ile yapılan değerlendirme sonucunda MDA-MB-231 hücre hattında doksorubisin ve eter ekstraktı kombinasyonuna ait sinerji değeri 438.55 $\text{uM}^2\%$ (log değeri: 39.74), antagonizm değeri ise -150 $\text{uM}^2\%$ (log değeri: -13.62) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler hem sinerjik hem de antagonistik etkinin *in vivo* ortamda da benzer şekilde görülebileceğini belirten yüksek değerlerdir.



Şekil 10. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ve doksorubisin kombinasyonlarına ait % 95 güven aralığında çizilen sinerji pikleri (A) ve kontür pikleri (B) şekilde gösterilmiştir. Teorik aditif yüzey (% 0 beklenen inhibisyon) Bliss bağımsızlık matematik modeli'ne dayanılarak MacSynergy II yazılımı ile hesaplanmıştır. Pikler hesaplanan aditif yüzeyin (grafikte x ekseninde 0 değeri olarak gösterilmiştir) üzerinde ise sinerjizm, altında ise antagonizmi ifade etmektedir.

CalcuSyn yazılımı ile gerçekleştirilen değerlendirme sonucu MacSynergy II yazılım sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Grafik 23'te etkilenen fraksiyona bağlı olarak değişen sinerjistik ve antagonistik etkiler görülmektedir. Bu grafiğe göre canlılık inhibisyonu üzerinde düşük etki gösteren kombinasyon dozları sinerjik etkileşim gösterirken ($CI < 0.9$: Sinerjizm) , inhibisyon arttıkça CI değeri yükselmekte ve antagonistik etkileşim ortaya çıkmaktadır ($CI > 1.1$: Antagonizm).



Grafik 23: *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı ile doksorubisin kombinasyonlarına ait kombinasyon indeks-etkilenen fraksiyon grafiği. Grafiğe ait değerler CalcuSyn yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir nokta bir doz kombinasyonunu ifade etmektedir. CI değerleri şu şekilde değerlendirilir: $CI < 0.9$: Sinerjizm, $0.9 < CI < 1.1$: Aditif Etki, $CI > 1.1$: Antagonizm.

3.5. *Ganoderma lucidum* Eter Ekstraktının Preliminer Fitokimyasal Tarama Sonuçları

Ganoderma lucidum eter ekstraktının preliminar fitokimyasal tarama sonuçları bu ekstraktın triterpenoid, steroid ve alkaloid türevlerini içerdiğini göstermiştir. *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı tanen, flavanoid ve antrasin türevlerini içermemektedir.



4. TARTIŞMA

Ganoderma lucidum uzun yıllardır Kore, Japonya ve Çin’de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan yenebilen bir tıbbi mantar türüdür. *Ganoderma lucidum* polisakkaritler, glikoproteinler, aminopolisakkaritler, proteoglikanlar ve triterpenler gibi birçok biyolojik olarak aktif alt ünite içermektedir. *G. lucidum* mantarından elde edilen farmakolojik olarak en aktif bileşenler polisakkaritler ve triterpenlerdir.

G. lucidum’dan izole edilen polisakkaritlerin natural killer, T hücreleri, B hücreleri ve makrofaj bağımlı immün sistem cevabı aktive ettiği ve bu yol ile indirekt olarak onkogeneze ve tümör metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (102). *Ganoderma lucidum* ekstratları ayrıca yüzden fazla farmakolojik olarak aktif triterpen türevi içermemektedir. Triterpen türevlerinin polisakkaritlerden farklı olarak kanser hücreleri üzerinde direk sitotoksik etki gösterdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (103, 128-130).

Ganoderma lucidum’un metanol, etanol ve eter gibi organik solvent ekstratları yüksek oranda triterpen türevi içermektedir. Organik solventler ile yapılan ekstraksiyonlar triterpen izolasyonunda en çok kullanılan yöntemdir (131).

Bu çalışmada öncelikle *G.lucidum* makro-mantarından etanol, metanol, eter, etilasetat, etanol-su ve su solventleri kullanılarak hazırlanan altı farklı ekstraktın MCF-7 östrojen reseptörü pozitif ve MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında canlılık inhibisyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Hücreler ekstratlardan hazırlanan dozlar ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra WST-8 metodu kullanılarak hücre canlılığı üzerine etkileri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. MCF-7 hücre hattında ilk gün en yüksek dozda eter ekstraktı bir etki göstermezken, etil asetat, etanol ve etanol-su ekstraktlarının sırası ile % 12, % 13 ve % 13 oranında canlılık inhibisyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Buna karşın bir gün inkübasyonun ardından metanol ve su ekstraktlarının hücre canlılığını artırdığı gözlenmiştir (sırası ile % 7 ve % 49). Su ekstraktının hücre canlılığını % 49 oranında artırmasının nedeninin su ekstraktlarının yüksek oranda polisakkarit içeriğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (132).

Kanser hücrelerinin normal vücut hücrelerinden yüksek miktarda glukoz tükettiği bilinmektedir (133). Su ekstraktı içerisinde bulunan glukoz türevi polisakkaritlerin kanser hücre canlılığını arttırması bu nedenle kaçınılmazdır. Farmakolojik olarak aktif *G. lucidum* polisakkaritlerinin *in vivo* ortamda gösterdiği immün cevap artışına bağlı anti-kanser etki, hücre kültürü ortamında immün sistem hücreleri bulunmaması nedeni ile görülememektedir. Metanol ekstraktında ise ilk gün hücre canlılığını artırmasının ardından ikinci gün aynı dozda hücrelerde % 45 canlılık inhibisyonuna sebep olması ilk gün ekstrakttaki hücreleri besleyen/canlılığı tetikleyen içeriğin tüketilmesinden sonra ekstraktın asıl etkisini gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Benzer şekilde eter ekstraktının da ilk gün içerisinde hücre canlılığı üzerinde etki göstermemesinin kaynağı da bu olabilir. Bu durumda eter ekstraktının içerdiği kanser hücrelerinde canlılığı tetikleyen içeriğin metanol ekstraktına göre daha az olduğu sonucuna varılabilir.

Bunlarla birlikte ekstraktların içerdiği yüzlerce farklı farmakolojik olarak aktif bileşen nedeni ile bir ekstraktın etki mekanizmasını açıklamak oldukça güçtür. Örneğin, çalışmamızda kanser-hücrelerinde direkt sitotoksik etki gösterdiği belirtilen triterpen izolasyonunda kullanılan bir solvent olan etanol ile ekstrakte edilmiş *Ganoderma lucidum* ekstraktı MCF-7 hücrelerinde diğer organik solvent ekstraktları ile karşılaştırıldığında düşük canlılık inhibisyonuna sebep olmuştur. Yapılan bir araştırma bu duruma açıklık getirebilecek şekilde, *Ganoderma lucidum*'un etanol ekstraktının östrojen-benzeri etki gösterdiği sonucuna varmıştır (134). Bilindiği üzere MCF-7 meme kanseri hücreleri östrojen reseptör pozitif hücreler olup, bu reseptörlere östrojen bağlanması durumunda proliferasyonlarını arttırmaktadırlar (135). *Ganoderma lucidum* etanol ekstraktı ile yapılmış bir diğer çalışma ise bu ekstraktın MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklediği ve hücre döngüsünde G1 fazında tutuluma sebep olduğunu belirtmektedir (136). Fakat bu çalışmada bahsedilen canlılık inhibisyonu (% 70) 500 µg/ml etanol ekstraktı ile 48 saat inkübasyon süresinin sonucunda elde edilmiş olup, 100 µg/ml etanol ekstraktının hücreler üzerindeki etkisi % 20 oranındaki canlılık inhibisyonudur. Bu şekilde karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda, 100 µg/ml etanol ekstraktı ile 48 saat inkübasyon sonucunda elde edilen canlılık inhibisyonu % 26 olup,

önceki çalışma sonuçlarıyla oldukça benzerdir. Çalışmamızda 72. saatte etanol ekstraktının canlılık inhibisyonu etkisinin % 14 seviyesine düşmesi östrojen-benzeri etki gösteren bileşikler içermesi nedeni ile hücrelerde proliferasyonu tetikleyen gen ekspresyon düzeyindeki değişimlerin hücre fenotipine yansımaları olarak değerlendirilebilir. Bu sonuçlar bir ekstrakt içerisinde hücre canlılığını tetikleyen ve inhibe eden ajanların bir arada bulunabileceğini ve bu ajanların etki mekanizmalarının oldukça farklı yollar üzerinden işleyebileceğini gösterir niteliktedir.

Çalışmamızda 100 µg/ml etilasetat ekstraktı ile MCF-7 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonucunda sırası ile % 12, % 42 ve % 52 oranında canlılık inhibisyonuna neden olmuştur. Dolayısıyla ile *G. lucidum* etil asetat ekstraktının MCF-7 hücrelerinde IC₍₅₀₎ dozunun 72. saatte yaklaşık olarak 100 µg/ml olduğu görülmektedir. Daha önce etil asetat ekstraktının meme kanseri hücreleri üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda *Ganoderma lucidum* eter ekstraktının 48 ve 72. saatte sırası ile 100 µg/ml ve 12.82 µg/ml IC₍₅₀₎ dozu ile diğer ekstraktlara göre canlılık inhibisyonunda daha etkili olduğu bulunmuştur. Daha önce yaptığımız bir çalışmada *Ganoderma lucidum* eter ekstraktının IC₍₅₀₎ dozunun 72. saatte 100 µg/ml olduğunu saptadık (137). Bu farklılığın *Ganoderma lucidum* makro-mantarına ait ekstraktların ekstraksiyonu ve çözündürülmesi esnasındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız literatür taramaları sonucunda *Ganoderma lucidum* mantarı eter ekstraktının kanser hücreleri üzerindeki etkisini belirleyen başka bir araştırmanın henüz bulunmadığını saptadık. Bununla birlikte, diğer çalışmalarda farklı solventler (etanol, su vb.) kullanılarak ekstrakte edilen *Ganoderma lucidum* ekstraktlarının kanser hücrelerindeki IC₍₅₀₎ dozları ile (117, 138, 139) karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda eter ekstraktının oldukça düşük dozlarda etkili olduğu görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın bir diğer çıkarımı da eter solventinin *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen anti-kanser özellikteki bileşikler daha etkili çözebildiği yönündedir. Eter solventinin triterpenoid izolasyonunda kullanılan etkin bir madde olduğu düşünüldüğünde aslında bu durum şaşırtıcı değildir. *Ganoderma lucidum*'dan

elde edilen triterpenoidlerin anti-anjiogenik (140), pro-apoptotik (117, 141), hücre döngüsünde tutuluma sebebiyet veren (117, 142) ve hücre motilitesini engelleyici (143) özellikleri olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda gerçekleştirilen preliminier fitokimyasal tarama sonuçları da bu ekstratın triterpenoid barındırdığını göstermiştir.

Çalışmamızda *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında da diğer ekstraktlara göre canlılık inhibisyonunda daha etkili bulunmuştur. Eter ekstraktının 48. saatte $IC_{(50)}$ dozunun 250 µg/ml, 72. saatte ise 150 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. *Ganoderma lucidum* metanol, etanol, etanol-su ve su ekstraktlarının bu hücre hattında hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Etilasetat ve eter ekstraktları MCF-7 hücrelerindeki canlılık tayini deney sonuçlarına benzer şekilde MDA-MB-231 hücre hattında da en etkili ekstraktlar olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda diğer tüm deneyler her iki hücre hattında da canlılık üzerine etkisi diğer ekstraktlara göre yüksek bulunan eter ekstraktı ile gerçekleştirilmiştir.

Ganoderma lucidum eter ekstraktının kanser hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmak amacı ile bu çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri eter ekstraktının bu hücrelerdeki $IC_{(50)}$ dozları ile 48 saat inkübe edildikten sonra akış sitometri yöntemi ile hücrelerde kontrole göre apoptotik hücre oranı belirlenmiştir. Akış sitometri sonuçları eter ekstraktının MCF-7 hücrelerine 100 µg/ml *Ganoderma lucidum* eter ekstraktı uygulanmasının 48. saatte hücrelerde % 45.4 oranında apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Bu oran aynı doz ve zaman süresinde MCF-7 hücrelerinde % 50 oranında görülen hücre canlılık inhibisyonunu karşılamaktadır. Bu durumda eter ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerinde pro-apoptotik etki gösterdiği söylenebilir. Eter ekstraktı nekrotik hücre oranında herhangi bir değişime sebep olmamıştır. Bu da bir önceki veriyi destekler niteliktedir.

MDA-MB-231 hücre hattında eter ekstraktının apoptoz üzerindeki etkisi canlılık inhibisyonunu karşılayamayacak kadar düşüktür (% 6.04). Bu veri eter ekstraktının bu hücrelerde canlılık inhibisyonunu apoptotik yollar üzerinden gerçekleştirmediğini göstermektedir. Eter ekstraktının nekrotik hücre oranında sebep olduğu % 0.4'lük artış

ise anlamlı değildir. Eter ekstraktı ile kanser hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışma henüz bulunmadığından bu verileri karşılaştırmak olanaksızdır. Fakat yapılan bir araştırma *Ganoderma lucidum*'un MDA-MB-231 hücrelerinde gösterdiği canlılık inhibisyonunun Akt/NF-kappaB sinyal yolağının “down-regulasyonunu” sağlayarak gösterdiğini belirtmektedir (144). Bu çalışmaya göre *Ganoderma lucidum* Akt proteininin fosforillenmesini baskılayarak Akt ekspresyonunu baskılamakta ve bu sayede NF-kappaB aktivitesini inhibe etmektedir. Benzer şekilde MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan bir diğer araştırma sonuçları da *Ganoderma lucidum*'un etki mekanizmasının NF-kappaB yolağının “down-regulasyonu” üzerinden çalıştığını göstermektedir (145).

Yüksek invazivlik gösteren kanser hücrelerinde sürekli aktifliğini koruyan NF-kappaB transkripsiyon faktörlerinin hücre mobilitesi üzerine direk etkisi bulunmaktadır (146). Birçok kanser türünde gösterildiği üzere, *G. lucidum* ekstraktları anti-invaziv ve anti-metastatik özelliklerini NF-kappaB ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in aktivitelerini ERK1/2, PI3K/AKT/mTOR ve MAPK yolları aracılığı ile inhibe etmeleri sonucunda migrasyon ve invazyonda direk rol oynayan ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve uPA reseptörünün “down-regulasyonunu” sağlayarak gerçekleştirdikleri gösterilmiştir (116,121,122,147). Bizim çalışmamızda da eter ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerinin eter ekstraktı ile inkübasyonu sonucunda % 32.52 oranında hücre migrasyonunda inhibisyon gözlenmesi eter ekstraktının benzer bir etki mekanizması üzerinden çalışabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yolları kapsamlı olduğundan (148) tam olarak etki mekanizmasının ortaya çıkarılması için ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda MCF-7 hücre hattında ise eter ekstraktı migrasyon ve invazyonu sırası ile % 8.2 ve % 2.5 oranında azaltmıştır. Bu oranın MDA-MB-231 hücrelerine göre daha düşük olmasının en büyük sebebinin MCF-7 hücrelerinin düşük migrasyon ve invazyon yapabilme özelliklerinden (149) kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bu noktada iki hücre hattında da eter ekstraktının migrasyonu invazyona göre daha yüksek

oranda etkilemesi dikkat çekici olup ilerdeki araştırmalara zemin oluşturabilecek bir veridir.

Çalışmamızda bir diğerk basamak olan eter ekstraktının hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırılması için akış sitometri yöntemi kullanılmıştır. Eter ekstraktı MCF-7 hücrelerinde SubG1 ve G1 safhasında bulunan hücre popölasyonlarına ait hücre sayısında sırası ile % 1.5 ve % 4.5 oranında artışa, S ve G2 fazındaki hücre sayısında ise sırası ile % 5.9 ve % 1.9 oranında azalmaya sebep olmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında ise hücrelerinin eter ekstraktı ile inkübe edilmesi SubG1 ve G2 safhasında bulunan hücre popölasyonlarına ait hücre sayısında sırası ile % 2.3 ve % 13.7 oranında artışa, S ve G1 fazındaki hücre sayısında ise sırası ile % 1.8 ve % 14.9 oranında azalmaya sebep olmuştur. Her ne kadar MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları arasında hücre yoğunluklarının anlamlı olarak arttığı ve azaldığı döngü fazları bulunsa da her iki hücre hattında da tam olarak bir hücre döngüsü tutulumundan söz etmek mümkün değildir. Bu durumda eter ekstraktının bu araştırmada çalışılan hücre hatlarında hücre döngüsü üzerinde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılabilir. Bununla birlikte, yapılan birçok araştırma *Ganoderma lucidum*'un kanser hücrelerinde G0/G1 hücre döngüsü tutulumuna sebep olduğunu belirtmektedir (117, 150, 151). Sonuçlar arasındaki bu farklılık *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen ve hücre döngüsü üzerine etki eden moleküllerin eter ekstraktında bulunmayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın bir sonraki adımında anti-kanser özellikleri araştırılan *Ganoderma lucidum* eter ekstraktının klinikte rutin olarak meme kanseri tedavisinde kullanılan terapötikler olan tamoksifen ve doksorubisin ile etkileşimi kombinasyon indeks analizi (combination index analysis) ve MacSynergy II yazılımları ile incelenmiştir. şu anki bilgimize göre daha önce meme kanseri hücre hatlarında *Ganoderma lucidum* ile tamoksifen ve doksorubisinin sinerjik etkileşim mekanizmaları araştırılmamıştır. Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde eter ekstraktının tamoksifen ile yüksek oranda sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur. Bu sinerjik etkileşim düzeyi MacSynergy II yazılımı ile 'in vivo ortamda etkili olabilecek düzeyde' olarak tanımlanmış (sinerji değer: %57.12 uM², log değer: 5.18) ve bu yazılım ile yapılan değerlendirme

sonucunda hiçbir tamoksifen-eter ekstraktı kombinasyonu antagonistik etkileşim içerisinde bulunmamıştır (antagonizm değeri: 0 μM^2 %). CalcuSyn ile gerçekleştirilen değerlendirme sonucunda ise birçok doz kombinasyonunun sinerjik etkiyi ifade eden CI değerinin 0.9 değerinden düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte CI değerleri değerlendirildiğinde en düşük ve bazı yüksek tamoksifen konsantrasyonları içeren kombinasyonlarda CI değerinin genellikle antagonistik etkiyi ifade eden '1.1 değerinin üzerinde' olduğu belirlenmiştir. Fakat bu antagonistik etkileşimler MacSynergy II yazılımına göre anlamlı bulunmamış ve aditif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar eter ekstraktının tamoksifenin anti-proliferatif etkilerini artırabilecek biyoaktif ajanlar içerebileceğini düşündürmektedir.

Tamoksifen östrojen reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir terapötiktir. Tamoksifen meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptörü alfa (ER-alpha)'ya kısmi agonist/antagonist fonksiyon gösterirken, östrojen reseptör beta'ya karşı saf antagonistik etki göstererek östrojen büyüme yolağını dolayısı ile kanser hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (152). Yapılan araştırmalar *G. lucidum*'un östrojen reseptör aktivitesini ve NF-kappaB sinyal yolağını kontrol ederek meme kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etki gösterdiğini belirtmektedir (153). Bununla birlikte aynı çalışmada *G. lucidum*'un MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptör alfa ekspresyonunu down-regule ettiği fakat östrojen reseptörü beta üzerinde bir etkisi olmadığı belirtilmektedir. Bu veriler *Ganoderma lucidum* mantarının östrojen reseptörü inhibisyonunda rol oynayarak tamoksifenin anti-proliferatif etkisine katkıda bulunabileceğini göstermekte, aynı zamanda çalışmamız sonucunda ortaya çıkarılan tamoksifen-eter ekstraktı arasındaki sinerjik etkileşimin ardında yatan mekanizmaya moleküler bir temel oluşturmaktadır.

Çalışmamızda ayrıca MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde eter ekstraktı ile doksorubisin arasındaki etkileşim değerlendirilmiştir. Doksorubisin kanser tedavisinde kullanılan bir antrasiklin anti-tümör antibiyotiktir. Doksorubisin DNA'ya interkalasyon yaparak makromoleküler sentezi inhibe ederek çalışmaktadır (154). Sentez inhibisyonu doksorubisinin transkripsiyon esnasında DNA süpersarmallarının açılmasında görev alan

topoizomeraz II enzimini inhibe etme ve DNA hasarına sebep olmasına dayanır (155). Ayrıca serbest radikal üretimini artırması doksorubisinin sitotoksik etkisine katkıda bulunmaktadır (156). Doksorubisin, tedavi süresince kümülatif olarak yan etkileri artan bir kemoterapötik olup, kardiyomiyopati, kalp yetmezliği ve kalp krizine sebep olabilmektedir (157). Bu nedenle doksorubisinin anti-proliferatif etkisini artırabilecek ve kullanım düzeyini düşürebilecek etkili ajanlara gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde tamoksifen-*Ganoderma lucidum* eter ekstraktı kombinasyon verilerinin aksine, MacSynergy II yazılımı kullanılarak yapılan değerlendirme sonucunda eter ekstraktı-doksorubisin kombinasyonları yüksek oranda antagonistik bulunmuştur (sinerji değeri: 0,7 $\mu\text{M}^2\%$, log değeri: 0.06; antagonizm değeri: -135.08 $\mu\text{M}^2\%$, log değeri: -12.24). MacSynergy II kullanım kılavuzunda belirtildiği üzere antagonizm değerinin -100 $\mu\text{M}^2\%$ ' ün altında bulunması kuvvetli antagonistik etkiyi belirtmekte ve bu kombinasyonların *in vivo* ortamda benzer etki gösterebileceği öngörülmektedir. CalcuSyn yazılımı ile gerçekleştirilen kombinasyon indeks analizi sonucunda elde edilen veriler MacSynergy II yazılım sonuçları ile uyumlu olarak eter ekstraktı ile doksorubisin arasında kuvvetli antagonistik etki varlığını göstermektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında ise eter ekstraktı –doksorubisin kombinasyonunun etkileşim değerleri net bir sonuç çıkarmamıza olanak sağlamamaktadır. Elde edilen veriler düşük doksorubisin dozları içeren kombinasyonlarda yüksek sinerjik etkiyi gösterirken, yüksek doksorubisin dozları içeren kombinasyonlarda kısmi antagonistik etki göstermektedir. Sonuç olarak MacSynergy II ile yapılan değerlendirme sonucunda MDA-MB-231 hücre hattında doksorubisin ve eter ekstraktı kombinasyonuna ait sinerji değeri 438.55 $\mu\text{M}^2\%$ (log değeri: 39.74), antagonizm değeri ise -150 $\mu\text{M}^2\%$ (log değeri: -13.62) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, her iki etkinin de *in vivo* ortamda benzer şekilde görülebileceğini ifade eden yüksek değerlerdir. CalcuSyn yazılımı ile gerçekleştirilen değerlendirmenin sonuçları MacSynergy II yazılım sonuçları ile uyumlu bulunmuş, canlılık inhibisyonu üzerinde düşük etki gösteren kombinasyon dozları sinerjik etkileşim gösterirken (CI <0.9: Sinerjizm) , canlılık inhibisyonu arttıkça CI değeri yükselmekte ve antagonistik etkileşim ortaya çıkmaktadır (CI >1.1: Antagonizm).

Sonuç olarak eter ekstraktının her iki hücre hattında da doksorubisinin anti-proliferatif etkisini azaltabilecek ajanlar içerdiği çıkarımında bulunulabilir. Doksorubisinin kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmalarından birisinin oksidatif stres artışına bağlı apoptoz indüksiyonu olduğu düşünüldüğünde, yüksek anti-oksidan biyomoleküller içerdiği önceki çalışmalar ile gösterilen *Ganoderma lucidum* mantarının (158, 159) doksorubisin kaynaklı oksidatif stresi azaltarak ilacın aktivitesinde düşüşe yol açabileceği varsayımında bulunulabilir. Bu varsayımın doğrulanması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Ganoderma lucidum'un kanser terapötikleri ile etkileşimini inceleyen çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Yapılan bir araştırmada *G. lucidum*'dan elde edilen polisakkaritlerin HeLa hücrelerinde doksorubisin ile sinerjik etkileşim gösterdiği belirtilmektedir (160). Fakat hem ekstraktın içeriği hem de kullanılan hücre hattı açısından karşılaştırma yapabilmek mümkün değildir. Bizim çalışmamızda da MDA-MB-231 hücre hattında yüksek oranda sinerji gösteren doz kombinasyonları bulunsa da benzer şekilde antagonistik etki gösteren doz kombinasyonlarının da bulunması nedeniyle bu ekstraktın doksorubisin tedavisi esnasında kullanımının önerilmesinin sakıncalı olacağı düşünülmektedir.

G. lucidum ekstraktlarının tamamlayıcı tedavi olarak kanser tedavisinde kullanımını araştıran klinik denemelerde *G. lucidum* mantarından izole edilen polisakkaritler kullanılmış olup çoğunlukla hastalardaki immün yanıt üzerine odaklanılmıştır (125, 161, 162). *G. lucidum*'dan izole edilen triterpen türevlerinin *in vivo* ortamdaki etkileri üzerine yapılan bir klinik araştırma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler triterpen türevleri içeren eter ekstraktının tamoksifen ile sinerjik etkileşim gösterebileceğini fakat doksorubisin tedavisi esnasında kullanımının ilaç etkisini azaltabileceğini desteklemektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *Ganderma lucidum* mantarından elde edilen altı farklı ekstraktan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında hücre canlılığı üzerinde en etkili olan ekstraktın eter ekstraktı olduğu bulunmuştur. Çalışmamız *G. lucidum* eter ekstraktının kanser hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Eter ekstraktının MCF-7 hücre hattında canlılık inhibisyonu üzerine olan etkisi ekstrakt ile inkübasyonun ardından apoptoza giren hücre yüzdesi ile örtüşmektedir. Eter ekstraktının MCF-7 hücrelerinde pro-apoptotik etki gösteren biyoaktif moleküller içerebileceği öngörülmektedir. İleriki araştırmalarda eter ekstraktında bulunan farmakolojik olarak aktif moleküllerin incelenmesi östrojen pozitif meme kanseri tedavisinde yeni ve etkili ajanların keşfine olanak sağlayabilir. Çalışmamızda eter ekstraktının östrojen pozitif meme kanseri tedavisinde kullanılan bir terapötik olan tamoksifen ile sinerjik etki göstermesi de bu varsayımı güçlendirmektedir.

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücre hattında eter ekstraktı anlamlı olarak apoptozu indüklese de, apoptotik hücre oranı canlılık inhibisyonunu karşılayacak düzeyde değildir. Eter ekstraktının iki hücre hattında da hücre döngüsü üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan değişimlere sebep olduğu görülse de, hücrelerde tam bir hücre döngüsü tutulumuna sebep olduğu gözlenmemiştir. Ekstrakt ile inkübasyon yüksek oranda invaziv olan MDA-MDA-231 hücre hattında migrasyonu anlamlı şekilde inhibe ederken, invaziv olmayan MCF-7 hücre hattında aynı etki hücre karakteristiği nedeni ile gözlenmemiştir. Bu sonuç eter ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık inhibisyonu mekanizmasının hücre mobilitesini düzenleyen mekanizmalar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Eter ekstraktının çalışılan hücrelerde doksorubisin ile kombinasyonu sonucunda MCF-7 hücre hattında doksorubisin ile kuvvetli antagonistik etki gösterdiği, MDA-MB-231 hücrelerinde ise kuvvetli sinerjik ve antagonistik etkiler içeren karmaşık bir yanıtı sebep olduğu bulunmuştur. Eter ekstraktının doksorubisin ile sinerjik ve antagonistik etkileşim gösterebilecek biyoaktif moleküller içerebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Popovic V, Zivkovic J, Davidovic S, Stevanovic M, Stojkovic D. Mycotherapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2013;13(21):2791-80.
2. Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2012;2(1):1-15.
3. Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*. 2002;24(22):1839-45.
4. Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI, et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2004;14(4):589-94.
5. Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives In Biology and Medicine*. 2006;49(2):159-70.
6. Wenner CA, Martzen MR, Lu H, Verneris MR, Wang H, Slaton JW. Polysaccharide-K augments docetaxel-induced tumor suppression and antitumor immune response in an immunocompetent murine model of human prostate cancer. *International Journal of Oncology*. 2012;40(4):905-13.
7. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Bernardshaw S, Tryggestad A, Grinde B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *Scandinavian Journal Of Immunology*. 2008;68(4):363-70.
8. Wan JM, Sit WH, Louie JC. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast cancer cells ZR-75-30. *International Journal Of Oncology*. 2008;32(3):689-99.

9. Ito G, Tanaka H, Ohira M, Yoshii M, Muguruma K, Kubo N, et al. Correlation between efficacy of PSK postoperative adjuvant immunochemotherapy for gastric cancer and expression of MHC class I. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2012;3(6):925-30.
10. Lu H, Yang Y, Gad E, Inatsuka C, Wenner CA, Disis ML, et al. TLR2 agonist PSK activates human NK cells and enhances the antitumor effect of HER2-targeted monoclonal antibody therapy. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(21):6742-53.
11. Zaidman B-Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 2005;67(4):453-68.
12. Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 2002;60(3):258-74.
13. Mahajna J, Dotan N, Zaidman B-Z, Petrova RD, Wasser SP. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Ganoderma lucidum*. *Nutrition and Cancer*. 2008;61(1):16-26.
14. Wang JL, Bi Z, Zou JW, Gu XM. Combination therapy with lentinan improves outcomes in patients with esophageal carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2012;5(3):745-8.
15. McCormack E, Skavland J, Mujic M, Bruserud O, Gjertsen BT. Lentinan: hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia. *Nutrition and Cancer*. 2010;62(5):574-83.
16. Shimizu K, Watanabe S, Watanabe S, Matsuda K, Suga T, Nakazawa S, et al. Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(89):240-4.
17. Chen JT, Hasumi K, Masubuchi K. Interferon-alpha, interferon-gamma and sizofiran in the adjuvant therapy in ovarian cancer--a preliminary trial. *Biotherapy*. 1992;5(4):275-80.

18. Mizuno T, Wang G, Zhang J, Kawagishi H, Nishitoba T, Li J. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*. 1995;11(1):151-66.
19. Rose DP, Boyar AP, Wynder EL. International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer*. 1986;58(11):2363-71.
20. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(16):5678-85.
21. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15):4429-34.
22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*. 2007;109(9):1721-8.
23. Tuttle TM, Habermann EB, Grund EH, Morris TJ, Virnig BA. Increasing use of contralateral prophylactic mastectomy for breast cancer patients: a trend toward more aggressive surgical treatment. *Journal Of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5203-9.
24. Fisher B, Redmond C, Poisson R, Margolese R, Wolmark N, Wickerham L, et al. Eight-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *New England Journal Of Medicine*. 1989;320(13):822-8.
25. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Advances In Experimental Medicine And Biology*. 2007;608:1-22.
26. Giordano SH, Hortobagyi GN. Inflammatory breast cancer: clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Research*. 2003;5(6):284-8.

27. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1998;52(1-3):65-77.
28. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7(5):1000279.
29. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-26.
30. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncology Reports*. 2004;11(3):559-95.
31. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):3797.
32. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(7):1138-44.
33. Mouridsen H, Palshof T, Patterson J, Battersby L. Tamoxifen in advanced breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 1978;5(3):131-41.
34. Li CI, Daling JR, Malone KE. Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(1):28-34.
35. Anderson WF, Katki HA, Rosenberg PS. Incidence of breast cancer in the United States: current and future trends. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(18):1397-402.
36. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast Cancer Endocrine Resistance: How Growth Factor Signaling and Estrogen Receptor Coregulators Modulate Response. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(1):447s-54s.

37. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Research*. 2008;68(3):826-33.
38. Frasor J, Chang EC, Komm B, Lin CY, Vega VB, Liu ET, et al. Gene expression preferentially regulated by tamoxifen in breast cancer cells and correlations with clinical outcome. *Cancer Research*. 2006;66(14):7334-40.
39. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1992;339(8785):71-85.
40. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):36869-72.
41. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(18):1371-88.
42. Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6570-8.
43. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1659-72.
44. Carlsson J, Nordgren H, Sjostrom J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *British Journal of Cancer*. 2004;90(12):2344-8.
45. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2012;2:62.
46. Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A*. 2004;57(2):86-93.

47. Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2003;532:253-68.
48. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(2):157-70.
49. Lomovskaya N, Otten SL, Doi-Katayama Y, Fonstein L, Liu X-C, Takatsu T, et al. Doxorubicin Overproduction in *Streptomyces peucetius*: Cloning and Characterization of the *dnrU* Ketoreductase and *dnrV* Genes and the *doxA* Cytochrome P-450 Hydroxylase Gene. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(1):305-18.
50. Chlebowski RT. Adriamycin (Doxorubicin) Cardiotoxicity: A Review. *Western Journal of Medicine*. 1979;131(5):364-8.
51. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2011;21(7):440-6.
52. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(12):4514-8.
53. Pawlowska J, Tarasiuk J, Wolf CR, Paine MJ, Borowski E. Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase. *Oncology Research*. 2003;13(5):245-52.
54. Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(6):664-75.
55. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466-8.

56. Neef C, de Voogd-van der Straaten I. An interaction between cytostatic and anticonvulsant drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* . 1988;43(4):372-5.
57. Cusack BJ, Tesnohldek DA, Loseke VL, Vestal RE, Brenner DE, Olson RD. Effect of phenytoin on the pharmacokinetics of doxorubicin and doxorubicinol in the rabbit. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1988;22(4):294-8.
58. Gianni L, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovascular Toxicology*. 2007;7(2):67-71.
59. Konno S, Tortorelis DG, Fullerton SA, Samadi AA, Hettiarachchi J, Tazaki H. A possible hypoglycaemic effect of maitake mushroom on Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine*. 2001;18(12):1010.
60. Masuda Y, Inoue H, Ohta H, Miyake A, Konishi M, Nanba H. Oral administration of soluble beta-glucans extracted from *Grifola frondosa* induces systemic antitumor immune response and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice. *International Journal of Cancer Journal international Du Cancer*. 2012.
61. Fang J, Wang Y, Lv X, Shen X, Ni X, Ding K. Structure of a beta-glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF-kappaB signaling. *Glycoconjugate Journal*. 2012;29(5-6):365-77.
62. Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology*. 2009;9(5):620-6.
63. Masuda Y, Ito K, Konishi M, Nanba H. A polysaccharide extracted from *Grifola frondosa* enhances the anti-tumor activity of bone marrow-derived dendritic cell-based immunotherapy against murine colon cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*. 2010;59(10):1531-41.
64. Kodama N, Mizuno S, Nanba H, Saito N. Potential antitumor activity of a low-molecular-weight protein fraction from *Grifola frondosa* through enhancement of cytokine production. *Journal of Medicinal Food*. 2010;13(1):20-30.

65. Soares R, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, Obiol D, Alonso E, et al. Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. *Journal of Medicinal Food*. 2011;14(6):563-72.
66. Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K, Ito H. Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (*Grifola frondosa*) on human gastric cancer cell lines. *Oncology Reports*. 2009;22(3):615-20.
67. Deng G, Lin H, Seidman A, Fornier M, D'Andrea G, Wesa K, et al. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2009;135(9):1215-21.
68. Song KS, Li G, Kim JS, Jing K, Kim TD, Kim JP, 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*. 2011;11:307.
69. Tsuji T, Du W, Nishioka T, Chen L, Yamamoto D, Chen CY. *Phellinus linteus* extract sensitizes advanced prostate cancer cells to apoptosis in athymic nude mice. *PloS One*. 2010;5(3):e9885.
70. Meera CR, Janardhanan KK. Antitumor activity of a polysaccharide-protein complex isolated from a wood-rotting polypore macro fungus *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal Of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology : Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 2012;31(3):223-32.
71. Kojima H, Tanigawa N, Kariya S, Komemushi A, Shomura Y, Sawada S, et al. A case of spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with multiple lung metastases. *Radiation Medicine*. 2006;24(2):139-42.
72. Nam SW, Han JY, Kim JI, Park SH, Cho SH, Han NI, et al. Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma with skull metastasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005;20(3):488-92.

73. Shibata Y, Kurita S, Okugi H, Yamanaka H. Dramatic remission of hormone refractory prostate cancer achieved with extract of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Urologia Internationalis*. 2004;73(2):188-90.
74. Harhaji L, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stojanovic I, Momcilovic M, Maksimovic V, et al. Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: in vitro and in vivo study. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 May;46(5):1825-33.
75. O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical cancer research*. 2010;16(12):3113-20.
76. Scopelliti A, Cammareri P, Catalano V, Saladino V, Todaro M, Stassi G. Therapeutic implications of Cancer Initiating Cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2009;9(8):1005-16.
77. Luk SU, Lee TK, Liu J, Lee DT, Chiu YT, Ma S, et al. Chemopreventive effect of PSP through targeting of prostate cancer stem cell-like population. *PloS One*. 2011;6(5):e19804.
78. Brown DC, Reetz J. Single agent polysaccharopeptide delays metastases and improves survival in naturally occurring hemangiosarcoma. Evidence-based c-Complementary and Alternative Medicine : eCAM. 2012;2012:384301.
79. Torkelson CJ, Sweet E, Martzen MR, Sasagawa M, Wenner CA, Gay J, et al. Phase 1 Clinical Trial of *Trametes versicolor* in Women with Breast Cancer. *ISRN Oncology*. 2012;2012:251632.
80. Lu H, Yang Y, Gad E, Wenner CA, Chang A, Larson ER, et al. Polysaccharide krestin is a novel TLR2 agonist that mediates inhibition of tumor growth via stimulation of CD8 T cells and NK cells. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(1):67-76.
81. Rosendahl AH, Sun C, Wu D, Andersson R. Polysaccharide-K (PSK) increases p21(WAF/Cip1) and promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 2012;12(6):467-74.
82. Eliza WL, Fai CK, Chung LP. Efficacy of Yun Zhi (*Coriolus versicolor*) on survival in cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. 2012;6(1):78-87.

83. Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Kawanishi T, Tamesada M, Harashima N, et al. Combining a peptide vaccine with oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract enhances anti-tumor activity in B16 melanoma-bearing mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII. 2012;61(11):2143-52.
84. Tanigawa K, Ito Y, Sakai M, Kobayashi Y. Evaluation of quality of life and immune function in cancer patients receiving combined immunotherapy and oral administration of *lentinula edodes* mycelia extract. *Cancer & Chemotherapy*. 2012;39(12):1779-81.
85. Okuno K, Uno K. Efficacy of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for advanced gastrointestinal cancer patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* : APJCP. 2011;12(7):1671-4.
86. Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Tamesada M, Harashima N, Harada M. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cancer Science*. 2011;102(3):516-21.
87. Yamaguchi Y, Miyahara E, Hihara J. Efficacy and safety of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(3):451-9.
88. Harada K, Itashiki Y, Takenawa T, Ueyama Y. Effects of lentinan alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent on growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*. 2010;37(3):623-31.
89. Kataoka H, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Mori Y, Mizushima T, et al. Lentinan with S-1 and paclitaxel for gastric cancer chemotherapy improve patient quality of life. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(90):547-50.
90. Isoda N, Eguchi Y, Nukaya H, Hosho K, Suga Y, Suga T, et al. Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(90):437-41.

91. Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, et al. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2009;29(7):2611-7.
92. Akanbi MH, Post E, van Putten SM, de Vries L, Smisterova J, Meter-Arkema AH, et al. The antitumor activity of hydrophobin SC3, a fungal protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012.
93. Mansour A, Daba A, Baddour N, El-Saadani M, Aleem E. Schizophyllan inhibits the development of mammary and hepatic carcinomas induced by 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene and decreases cell proliferation: comparison with tamoxifen. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2012;138(9):1579-96.
94. Kano Y, Kakuta H, Hashimoto J. Effect of sizofiran on regional lymph nodes in patients with head and neck cancer. *Biotherapy*. 1996;9(4):257-62.
95. Okamura K, Hamazaki Y, Yajima A, Noda K. Adjuvant immunotherapy: two randomized controlled studies of patients with cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 1989;43(3):177-81.
96. Fujimoto S, Furue H, Kimura T, Kondo T, Orita K, Taguchi T, et al. Clinical outcome of postoperative adjuvant immunochemotherapy with sizofiran for patients with resectable gastric cancer: a randomised controlled study. *European Journal of Cancer*. 1991;27(9):1114-8.
97. An M, Wijesinghe D, Andreev OA, Reshetnyak YK, Engelman DM. pH-(low)-insertion-peptide (pHLIP) translocation of membrane impermeable phalloidin toxin inhibits cancer cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(47):20246-50.
98. Wieland T. Modification of actins by phallotoxins. *Die Naturwissenschaften*. 1977;64(6):303-9.
99. Faulstich H, Schafer AJ, Weckauf M. The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*. 1977;358(2):181-4.
100. De La Cruz EM, Pollard TD. Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry*. 1994;33(48):14387-92.

101. Riede I. Tumor therapy with *Amanita phalloides* (death cap): stabilization of B-cell chronic lymphatic leukemia. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2010;16(10):1129-32.
102. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;60(3):258-74.
103. Shiao M-S, Lee Kuan R, Lin L-J, Wang C-T. Natural Products and Biological Activities of the Chinese Medicinal Fungus *Ganoderma lucidum*. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: American Chemical Society*; 1994. p. 342-354.
104. Wu GS, Lu JJ, Guo JJ, Li YB, Tan W, Dang YY, et al. Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Fitoterapia*. 2012;83(2):408-14.
105. Jedinak A, Thyagarajan-Sahu A, Jiang J, Sliva D. Ganodermanontriol, a lanostanoid triterpene from *Ganoderma lucidum*, suppresses growth of colon cancer cells through ss-catenin signaling. *International journal of oncology*. 2011;38(3):761-7.
106. Lee S, Park S, Oh JW, Yang C. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Medica*. 1998;64(4):303-8.
107. Kennedy EM, P'Pool SJ, Jiang J, Sliva D, Minto RE. Semisynthesis and biological evaluation of ganodermanontriol and its stereoisomeric triols. *Journal of Natural Products*. 2011;74(11):2332-7.
108. Jiang J, Jedinak A, Sliva D. Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011; 18;415(2):325-9.
109. Sliva D, Loganathan J, Jiang J, Jedinak A, Lamb JG, Terry C, et al. Mushroom *Ganoderma lucidum* prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. *PloS One*. 2012;7(10):e47873.
110. Smina TP, Mathew J, Janardhanan KK, Devasagayam TP. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst

occurring in South India. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2011;32(3):438-46.

111. Hsieh TC, Wu JM. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of *Ganoderma lucidum* in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. *International Journal of Molecular Medicine*. 2011;28(6):1065-9.

112. Zhao S, Ye G, Fu G, Cheng JX, Yang BB, Peng C. *Ganoderma lucidum* exerts anti-tumor effects on ovarian cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin. *International Journal of Oncology*. 2011;38(5):1319-27.

113. Lee MK, Hung TM, Cuong TD, Na M, Kim JC, Kim EJ, et al. Ergosta-7,22-diene-2 β ,3 α ,9 α -triol from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* induces apoptosis in human myelocytic HL-60 cells. *Phytotherapy Research : PTR*. 2011;25(11):1579-85.

114. Sliva D, English D, Lyons D, Lloyd FP, Jr. Protein kinase C induces motility of breast cancers by upregulating secretion of urokinase-type plasminogen activator through activation of AP-1 and NF-kappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;290(1):552-7.

115. Sliva D, Rizzo MT, English D. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(5):3150-7.

116. Sliva D, Labarrere C, Slivova V, Sedlak M, Lloyd FP, Ho NW. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;298(4):603-12.

117. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *International Journal of Cancer*. 2002;102(3):250-3.

118. Lin S-B, Li C-H, Lee S-S, Kan L-S. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life sciences*. 2003;72(21):2381-90.

119. Wu CT, Lin TY, Hsu HY, Sheu F, Ho CM, Chen EI. Ling Zhi-8 mediates p53-dependent growth arrest of lung cancer cells proliferation via the ribosomal protein S7-MDM2-p53 pathway. *Carcinogenesis*. 2011;32(12):1890-6.
120. Liang C, Li H, Zhou H, Zhang S, Liu Z, Zhou Q, et al. Recombinant Lz-8 from *Ganoderma lucidum* induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagic cell death in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncology Reports*. 2012;27(4):1079-89.
121. Suarez-Arroyo IJ, Rosario-Acevedo R, Aguilar-Perez A, Clemente PL, Cubano LA, Serrano J, et al. Anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* (reishi) in inflammatory breast cancer in in vivo and in vitro models. *PloS One*. 2013;8(2):e57431.
122. Jang KJ, Han MH, Lee BH, Kim BW, Kim CH, Yoon HM, et al. Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 2010;3(1):24-31.
123. Thyagarajan A, Jedinak A, Nguyen H, Terry C, Baldrige LA, Jiang J, et al. Triterpenes from *Ganoderma Lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). *Nutrition and Cancer*. 2010;62(5):630-40.
124. Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. Ganoderic acid T inhibits tumor invasion in vitro and in vivo through inhibition of MMP expression. *Pharmacological Reports : PR*. 2010;62(1):150-63.
125. Gao Y, Zhou S, Jiang W, Huang M, Dai X. Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. *Immunological Investigations*. 2003;32(3):201-15.
126. Evans WC. Trease and Evans' pharmacognosy: Elsevier Health Sciences; 2009.
127. Harborne JB. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis: Springer Science & Business Media; 1998.
128. Wu TS, Shi LS, Kuo SC. Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes. *Journal of Natural Products*. 2001;64(8):1121-2.
129. Guan SH, Xia JM, Yang M, Wang XM, Liu X, Guo DA. Cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2008;10(7-8):705-10.

130. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*. 2007;13:265-301.
131. Su CH, Yang YZ, Ho HO, Hu CH, Sheu MT. High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *Journal of Chromatographic Science*. 2001;39(3):93-100.
132. Huang SQ, Ning ZX. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47(3):336-41.
133. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
134. Shimizu K, Miyamoto I, Liu J, Konishi F, Kumamoto S, Kondo R. Estrogen-like activity of ethanol extract of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Wood Science*. 2009 2009/02/01;55(1):53-9.
135. Saceda M, Lippman ME, Chambon P, Lindsey RL, Ponglikitmongkol M, Puente M, et al. Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Molecular Endocrinology*. 1988;2(12):1157-62.
136. Hu H, Ahn N-S, Yang X, Lee Y-S, Kang K-S. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *International Journal of Cancer*. 2002;102(3):250-3.
137. Gonul O, Aydin HH, Kalmis E, Kayalar H, Ozkaya AB, Atay S, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) Extracts on the miRNA Profile and Telomerase Activity of the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015;17(3):231-9.
138. Liu Y-W, Gao J-L, Guan J, Qian Z-M, Feng K, Li S-P. Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of *Ganoderma* on tumor cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(8):3087-93.

139. Gao Y, Tang W, Dai X, Gao H, Chen G, Ye J, et al. Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *Journal of Medicinal Food*. 2005;8(2):159-68.
140. Lu Q-Y, Sartippour MR, Brooks MN, Zhang Q, Hardy M, Go VL, et al. *Ganoderma lucidum* spore extract inhibits endothelial and breast cancer cells in vitro. *Oncology Reports*. 2004;12(3):659.
141. Müller CI, Kumagai T, O'Kelly J, Seeram NP, Heber D, Koeffler HP. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research*. 2006;30(7):841-8.
142. Lu Q-Y, Jin Y-S, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VLW, et al. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Letters*. 2004;216(1):9-20.
143. Chen N-H, Liu J-W, Zhong J-J. Ganoderic acid Me inhibits tumor invasion through down-regulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008;108(2):212-6.
144. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. *Nutrition and Cancer*. 2004;49(2):209-16.
145. Sliva D, Labarrere C, Slivova V, Sedlak M, Lloyd FP, Ho NW. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;298(4):603-12.
146. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(24):21631-8.
147. Suarez-Arroyo IJ, Rosario-Acevedo R, Aguilar-Perez A, Clemente PL, Cubano LA, Serrano J, et al. Anti-Tumor Effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Inflammatory Breast Cancer in In Vivo and In Vitro Models. *PLoS One*. 2013;8(2):e57431.

148. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):362-74.
149. Nagaraja GM, Othman M, Fox BP, Alsaber R, Pellegrino CM, Zeng Y, et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene*. 2006;25(16):2328-38.
150. Wu G, Qian Z, Guo J, Hu D, Bao J, Xie J, et al. Ganoderma lucidum extract induces G1 cell cycle arrest, and apoptosis in human breast cancer cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2012;40(3):631-42.
151. Jiang J, Slivova V, Valachovicova T, Harvey K, Sliva D. Ganoderma lucidum inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3. *International Journal of Oncology*. 2004;24(5):1093-9.
152. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology*. 1998;54(1):105-12.
153. Jiang J, Slivova V, Sliva D. Ganoderma lucidum inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *International Journal of Oncology*. 2006;29(3):695-703.
154. Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*. 1976;36(8):2891-5.
155. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(2):157-70.
156. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990;47(2):219-31.
157. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010;115(2):155-62.

158. Cherian E, Sudheesh NP, Janardhanan KK, Patani G. Free-radical scavenging and mitochondrial antioxidant activities of Reishi-Ganoderma lucidum (Curt: Fr) P. Karst and Arogyapacha-Trichopus zeylanicus Gaertn extracts. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 2009;20(4):289-307.
159. Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom Ganoderma lucidum. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(21):6646-52.
160. Yue Q-X, Xie F-B, Guan S-H, Ma C, Yang M, Jiang B-H, et al. Interaction of Ganoderma triterpenes with doxorubicin and proteomic characterization of the possible molecular targets of Ganoderma triterpenes. Cancer Science. 2008;99(7):1461-70.
161. Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, et al. Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer. International Immunopharmacology. 2006;6(3):499-508.
162. Oka S, Tanaka S, Yoshida S, Hiyama T, Ueno Y, Ito M, et al. A water-soluble extract from culture medium of Ganoderma lucidum mycelia suppresses the development of colorectal adenomas. Hiroshima Journal of Medical Sciences. 2010;59(1):1-6.