

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Phellinus igniarius (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN EPİDERMOİD
KARSİNOMA HÜCRELERİNİN MEMBRANI ÜZERİNE PROOKSİDAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bürke ÇIRÇIRLI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Phellinus igniarius (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN EPİDERMOİD
KARSİNOMA HÜCRELERİNİN MEMBRANI ÜZERİNE PROOKSİDAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bürke ÇIRÇIRLI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Phellinus igniarius (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN EPİDERMOİD
KARSİNOMA HÜCRELERİNİN MEMBRANI ÜZERİNE PROOKSİDAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bürke ÇIRÇIRLI
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafında FYL-2020-5152 nolu proje ile desteklenmiştir.

ARALIK 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Phellinus igniarius* (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin
TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN EPİDERMOİD
KARSİNOMA HÜCRELERİNİN MEMBRANI ÜZERİNE PROOKSİDAN VE
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bürke ÇIRÇIRLI
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 17/12/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN (Danışman)

Prof. Dr. Hasan AKGÜL

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ERDOĞAN GÖKHAN

ÖZET

***Phellinus igniarius* (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN EPİDERMOİD KARSİNOMA HÜCRELERİNİN MEMBRANI ÜZERİNE PROOKSİDAN VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bürke ÇIRÇIRLI

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Aralık 2021; 73 sayfa

Bu çalışmada, *Phellinus igniarius* (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin türlerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının epidermoid karsinoma (A431) ve sağlıklı fibroblast (Bj) hücrelerinin membranı üzerine antioksidan ve prooksidan aktiviteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

P. igniarius ve *P. torulosus* ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine prooksidan (sitotoksik) etkisi, MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile belirlenmiştir. Ekstraktlarımızın antioksidan etkisini ortaya koymak için hücreler farklı konsantrasyonlarda ekstraktlar ile ($<IC_{50}$) bir saat ön uygulamaya bırakıldıktan sonra güçlü bir oksitleyici ajan olan H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) 24 saat maruz bırakılmıştır. Ekstraktların A431 ve Bj hücre membranları üzerinde oluşturduğu hasar prooksidan etkiyi gösterirken, ekstraktların oksitleyici bir ajan olan H_2O_2 'e karşı koruyucu etkileri antioksidan etkiyi açıklamaktadır. Bu etkiler ekstraktlara maruz bırakılan hücrelerde MDA (Malondialdehit) ve GPx (Glutasyon Peroksidaz) düzeylerinin belirlenmesiyle ortaya koyulmuştur. Ekstraktların prooksidan etkisini ortaya koymak için, hücreler 24 saat boyunca IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında su ve metanol ekstraktlarına maruz bırakılarak MDA düzeyi ve GPx aktivitesi ölçülmüştür. Ekstraktlarımızın antioksidan etkisini ortaya koymak için hücrelerimiz düşük konsantrasyonlarda ($<IC_{50}$) ekstraktlarımızla ön inkübasyona bırakıldıktan sonra yüksek konsantrasyonlarda ($\geq IC_{50}$) H_2O_2 ile muamele edildikten sonra MDA düzeyleri ve GPx aktivitelerinin ölçülmesiyle ortaya koyulmuştur.

P. igniarius metanol ekstraktının A431 ve Bj hücre dizilerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 100 $\mu g/mL$ ve 295 $\mu g/mL$, su ekstraktının ise bu hücrelerdeki IC_{50} değerleri sırasıyla 188.2 $\mu g/mL$ ve 350 $\mu g/mL$ olarak bulunmuştur. *P. torulosus* metanol ekstraktının A431 ve Bj hücre dizilerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 140 $\mu g/mL$ ve 216.6 $\mu g/mL$, *P. torulosus* su ekstraktının ise A431 ve Bj hücre dizilerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 200 $\mu g/mL$ ve 241.7 $\mu g/mL$ olarak bulunmuştur. A431 hücre dizisinin Bj hücre dizisine göre *P. torulosus* su ekstraktına kıyasla *P. igniarius* su ekstraktına 1.28 kat daha hassas olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre A431 hücre dizisi *P. igniarius* su ekstraktına kıyasla *P. torulosus* metanol ekstraktına 2.17 kat daha hassas bulunmuştur. Sonuç olarak her iki ekstrakta karşı A431 hücrelerinin sağlıklı Bj hücrelerine kıyasla daha hassas olduğu görülmüştür.

P. igniarius ve *P. torulosus* ekstraktlarının H_2O_2 sitotoksitesine karşı antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için A431 ve Bj hücre dizileri IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} ekstrakt konsantrasyonları ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu hücrelerde *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un hem su hem de metanol ekstraktlarının H_2O_2 sitotoksitesine karşı antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. A431 ve Bj hücrelerinde *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktları için hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{20} konsantrasyonunda görülmüştür. *P. igniarius* ve *P. torulosus* su ekstraktları IC_{50} ve IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etkiyi IC_{30} konsantrasyonunda göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre ekstraktlar yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermiştir. IC_{50} değerinden daha düşük ekstrakt konsantrasyonlarında ise H_2O_2 sitotoksitesine karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

A431 hücrelerine uygulanan *P. igniarius* metanol ve su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonunda ortaya çıkan MDA düzeyi, H_2O_2 IC_{50} konsantrasyonuna oranla sırasıyla 1.52 kat ve 1.65 kat daha az bulunmuştur. Sadece IC_{50} H_2O_2 uygulanan A431 hücrelerindeki MDA düzeyi IC_{50} $H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 2.2 kat artarken, IC_{50} $H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2.35 kat artmıştır. IC_{50} *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerde IC_{50} H_2O_2 uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.54 kat daha az bulunmuştur. IC_{50} *P. torulosus* su ekstraktı uygulanan hücrelerin MDA düzeyi IC_{50} H_2O_2 uygulanan hücrelere oranla 1.7 kat daha az bulunmuştur. Bj hücrelerine uygulanan *P. igniarius* metanol ve su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonunda ortaya çıkan MDA düzeyi, H_2O_2 IC_{50} konsantrasyonuna oranla sırasıyla 1.74 kat ve 1.9 kat daha az bulunmuştur. Sadece IC_{50} H_2O_2 uygulanan Bj hücrelerindeki MDA düzeyi IC_{50} $H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 2 kat artarken, IC_{50} $H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2.3 kat artmıştır. IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 uygulanan hücrelerdeki MDA düzeyi belirtilen konsantrasyonda *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulananlardan 2 kat fazla, *P. torulosus* su ekstraktı uygulananlarda ise 2.1 kat daha fazla bulunmuştur. IC_{20} ve IC_{30} konsantrasyonlarında ekstraktlarla 1 saat öninkübasyona bırakıldıktan sonra H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılan hücrelerde MDA düzeyleri sadece H_2O_2 'e maruz bırakılanlara göre daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç ekstraktlarımızın güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e karşı hücrelerimizde antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

P. igniarius metanol ekstraktının IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerindeki GPx düzeyleri sırasıyla 0.62 $\mu M/L$ ve 0.38 $\mu M/L$ olarak bulunmuştur. *P. igniarius* su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerindeki GPx düzeyleri ise sırasıyla 0.45 $\mu M/L$ ve 0.34 $\mu M/L$ olarak belirlenmiştir. *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50}) maruz bırakılan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla 12.4 ve 9 kat daha fazla bulunmuştur. Bj hücrelerinde ise sırasıyla 5.1 ve 4.53 kat daha fazla bulunmuştur. IC_{50} konsantrasyonunda *P. torulosus* metanol ekstraktına maruz bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerindeki GPx düzeyleri sırasıyla 0.42 $\mu M/L$ ve 0.39 $\mu M/L$ bulunurken *P. igniarius* su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerindeki GPx düzeyleri ise sırasıyla 0.37 $\mu M/L$ ve 0.40 $\mu M/L$ olarak bulunmuştur. IC_{50} konsantrasyonunda *P. torulosus* metanol ve su ekstraktına maruz kalan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri, kontrol grubuna göre 8.4 ve 7.4 kat daha fazla bulunurken, Bj hücreleri

için sırasıyla 5.2 ve 5.6 kat daha fazla bulunmuştur. *P. igniarius*'un IC₂₀ metanol ve IC₃₀ su ekstraktları ile 1 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra 24 saat IC₅₀ H₂O₂'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde GPx düzeyleri sadece IC₅₀ H₂O₂'e maruz bırakılanlara göre sırasıyla 2 ve 4 kat daha düşük bulunmuştur. Bj hücrelerinde ise GPx düzeyleri 4.1 ve 5 kat daha düşük bulunmuştur. *P. torulosus*'un IC₂₀ metanol ve IC₃₀ su ekstraktları ile 1 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra 24 saat IC₅₀ H₂O₂'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde GPx düzeyleri sadece IC₅₀ H₂O₂'e maruz bırakılanlara göre sırasıyla 2.3 ve 5.3 kat daha düşük bulunmuştur. Bj hücrelerinde ise GPx düzeyleri 4.2 ve 5.7 kat daha düşük bulunmuştur.

Hücrelerimizde, düşük konsantrasyonlardaki metanol ve su ekstraktları güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı membran koruyucu (antioksidan) etki gösterirken ekstraktlarımız IC₅₀ ve üzeri konsantrasyonlarda MDA miktarını arttırarak prooksidan etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktının su ekstraktına oranla daha yüksek bir sitotoksik etki göstererek membran hasarına neden olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda ekstraktların Bj hücre dizisinde daha yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki göstermesi seçici toksisiteye sahip olduğunun göstergesidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Antikanser, Antioksidan, GPx, MDA, *Phellinus igniarius*, *Phellinus torulosus* ve Prooksidan

JÜRİ: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Hasan AKGÜL

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ERDOĞAN GÖKHAN

ABSTRACT

INVESTIGATION of PROOXIDANT and ANTIOXIDANT EFFECTS of EXTRACTS from *Phellinus igniarius* (L.) Quél and *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin, SPECIES on THE MEMBRANE of EPIDERMOID CARCINOMA CELLS

Bürke ÇIRÇIRLI

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

December 2021; 73 pages

In this study, methanol, and water extracts obtained from *Phellinus igniarius* (L.) Quél and *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin, species were evaluated comparatively for their antioxidant and prooxidant activities on the membrane of epidermoid carcinoma (A431) cells and healthy fibroblast (Bj) cells.

The prooxidant (cytotoxic) effect of *P. igniarius* and *P. torulosus* extracts on A431 and Bj cell lines was defined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) test. In order to demonstrate the antioxidant effect of our extracts, the cells were exposed to H₂O₂ (IC₅₀ and IC₇₀), a strong oxidizing, for 24 hours after the pretreatment with extracts at different concentrations, (<IC₅₀) for one hour. While the damage caused by the extracts on A431 and Bj cell membranes shows the prooxidant effect, the protective effects of the extracts against H₂O₂, an oxidizing, explain the antioxidant effect. These effects were demonstrated by the determination of MDA (Malondialdehyde) and GPx (Glutathione Peroxidase) levels in cells exposed to the extracts. In order to demonstrate the pro-oxidant effect of the extracts, the MDA level and GPx activity were measured by exposing the cells to water and methanol extracts at IC₅₀ and IC₇₀ concentrations for 24 hours. In order to demonstrate the antioxidant effect of our extracts, our cells were pre-incubated with our extracts at low concentrations (<IC₅₀) and then treated with high concentrations (≥IC₅₀) H₂O₂, and then measured MDA levels and GPx activities.

The IC₅₀ values of *P. igniarius* methanol extract in A431 and Bj cell lines were found to be 100 µg/mL and 295 µg/mL, respectively, and the IC₅₀ values of the water extract in these cells were 188.2 µg/mL and 350 µg/mL, respectively. The IC₅₀ values of *P. torulosus* methanol extract in A431 and Bj cell lines were 140 µg/mL and 216.6 µg/mL, respectively, and the IC₅₀ values of *P. torulosus* water extract in A431 and Bj cell lines were found to be 200 µg/mL and 241.7 µg/mL, respectively. It was defined that A431 cell line was 1.28 times more sensitive to *P. igniarius* water extract compared to *P. torulosus* water extract compared to Bj cell line. According to the results obtained, A431 cell line was found to be 2.17 times more sensitive to *P. torulosus* methanol extract

compared to *P. igniarius* water extract. Consequently, it was observed that A431 cells were more sensitive to both extracts than healthy Bj cells.

In order to determine the antioxidant activity of *P. igniarius* and *P. torulosus* extracts against H₂O₂ cytotoxicity, A431 and Bj cell lines were pre-incubated with IC₁₀, IC₂₀ and IC₃₀ extract concentrations. It was defined that both water and methanol extracts of *P. igniarius* and *P. torulosus* showed antioxidant effects against H₂O₂ cytotoxicity in these cells. For *P. igniarius* and *P. torulosus* methanol extracts in A431 and Bj cells, the highest antioxidant effect was monitored at IC₂₀ concentration against both IC₅₀ and IC₇₀ H₂O₂ concentrations. *P. igniarius* and *P. torulosus* water extracts showed the highest antioxidant effect at IC₃₀ concentration against IC₅₀ and IC₇₀ H₂O₂ concentrations. According to the results obtained, the extracts showed cytotoxic effects at high concentrations. At extract concentrations lower than the IC₅₀ value, it was found to have antioxidant activity against H₂O₂ cytotoxicity.

The MDA level that appeared at the IC₅₀ concentration of *P. igniarius* methanol and water extract applied to A431 cells was 1.52 times and 1.65 times less than the H₂O₂ IC₅₀ concentration, respectively. While the MDA level in A431 cells, which was applied only IC₅₀ H₂O₂, increased 2.2 times compared to the cells in which IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* methanol extract was applied, it increased 2.35 times in cells exposed to IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* water extract. The MDA level was 1.54 times lowering in cells treated with IC₅₀ *P. torulosus* methanol extract compared to cells treated with IC₅₀ H₂O₂. The MDA level of cells treated with IC₅₀ *P. torulosus* water extract was found to be 1.7 times lower than in cells treated with IC₅₀ H₂O₂. The MDA level that emerged at the IC₅₀ concentration of *P. igniarius* methanol and water extract applied to Bj cells was 1.74 times and 1.9 times less than the H₂O₂ IC₅₀ concentration, respectively. While the MDA level in Bj cells, which was applied only IC₅₀ H₂O₂, increased 2 times compared to the cells to which IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* methanol extract was applied, it increased 2.3 times in the cells exposed to IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* water extract. The MDA level in cells treated with H₂O₂ at IC₅₀ concentration was 2 times higher than those treated with *P. torulosus* methanol extract at the specified concentration, and 2.1 times higher in those treated with *P. torulosus* water extract. After pre-incubation with extracts at IC₂₀ and IC₃₀ concentrations for 1 hour, MDA levels were found to be lower in cells exposed to H₂O₂ for 24 hours compared to those exposed only to H₂O₂. This result discloses that our extracts have an antioxidant effect in our cells against H₂O₂, which is a strong oxidant.

GPx levels in A431 and Bj cell lines exposed to the IC₅₀ concentration of *P. igniarius* methanol extract were found to be 0.62 µM/L and 0.38 µM/L respectively. GPx levels in A431 and Bj cell lines exposed to the IC₅₀ concentration of *P. igniarius* water extract were determined as 0.45 µM/L and 0.34 µM/L, respectively. The GPx levels of A431 cells exposed to methanol and water extracts (IC₅₀) of *P. igniarius* were found to be 12.4 and 9 times higher, respectively, than the control group. It was found 5.1 and 4.53 times higher in Bj cells, respectively. GPx levels in A431 and Bj cell lines exposed to *P.*

torulosus methanol extract at IC₅₀ concentration were 0.42 µM/L and 0.39 µM/L, respectively, while GPx levels in A431 and Bj cell lines exposed to IC₅₀ concentration of *P. igniarius* water extract were 37 µM/L and 0.40 µM/L, respectively. The GPx levels of A431 cells exposed to *P. torulosus* methanol and water extract at IC₅₀ concentration were 8.4 and 7.4 times higher than the control group, while it was 5.2 and 5.6 times higher for Bj cells, respectively. After pre-incubation with IC₂₀ methanol and IC₃₀ water extracts of *P. igniarius* for 1 hour, GPx levels in A431 cells exposed to IC₅₀ H₂O₂ for 24 hours were found to be 2 and 4 times lower, respectively, than those exposed only to IC₅₀ H₂O₂. GPx levels were found to be 4.1 and 5 times lowering in Bj cells. After pre-incubation with IC₂₀ methanol and IC₃₀ water extracts of *P. torulosus* for 1 hour, GPx levels in A431 cells exposed to IC₅₀ H₂O₂ for 24 hours were found to be 2.3 and 5.3 times lower, respectively, than those exposed to IC₅₀ H₂O₂ alone. GPx levels were found to be 4.2 and 5.7 times lower in Bj cells.

In our cells, methanol and water extracts at low concentrations have a membrane protective (antioxidant) effect against a strong oxidant, H₂O₂, while our extracts have a pro-oxidant effect by increasing the amount of MDA at IC₅₀ and above concentrations. When the obtained results were compared, it was found that the methanol extract of *P. igniarius* and *P. torulosus* caused membrane damage by showing a higher cytotoxic effect compared to the water extract. At the same time, the higher concentrations of the extracts in Bj cell lines show us a cytotoxic effect, indicating that they have selective toxicity.

KEYWORDS: Anticancer, Antioxidant, GPx, MDA, *P. igniarius*, *P. torulosus* and Prooxidant

COMMITTEE: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Hasan AKGÜL

Asst. Prof. Dr. Ayşe ERDOĞAN GÖKHAN

ÖNSÖZ

Cilt kanseri çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Cilt kanseri melanom ve melanom dışı cilt kanserleri olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Melanom Dışı cilt kanserleri ise bazal hücreli karsinoma ve epidermoid karsinoma olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

Kanser tedavisinde kemoterapinin başarılı olamamasının en önemli nedenleri, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direnç geliştirmesi ve antikanser ilaçlarının hedefe yönelik olmaması neticesinde yan etkilerinin çok olmasıdır. Bu durum bilim insanlarını karşılaştıkları sorunları azaltmaya yol açacak, doğal olarak yetişen, tedavi edici özelliklere sahip olan fungus gibi kaynakları kullanmaya yönlendirmiştir. Makrofungusların içerdiği biyoaktif bileşenler, alternatif tedavi amaçlı kullanılabilecek ilaçların üretimi için yüksek bir potansiyele sahiptir. Bu bileşikler immün yanıtları modüle edebilir aynı zamanda bazı tümör büyümelerini tetikleyen faktörleri inhibe edebilir.

Bu bileşenleri barındıran *Phellinus* türleri, terapötik potansiyelleri dolayısıyla bilim insanlarının odak noktası haline gelmeyi başarmıştır. Düşük konsantrasyonlarda güçlü bir oksidana karşı antioksidan etki, yüksek konsantrasyonlarda ise kanser hücrelerinde prooksidan etki göstererek antikanser ilacı olmaya aday olan *Phellinus* ekstraktlarının yeni ilaç üretimine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Tez çalışmam sırasında bana araştırma olanağı sağlayan ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysun ÖZKAN'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz fungus (*P. igniarius* ve *P. torulosus*) ekstraktlarını temin ettiğim Sayın Prof. Dr. Hasan AKGÜL'e (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkür ederim. Bunun yanı sıra lisans eğitimimden itibaren öğrencisi olduğum, laboratuvar olanaklarını kullandığım Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne, saygıdeğer hocalarıma ve Biyoloji Bölüm Sekreteri Selda ÇİVRİL'e teşekkürlerimi sunarım. Aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım Zeynep DEMİR ve Tannaz ONSİNEJAD'a destekleri için teşekkür ederim. Desteklerini hep kalbimde hissettiğim Dr. Jale ÇELİK'e çok teşekkür ederim. Projemi (FYL-2020-5152 no'lu proje) destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi yüksek lisans tez dönemimde de tüm desteklerini esirgemeyen, maddi, manevi her daim yanımda olan ve sevgisini hep kalbimde hissettiğim aileme en kalbi duygularımı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	vii
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Cilt Kanseri.....	3
2.1.1. Cilt kanseri epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Cilt kanserinin etiyolojisi ve moleküler biyolojisi	3
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	4
2.2.1. Serbest radikaller	4
2.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	5
2.3. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemi	6
2.3.1. Glutasyon peroksidaz (GPx)	7
2.4. Fungus	8
2.4.1. <i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quél.....	9
2.4.2. <i>Phellinus torulosus</i> (Pers.) Bourdot & Galzin.....	10
2.4.3. Çeşitli <i>Phellinus</i> cinsleriyle yapılan bazı çalışmalar	11
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Fungus ekstraktlarının elde edilmesi	14
3.1.2. Hücre kültürü uygulamaları	14
3.2. Metot	17
3.2.1. Sitotoksite ölçümleri.....	17
3.2.2. Ekstraktların hücre membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	19
3.2.3. İstatistiksel analizler	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. H ₂ O ₂ 'in Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	22

4.2. <i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	23
4.2.1. <i>P. igniarius</i> ekstraktlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	23
4.2.2. <i>P. torulosus</i> ekstraktlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	27
4.3. <i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerine Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi.....	31
4.3.1. <i>P. igniarius</i> ekstraktlarının hücre dizileri üzerine antioksidan etkilerinin belirlenmesi.....	31
4.3.2. <i>P. torulosus</i> ekstraktlarının hücre dizileri üzerine antioksidan etkilerinin belirlenmesi.....	35
4.4. <i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> Ekstraktlarının Hücre Dizilerinin Membranı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	38
4.4.1. <i>P. igniarius</i> ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizilerinde MDA düzeylerinin belirlenmesi.....	38
4.4.2. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizilerinde MDA düzeylerinin belirlenmesi	42
4.5. <i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerindeki GPx Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
4.5.1. <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi	46
4.5.2. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR	66
7. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Phellinus igniarius* (L.) Quél ve *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin türlerinden elde edilen ekstraktların epidermoid karsinoma hücrelerinin membranı üzerine prooksidan ve antioksidan etkilerinin araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17/12/2021

Bürke ÇIRÇIRLI

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
$\cdot O$	: Süperoksit Anyonu
$\cdot L$	: Lipit Radikali
$^{\circ}C$	: Santigrat Derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromol
$CCl_3O_2 \cdot$	: Peroksil Radikali
cm^2	: Santimetre Kare
CO_2	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
dk	: Dakika
Fe	: Demir
H_2O	: Su
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
1O_2	: Singlet Oksijen
LOO^-	: Lipid Peroksil
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm^3	: Milimetreküp
Mn	: Mangan
nm	: Nanometre
nM	: Nanomol
O_2	: Moleküler Oksijen
O_3	: Ozon

OH·	: Hidroksil Radikali
R·	: Alkil Radikali
RH	: Lipid Membran
RO·	: Alkoksi
ROO·	: Peroksil Radikali
ROO·	: Peroksi Radikali
ROOH	: Hidroperoksit
X	: Radikal
Zn	: Çinko
α	: Alfa
β	: Beta
.	: Ondalık Ayraç

Kısaltmalar

4-HNE	: Trans-4-Hidroksi-2 Nonenal
5-FU	: 5- Floro Urasil
A431	: Epidermoid Karsinoma Hücre Dizisi
A549	: Alveolar Bazal Epitelyal Kanser Hücre Dizisi
ACHN	: Böbrek Kanseri Hücre Dizisi
AGS	: Gastrik Kanser Hücre Dizisi
ATCC	: American Type Culture Collection
BAX	: Bcl-2 İlişkili X Proteini
BCL-2	: B-Hücre Lösemi 2
Bj	: Sağlıklı Fibroblast Hücre Dizisi
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAT	: Katalaz
DMEM	: Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
DU-145	: Prostat Kanseri Hücre Dizisi
EAF	: Etil Asetat Fraksiyonu
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ETS	: Elektron Transport Sistemi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FRAP	: Ferrik İndirgeyici Antioksidan Gücü
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
HaCaT	: Keratinosit Hücreleri
HCl	: Hidroklorik Asit
HCT-116	: Kolon Kanseri Hücre Dizisi
HCT-8	: İntestinal Karsinoma Hücre Dizisi
HeLa	: Rahim Ağzı Kanseri Hücre Dizisi
HepG2	: Karaciğer Kanseri Hücre Dizisi
HGC	: Karaciğer Kanseri Hücre Dizisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₁₀	: Hücrelerin %10'unu Öldüren Konsantrasyon
IC ₂₀	: Hücrelerin %20'sini Öldüren Konsantrasyon

IC ₃₀	: Hücrelerin %30'unu Öldüren Konsantrasyon
IC ₅₀	: Hücrelerin %50'sini Öldüren Konsantrasyon
IC ₇₀	: Hücrelerin %70'ini Öldüren Konsantrasyon
IPS	: Çözünebilir Hücreler Arası Polisakkarit
LNCaP	: Prostat Kanseri Hücre Dizisi
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücresi
MDA	: Malondialdehit
MGC-803	: Gastrik Kanser Hücre Dizisi
MTT	: 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide
Myc	: Miyelositomozis Proto-onkogeni
NADPH	: Nikodinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NEAA	: Non-Essential Amino Acid
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
<i>P. baumii</i>	: <i>Phellinus baumii</i>
<i>P. igniarius</i>	: <i>Phellinus igniarius</i>
<i>P. linteus</i>	: <i>Phellinus linteus</i>
<i>P. torulosus</i>	: <i>Phellinus torulosus</i>
p16	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör
P-450	: Sitokrom 450 Proteini
p53	: Tümör Protein 53
PBS	: Fosfat Tamponlu Saline
PC-3	: Prostat Kanseri Hücre Dizisi
PL-N1	: <i>P. linteus</i> Polisakkariti
PPB	: <i>P. baumii</i> Polisakkariti
PPI	: <i>P. igniarius</i> Polisakkariti

PSeP	: <i>P. igniarius</i> Selenyum ile Zenginleştirilmiş Misel Polisakkaritleri
RAW264.7	: Makrofaj Hücre Dizisi
Rb	: Retinoblastoma
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
S.H.	: Standart Hata
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SW-480	: Kolon Kanseri Hücre Dizisi
T24	: İdrar Torbası Kanseri Hücre Dizisi
TAS	: Toplam Antioksidan Durumu
TBARS	: Tiyobarbütirik Asit
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TOS	: Toplam Oksidan Durumu
TPC	: Toplam Fenol İçeriği
U87	: Beyin Kanseri Hücre Dizisi
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mitoloji ve fungus ilişkisi	2
Şekil 2.1. Lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan iki önemli aldehit olan a) MDA ve b) 4-HNE'in kimyasal yapısı	6
Şekil 2.2. Farklı ROS kaynakları ve üretimi.....	8
Şekil 2.3. <i>P. igniarius</i> ' a ait bir görsel	9
Şekil 2.4. <i>P. torulosus</i> 'a ait bir görsel.....	11
Şekil 3.1. Hücre sayımı ve ekimi a) Hücre çoğaltımı, flasklar; b) Thoma lamı; c) Hücrelerin thoma lamı görüntüsü; d) Hücrelerin ekimi, kuyucuklu plaklar.....	16
Şekil 3.2. Sitotoksite ölçümü sırasında kullanılan a) UV-visible spektrometre ve b) kuyucuklu plakalar	18
Şekil 4.1. H ₂ O ₂ konsantrasyonlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi	22
Şekil 4.2. <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi	24
Şekil 4.3. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi	28
Şekil 4.4. H ₂ O ₂ 'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyonlarda <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktların (<IC ₅₀) A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi.....	32
Şekil 4.5. H ₂ O ₂ 'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyon değerlerinde <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktların (<IC ₅₀) A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi.....	35
Şekil 4.6. <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizilerinin membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	39
Şekil 4.7. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizilerinin membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	43
Şekil 4.8. A) MDA standart grafiği ve B) BSA standart grafiği.....	45
Şekil 4.9. A) <i>P. igniarius</i> ve B) <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının IC ₅₀ ve IC ₇₀ değerlerinin A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Erkek ve kadın bireylerde ölüm nedenleri ve oranları	3
Çizelge 2.2. <i>P. igniarius</i> 'un genel özellikleri	9
Çizelge 2.3. <i>P. torulosus</i> 'un genel özellikleri	10
Çizelge 3.1. Hücrelerin tripsinizasyon işlemi basamakları	15
Çizelge 3.2. Hücrelerin sayım işlemi basamakları	15
Çizelge 3.3. Hücre dondurma işlemi basamakları	17
Çizelge 3.4. A431 ve Bj hücre dizileri için kullanılan <i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> ekstraktlarının konsantrasyonları	18
Çizelge 3.5. A431 ve Bj hücre dizileri için kullanılan H ₂ O ₂ konsantrasyonları	19
Çizelge 3.6. A431 ve Bj hücre dizilerinin MDA düzeylerinin ölçüm basamakları	19
Çizelge 3.7. A431 ve Bj hücre dizilerinin GPx aktivitesinin ölçüm basamakları	21
Çizelge 4.1. H ₂ O ₂ konsantrasyonlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi	23
Çizelge 4.2. <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi	26
Çizelge 4.3. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi	29
Çizelge 4.4. Fungus ekstraktlarının IC ₁₀ , IC ₂₀ , IC ₃₀ , IC ₅₀ ve IC ₇₀ konsantrasyonları	30
Çizelge 4.5. H ₂ O ₂ sitotoksitesine karşı <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarının (<IC ₅₀) hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi	34
Çizelge 4.6. H ₂ O ₂ sitotoksitesine karşı <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının (<IC ₅₀) hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi	37
Çizelge 4.7. <i>P. igniarius</i> ekstraktlarının hücre dizilerinin membranı üzerine etkileri	41
Çizelge 4.8. <i>P. torulosus</i> ekstraktlarının hücre dizilerinin membranı üzerine etkileri	44
Çizelge 4.9. <i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx miktarının belirlenmesi	49
Çizelge 4.10. <i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx miktarının belirlenmesi	50

1. GİRİŞ

Cilt kanseri, çok yaygın görülen bir kanserdir. Melanom dışı cilt kanserleri dünya çapında oldukça yaygın görülen bir kanser türü olup görülme sıklığı her yıl artmaktadır (Lomas vd. 2012; Acer ve Kaya Erdoğan 2019). 2021 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tahmini olarak 100 binden fazla bireye cilt kanseri tanısı konulacağı düşünülmektedir (American Cancer Society, 2021). Cilt kanseri melanom ve melanom dışı cilt kanserleri olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılmaktadır. Melanom dışı cilt kanserleri ise bazal hücreli karsinoma ve epidermoid karsinoma olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

Kemoterapötik ilaçların yan etkileri, kanser hücrelerinin direnç kazanması ve bu ilaçların sadece kanser hücrelerine değil sağlıklı hücrelere de zarar vermesinden dolayı oldukça fazladır. Bunun yanı sıra kemoterapötik ilaçların bir kısmı dolaşım sistemi vasıtasıyla hızlı bir şekilde elimine edilmekte ve hedef doku tarafından yeterli derecede alınamamaktadır (Yılmaz ve Takka 2020). Bu da kemoterapötik ilaçların etkili kullanımını sınırlayan etkenlerdendir. Bu durum bilim insanlarını yeni antikanser ilaçlarını keşfetmeye ve karşılaşılan sağlık sorunlarını azaltmaya yönlendirmiştir. Sentetik ilaçların kullanıldıktan sonra vücutta toksik etki yaratması neticesinde yeni antikanser ilaçlarının keşfedilmesi ihtiyacı, sekonder metabolitlerin yapı ve biyolojik aktivitelerinin farklı olması sebebiyle bilim insanlarını doğal olarak yetişen ve tedavi edici özelliklere sahip olan fungus gibi zengin besin kaynaklarını yeniden keşfetmeye ve bunları kullanmaya sevk etmiştir (Wasser 2017). Tıbbi ve tedavi edici özelliklere sahip olan makrofunguslar çoğunlukla doğada yaygın olarak yetişen funguslarla temsil edilmektedir.

Makrofunguslar, klorofil pigmenti bulundurmeyen, hişlerden meydana gelmiş, uygun nem ve sıcaklık şartlarında yaşayabilen ökaryotik organizmalardır. Organik maddelerin parçalanmasını ve mineral maddelerin toprak ile birleşimini sağlayan, karbon-azot döngüsünde büyük önem arz eden makrofungusların Çin, Japonya, Kore gibi Asya ülkelerinde çok uzun zamandır geleneksel tıp alanında kullanıldıkları bilinmektedir. Bunun yanı sıra makrofunguslar, mitolojik olarak Asya ülkelerinde oldukça büyük öneme sahiptir (Şekil 1.1). Makrofunguslar içeriğinde barındırdıkları biyoaktif bileşikler ile besin ve ilaç üretimi alanında kullanılmaktadır (Yıldız Turp ve Boylu 2018; Işık 2008; Bal 2020; Bal vd. 2019).

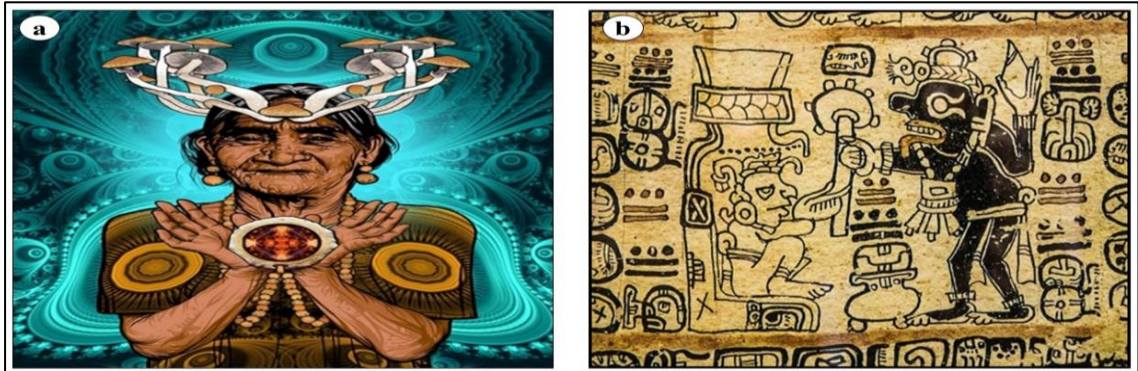
Çalışmamızda kullanılan funguslar *Phellinus* cinsine aittir ve bu cins, Hymenochaetaceae familyasına ait 41 cins polipordan biridir. Diğer poliporların çoğunun beslenme şekli gibi *Phellinus* cinsine ait olan funguslar da saprotrofik beslenme ile yaşamaktadırlar. *P. igniarius* ve *P. torulosus* türleri genellikle canlı ağaçlarda, özellikle söğüt, huş ve kavak ağaçları üzerinde yetişmektedir. Kuzey Amerika, Avrupa, Çin ve Japonya gibi ılıman iklimleri tercih etmelerine rağmen dünya genelinde yayılış gösterirler. *P. igniarius*, soliter veya gruplar halinde yaşamını sürdürebilmektedir. Yaşamının erken evrelerinde turuncumsu sarı bir renklenme gösterirken, sonraki evrelerinde koyu bir renk biçimi göstermektedir. 20 cm veya daha fazla çapa ve kalınlığa sahip bir fungustur. *P. torulosus* ise Avrupa ve Kuzey Amerika'da ölü ve yaşayan iğne yapraklı ağaçlarda beyaz öz odun çürüklüğüne neden olan funguslardır (Zapora vd. 2016).

Bilimsel araştırmalar *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un terapötik potansiyeli olan, biyolojik olarak aktif maddeler bakımından zengin olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda *P. igniarius* ve *P. torulosus* kanser tedavisinde umut verici funguslar olarak görülmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında funguslardan elde edilen ve yüksek biyoaktiviteye sahip ekstraktların antioksidan etki gösterdiği ortaya koyulmuştur (Sevindik 2018a; Sevindik 2020). Bu ekstraktların immün sistemi uyaran biyolojik immünoterapötik ajanlar olarak kullanımıyla da başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Reaktif oksijen türleri (ROS) düşük konsantrasyonlarda hücresel sinyal sistemlerinde görev alırken, yüksek konsantrasyonlarda hücrede birçok hasara yol açmaktadır. Artan ROS antioksidan savunma sistemi tarafından bulundukları ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde prooksidan/antioksidan dengesinin prooksidan lehine değişimi meydana gelir. Bu değişim hücrelerde oksidatif strese yol açmaktadır. ROS'un sebep olduğu lipid peroksidasyonu (LPO), hücre membran yapısı, geçirgenliği ve akışkanlığında değişime ve lizozomal dengenin bozulmasına sebep olmaktadır. Lipidler, hücre membranların yapısal bileşenleridir. LPO'nun, hücre sitoplazması içerisindeki lipidlerin serbest kalmasına neden olan membran degradasyonundan (bozulma) sorumlu olduğu düşünülmektedir (Rodríguez-García vd. 2020). Malondialdehit (MDA) miktarının artması da LPO'nun bir göstergesidir.

Dengenin antioksidan lehine değişmesi ise hücreleri güçlü prooksidanlara karşı korumaktadır. Antioksidan olarak tüketilen ekstraktlarla ilgili bilinmesi gerekenler oksidasyon reaksiyonları üzerinde antioksidan konsantrasyonlarının etkisinin pek çok faktöre bağlı olduğudur. Bunlar arasında antioksidanların yapısı, oksidasyonun koşulları sayılabilir. Tüm bu sayılan özelliklere karşın halen pek çok fungus türünün antikanser etki mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Kanser tedavisinde kullanılan mevcut kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapiye ek olarak fungus kaynaklı ekstraktların kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi açısından, funguslardan elde edilen ekstraktların *in vitro* çalışmalarla antikanser özelliklerinin ortaya koyulması gerekmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda melanom dışı cilt kanser tipinden olan epidermoid karsinoma (A431) ve sağlıklı fibroblast (Bj) hücre dizilerinde, *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarının prooksidan ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1.1. Mitoloji ve fungus ilişkisi (a. Anonim 1; b. Anonim 2)

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Cilt Kanseri

2.1.1. Cilt kanseri epidemiyolojisi

Cilt kanseri melanom ve melanom dışı cilt kanserleri olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Melanom dışı cilt kanserleri ise bazal hücreli karsinoma ve epidermoid karsinoma olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Melanom dışı cilt kanserleri dünya çapında oldukça yaygın görülen bir kanser türü olup görülme sıklığı her yıl katlanarak artmaktadır (Lomas vd. 2012; Acer ve Kaya Erdoğan 2019). Bazal hücreli karsinoma ve epidermoid karsinoma, cilt kanseri teşhisi konulan hastaların tanılarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Ancak ülkemizde melanom dışı cilt kanserlerinin epidemiyolojisi ve klinik özellikleri hakkında veriler sınırlıdır (Acer ve Kaya Erdoğan 2019).

Kanserin dünyada meydana gelen tüm ölümlerin 1/6'sından sorumlu olduğu bildirilmektedir (Anonim 3; Anonim 4). Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde ise bu oran 1/5 olarak bildirilmiştir (Akturan vd. 2019). Kanserin neden olduğu ölümlerin bölgesel dağılımlarına bakıldığında nüfusun fazla olduğu, batılı beslenme alışkanlıklarının yaygın olduğu ve sanayinin geliştiği bölgelerde kanserin ölüme sebebiyet verme oranının daha fazla olduğu ve bu oranın erkek bireylerde daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Erkek ve kadın bireylerde ölüm nedenleri ve oranları (Akturan vd. 2019)

2009-2016 yılları arasında cinsiyete göre ölümle ilgili hastalıklar	% Total	% Erkek Birey	% Kadın birey
Total	100	100	100
Bening-malign tümörler	20.81	24.71	16.11
Diğerleri	15.09	14.50	15.80

2.1.2. Cilt kanserinin etiyolojisi ve moleküler biyolojisi

Cilt kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojik kökenleri incelendiğinde, çalışmaların çoğu cilt kanserine neden olan pek çok faktör olmasına karşın en büyük bölümünü UV maruziyetinin oluşturduğunu göstermektedir (Lai vd. 2018). Son yıllarda daha fazla UV ışınlarına maruz kalınmakta olup bunun önemli bir nedeni ise ozon tabakasının zamanla incilmesi olarak gösterilmektedir. UV ışınlarının kansere neden olma mekanizması ise doğrudan DNA'ya hasar vermesi olarak bilinmektedir (Lai vd. 2018). Güneş ışınlarına karşı koruyucu davranışlarda bulunularak cilt kanserine yakalanma oranının azaltılabileceği öne sürülmüştür. UVA, hücre membran lipidleri ile kolay bir şekilde reaksiyona giren reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indüklemektedir. Böylelikle membran hasarı meydana gelmektedir. Bununla birlikte UV ışınları araşidonik asidin salınımı tepki genlerini aktive eden nükleer habercilerin aktivasyonuna yol

açmaktadır (Akgün 2021). UV ışınlarının cilt kanseri oluşumundaki rolü göz önünde bulundurulduğunda, cilt kanserinin önlenmesi ile ilgili çalışmalardaki en önemli adımın UV ışınlarından korunmaya teşvik edilmesi olduğu görülmektedir.

Kanser oluşumu ve gelişiminin temelinde genetik bir hasar söz konusudur. Bu hasarlar mutasyonlardan virüslere kadar pek çok etki vasıtasıyla meydana gelebilmektedir. Asıl hedef olan genler, büyümeyi stimüle eden protoonkogenler, inhibe eden kanser supresör genler ve hasara maruz kalmış DNA'ların onarımından sorumlu olan düzenleyici genlerdir. Karsinogenez sürecinde önemli genetik olaylar; onkogenlerin mutasyonlara bağlı aktivasyonu, tümör supresör genlerin aktivasyon kaybına uğraması, hücre siklusu, apoptozis regülasyonunda görev alan genlerde meydana gelen değişiklikler, DNA onarımında rol alan genlerde ortaya çıkan değişimler ve büyüme faktörleri ile reseptörlerine bağlı değişikliklerdir (Yokuş ve Çakır 2012). Bu olaylar normal koşullarda hücrel aktiviteleri düzenleyici bir etkiye sahiptir. Ancak meydana gelen mutasyonlar proteinlerin yapılarında değişikliğe yol açar ve işlevlerini yerine getirmelerini engeller. Bu proteinler ve proteinlerin kodlamış olduğu genlere Ras, Myc, BCL-2, ErbB-2 (onkogenler) ile p53, p16, Rb (tümör supresör genler) örnek verilebilir (Yokuş ve Çakır 2012). Ras proteinleri hücre büyümesi, farklılaşması ve hücrenin apoptoza yönlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Ras sinyal sistemi, Myc gibi protoonkogen ürünlerini aktive etmektedir. BCL-2 hücre apoptozisinin önlenmesi aracılığıyla kemoterapi yanıtının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. BAX, BCL-2 ile ilişkili bir protein olup mitokondriden sitokrom c'yi serbest bırakarak kaspazların aktivasyonuna yardımcı olmaktadır ve hücre ölümüne yol açan reaksiyonlar dizisini aktive ettirmektedir (Kulsoom vd. 2018). BCL-2/BAX oranı ise, hücrenin apoptotik duyarlılığını belirlemede önemli bir parametredir. Tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörünü kodlayan ErbB-2'nin, tümör varlığında ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Epidermoid karsinomanın yaklaşık %45 ila %60'ında p53 mutasyonu bulunmaktadır.

2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

2.2.1. Serbest radikaller

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektron barındıran bu moleküller, stabil duruma geçme-çift oluşturma eğiliminden dolayı radikal olarak adlandırılır (Halliwell 1987). Serbest radikallerin eşleşmemiş elektronları diğer maddelerle kolay bir şekilde etkileşime geçebilmektedir. Normal metabolik aktiviteler süresince devamlı bir şekilde üretilen serbest radikallerin vücudumuzda üretiminin artması sonucu diğer maddeler ile kolay bir şekilde reaksiyona girebilme potansiyeli, vücudumuzda birçok hasara neden olabilmektedir. Aşırı radikal birikimi oksidatif strese yol açmakta ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Altınar vd. 2018; Alam vd. 2013). Vücutta meydana gelen serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Karabulut ve Gülay 2016a).

2.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Süperoksit radikali ($\cdot\text{O}_2^-$)

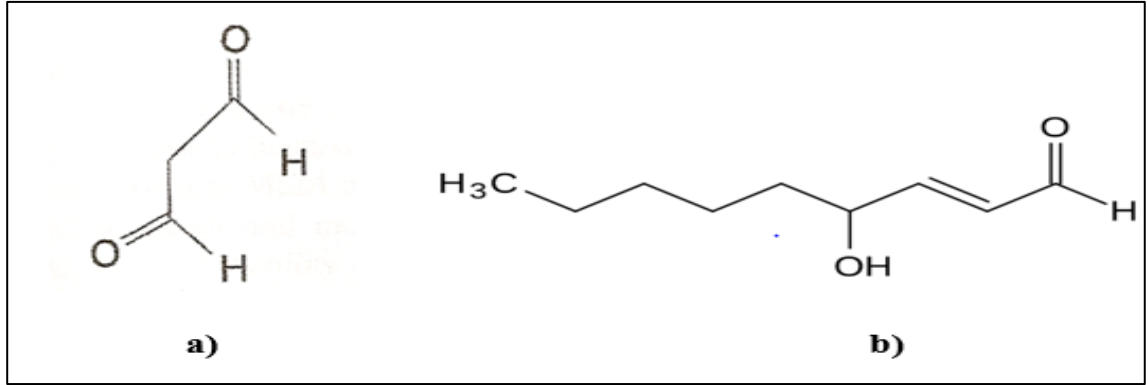
Hücrel faaliyetler sonucunda üretilen süperoksit ($\cdot\text{O}_2^-$), oksitleyici ya da indirgeyici bir ajan olarak davranabilir. Süperoksit radikali ($\cdot\text{O}_2^-$), birincil ROS olarak kabul edilir ve ikincil ROS oluşturmak için doğrudan ve yaygın olarak enzim veya metal katalizli işlemler yoluyla diğer moleküllerle etkileşime girebilir (Valko vd. 2007). Süperoksit anyonu, ETS reaksiyonu sırasında çoğunlukla bir hücrenin mitokondrisi içinde oluşturulur. Oksijenli solunum gerçekleştiren organizmalarda $\cdot\text{O}_2^-$, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla H_2O_2 'e dönüştürülmektedir. Ayrıca $\cdot\text{O}_2^-$ radikal anyonu H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyici ajanıdır.

Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$)

Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucu oluşan H_2O_2 'ten ve iyonize radyasyona maruz kalan sudan meydana gelen hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), oldukça reaktif bir ROS türüdür ve bulunduğu bölgeden proton koparma özelliğine sahiptir. $\text{OH}\cdot$ radikalinin bu özelliği, yeni radikallerin oluşumuna ve biyomakromoleküllerde hasara neden olmaktadır (Karabulut ve Gülay 2016a).

Lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$)

Başlangıç, ilerleme ve sonuç olmak üzere üç basamakta gerçekleşen LPO başlangıç basamağında, radikal (X) ile yağ asidi (LH) etkileşimi sonucunda lipid radikali (L) meydana gelmektedir. İlerleme basamağında oluşan L radikali oksijen eklenir ve peroksi radikali ($\text{LOO}\cdot$) meydana gelir. Bu $\text{LOO}\cdot$, yağ asidi ($\text{L}'\text{H}$) molekülünden ayrılan hidrojen atomu ile birleşmekte ve yeniden lipid radikallerine dönüşmektedir (Aslankoç vd. 2019). Meydana gelen radikallerin etkileşimi sonucunda radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi radikal olmayan stabil bozunma ürünleri meydana gelmektedir. Gerçekleşen olaylar ve bu süreç LPO olarak bilinmektedir. Hücre membranları, canlı sistemler için oldukça büyük ve hayati bir öneme sahiptir. LPO canlı sistem için bu denli büyük bir önem teşkil eden hücre membranının fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin okside olmasına, konformasyonunun değişmesine, bunun sonucunda ise hücre yapısı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olan bir olaydır. Radikal olmayan stabil bozunma ürünleri oluşumunda büyük bir rol oynayan oksidatif stres ve LPO, karsinogenezis ile de ilişkilendirilmiştir. LPO sonucunda açığa çıkan iki önemli membranda en çok bulunanı MDA'dır ve insan (diğer memeli hücreleri de dahil) hücrelerinde oldukça mutajenik ve karsinojeniktir (Rodríguez-García vd. 2020). intrasellüler aldehit bulunmaktadır. Bunlar MDA ve *trans*-4-hidroksi-2 nonenal'dır (4-HNE) (Şekil 2.1) (Uchida 2003; Rodríguez-García vd. 2020). Bunlardan intrasellüler



Şekil 2.1. Lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan iki önemli aldehit olan **a)** MDA ve **b)** 4-HNE'in kimyasal yapısı (Esterbauer vd. 1991; Uchida 2003)

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksijenin iki elektron vasıtasıyla indirgenmesi ya da $\cdot O_2^-$ 'lerin reaksiyonları sonucunda meydana gelen H_2O_2 , eşleşmemiş elektron bulundurmadığından dolayı radikal özelliği taşımamaktadır. Bu nedenle reaktif bir tür niteliği bulunmamaktadır. Oksitleyici olarak bilinmesi ise metal iyonlarının olduğu durumlarda H_2O_2 'in $\cdot OH$ öncülü olmasındandır (Karabulut ve Gülay 2016a). Bu nedenle canlı sistemlerde H_2O_2 ortamdan uzaklaştırılmazsa hasara neden olmaktadır.

2.3. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemi

Normal koşullar altında ökaryotik hücreler, serbest radikalleri ve bunların neden olduğu hasarı azaltmak adına bir antioksidan savunma mekanizması geliştirmiştir. Antioksidanlar, hücre ve dokuları serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan koruyan ve serbest radikallerin nötralizasyonundan sorumlu olan moleküllerdir. Normal koşullardaki hücreler prooksidan/antioksidan dengesini oluşturmak, serbest radikal ürünlerini belirli bir düzeyde tutmak kısacası oksidatif hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemlerini barındırmaktadırlar (Aslankoç vd. 2019; Kayış 2010).

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile etki göstermektedir (Cherubini vd. 2005; Young ve Woodside 2001; Taysi vd. 2002a; Taysi vd. 2002b; Habif vd. 1997).

- 1) ROS'ları etkileyerek daha az etkili moleküller haline getiriler (toplayıcı etki) ve antioksidanlar bu tarz bir etki göstermektedirler.
- 2) ROS'lar ile etkileşerek bir hidrojen atomu aktarıp onların aktivitelerinde bir azalmaya ya da inaktivasyona yol açarlar (bastırıcı etki) ve vitaminler bu tarz bir etki göstermektedirler.
- 3) ROS'ları bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarında bir inaktivasyona yol açar (zincir kırıcı etki) ve hemoglobin bu tarz bir etki göstermektedirler.
- 4) ROS'ların neden oldukları hasarların onarılması (onarıcı etki).

Antioksidan etki gösteren pek çok madde bulunmaktadır. Genel olarak antioksidanlar, kaynaklarına ve yapılarına göre antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Kaynaklarına göre antioksidanlar, endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak gruplandırılırken, yapılarına göre ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak gruplandırılmaktadır.

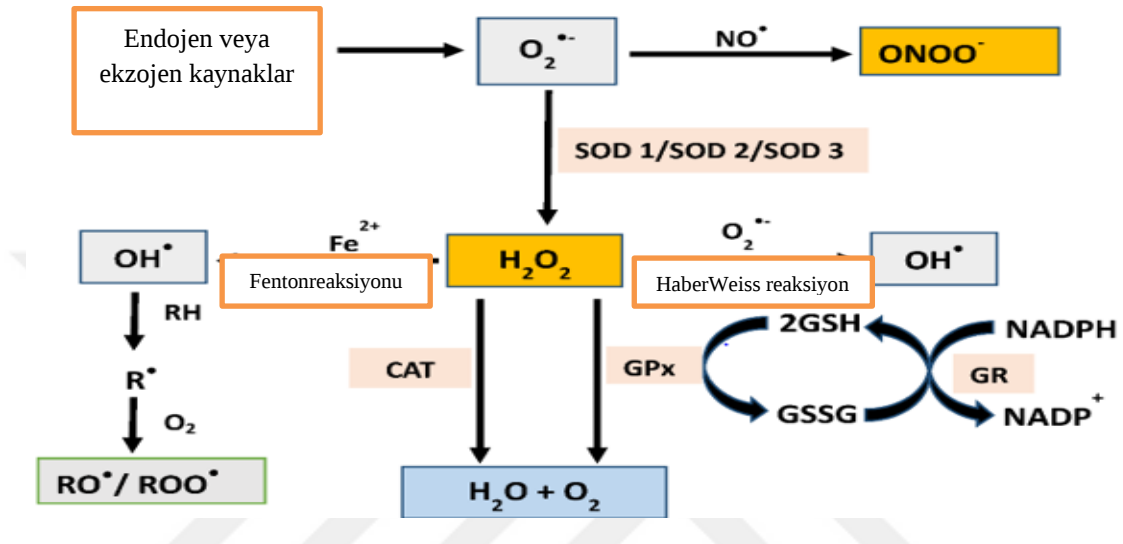
2.3.1. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Süperoksitler, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olmaktadır. Bu durum kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozmaktadır ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikalı yapım tepkimelerini hızlandırmaktadır (Aslankoç vd. 2019). Diğer radikallere göre daha az reaktif özelliğe sahip olsa da indirgenmiş nükleotidlerin, bazı amino asitleri ve antioksidan bileşiklerini oksitler. Süperoksit, hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlü ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir. Süperoksit burada daha kolay bir şekilde proton alarak hidroperoksit radikalini ($\text{HO}_2\cdot$) oluşturmaktadır. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları oksitleyebilir. H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (Aslankoç vd. 2019). Oksitleyici özelliği nedeniyle, biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, canlı sistemdeki ROS'lar ile etkileşim içerisinde olup reaksiyona giren ilk savunma sistemi enzimidir. O_2^- radikalını H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürmektedir ve dismutasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Ortaya çıkan H_2O_2 sonrasında katalaz (CAT) veya Glutasyon peroksidaz (GPx) ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Aslankoç vd. 2019). CAT, SOD tarafından inhibe edilirken meydana gelen H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e dönüştürerek detoksifikasyon mekanizmasına yardımcı olmaktadır (Limon-Pacheco ve Gonsebat 2009). Mitokondride oluşan süperoksit radikalleri ilk aşama olarak Mn-SOD ve GPx enzimleri tarafından elimine edilir. H_2O_2 'in büyük bir oranı mitokondriden ayrılarak sitoplazmaya kısmına geçiş yapar. Mitokondriden sitozole geçen H_2O_2 'in detoksifikasyonu CAT ve GPx enzimleri tarafından gerçekleştirilir. CAT, GPx'e göre daha yüksek kararlı durumdaki H_2O_2 konsantrasyonlarını temizlemektedir. Bir başka deyişle CAT düşük konsantrasyonlu H_2O_2 ile yavaş çalışmaktadır. Şayet yüksek miktarlarda H_2O_2 açığa çıkarsa o zaman katalaz enzimi devreye girmektedir.

ROS'ların neden olduğu hasarlara karşı hücreleri koruyucu bir aktiviteye sahip olan redükte formdaki glutasyonu (GSH) kofaktör olarak kullanarak ROOH (Hidroperoksit)'lerin indirgenmesinden sorumlu enzim olan GPx; iki adet tiyol grubunu bünyesinde barındıran glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltger, hidroperoksitleri ve H_2O_2 'yi indirger (Çaylak 2011; Giles 2006). Peroksit indirgenmesini katalizleyen GPx, hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüştürmekte ve H_2O_2 'yi elimine etmektedir. GPx sitozolde bulunmaktadır ve 4 dört

selenyum atomu içermektedir. Ayrıca LPO'nun başlamasını ve gelişimini engelleyip hücre membranını hasarlara karşı korumaktadır (Aslankoç vd. 2019). Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücresel membranları korumaya yarar. Oksidatif stresin belirlenmesinde oldukça önemli bir parametre olan glutasyon redüktaz (GR), pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH varlığında, GPx vasıtasıyla H_2O_2 ve organik peroksitlerin indirgenmesi sonucu açığa çıkan GSSG indirgenme reaksiyonunu katalizlemektedir (Pastore vd. 2003).



Şekil 2.2. Farklı ROS kaynakları ve üretimi CAT, katalaz; GPx, glutasyon peroksidaz; GR, glutasyon redüktaz; SOD, süperoksit dismutaz; RH, lipid membran; R., alkil radikali (Ajuwon vd. 2015)

2.4. Fungus

Organik maddeleri ayrıştırma rolünü üstlenen ve ekosistemde oldukça önemli bir yere sahip olan funguslar, mikrofungus ve makrofungus olarak 2 gruba ayrılır (Oden 2019). Makrofunguslar ise Ascomycetes ve Basidiomycetes olarak 2 alt grupta incelenmektedir.

Fungusların genel özellikleri incelendiğinde, klorofil pigmenti barındırmayan, fruktifikasyon (üreme) organları ve hiflerden meydana gelmiş gövdeleri bulunan organizmalardır. Eşeyli ve eşeysiz üreme gerçekleştirebilmektedirler. Fruktifikasyon organı, Basidiomycetes sınıfında basidiokarp olarak adlandırılırken, Ascomycetes sınıfında askokarp olarak adlandırılmaktadır. Klorofil pigmenti bulundurmamışlarından funguslar, besin maddelerini başka canlılardan ya da ölü atıklardan sağlamaktadırlar. Bir başka deyişle heterotrof organizmalardır. Parazitik ve saprofitik olarak beslenen fungus türleri mevcuttur (Oden 2019; Türkeul 2001). Hayvan ve bitki paraziti şeklinde yaşamını sürdüren fungusların hastalıklara neden olduğu bilinirken, bir kısım fungus ise zengin besin içeriği sayesinde antikanser aktivite başta olmak üzere antiviral, antimikrobiyal özelliklere sahiptirler ve tıbbi olarak kullanılmaktadırlar (Sevindik vd. 2015; Sevindik vd. 2016; Sevindik 2018b; Zhang vd. 2019).

2.4.1. *Phellinus igniarius* (L.) Quél

Phellinus igniarius, Hymenochaetaceae familyasına ait olan ve tıbbi özellikleri barındıran bir fungus türüdür (Çizelge 2.2). Çin'in Yunnan ve Sichuan eyaletlerinde yaygın bir şekilde yerleşim gösteren *P. igniarius*, geleneksel Çin ilaçlarında Sanghuang (sarı polipropus) olarak yüzyıllardan beri kullanılmaktadır (Mao 2000; Song vd. 2005; Wang 2018). Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *P. igniarius* Kaş/Kalkan (Antalya) mevkiindeki badem ağaçları üzerinden toplanmıştır.

Çizelge 2.2. *P. igniarius*'un genel özellikleri (Karagöz 2015)

Basidiocarp	3.5-20x2.5-15 cm çapında, 3-15 cm kalınlığındadır. Başlangıçta yuvarlak bir biçimde iken, yaş aldıkça tırnak (ungulat) şeklini almaktadır. Kenarları kalın, eni boyundan fazla, kıvrık geniştir.
Himenyum	Porlu ve yuvarlak bir biçimde bulunan himenyum, 1 mm'de yaklaşık 6 por bulundurmaktadır. Başlangıçta kahverengi bir renklenme gösterirken, yaş aldıkça beyaz bir yapı halini almaktadır.
Sporlar	Küresimsi, düz bir yapıda olan sporların çapı 5-7x4-6 µ'dur.
Yayılış alanı	Yaygın parazit bir fungus olma özelliği taşıyan <i>P. igniarius</i> hemen hemen tüm yapraklı ağaçlarda görülmektedir.



Şekil 2.3. *P. igniarius*' a ait bir görsel (Anonim 5)

P. igniarius en iyi antikanser aktivite gösteren funguslardandır *P. igniarius*, β (1 "3) polisakkarit glukan barındırmaktadır. Bununla birlikte *P. igniarius*'un β (1" 6) polisakkarit, galaktoz, mannoz, arabinoz, fukoz, barındırması bu fungusu diğer funguslardan daha karmaşık bir hale getirmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, β (1 "3)-D- glukanın iskeletine bağlanan birçok hidroksil grubunun, vücudun bağışıklık sistemi fonksiyonunu ve antitümör aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymaktadır (Dong vd. 2019; Zhang ve Huang 2007). *P. igniarius* ekstraktlarının kısmen glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerini indüklediği ve GSH seviyelerinin artırarak antiproliferatif, antimetastatik ve antimutajenik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Song vd. 2008).

2.4.2. *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourdot & Galzin

Phellinus torulosus, Hymenochaetaceae familyasına ait, Avrupa'da iğne yapraklı ölü ve yaşayan ağaçlarda beyaz öz odun çürüklüğüne neden olan funguslardandır (Çizelge 2.3) (Ryvarden 1994). Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *P. torulosus* Kaş/Kalkan (Antalya) mevkiindeki meşe ağaçları üzerinden toplanmıştır. Bilimsel araştırmalar geleneksel Çin tıbbında kanser de dahil pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmakta olan *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un, terapötik potansiyeli olan biyolojik olarak aktif maddeler bakımından oldukça zengin olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un kanser tedavisinde umut verici bir fungus türü olarak görülmektedir (Wang vd. 2018; Zapora vd. 2016).

Çizelge 2.3. *P. torulosus*'un genel özellikleri (Anonymous 1)

Basidiocarp	4-10x12-30 mm çapında, 1-3 cm kalınlığındadır. Üst yüzey koyu kahverengi-kadifemsi, yuvarlak kenarlıdır.
Himenyum	Himenyal tüpler kahverengi, 2-8x0.1 ila 0.2 mm çapında, mm başına 4-6 arasında aralıklı ve küçük yuvarlak kırmızı-kahverengi porlar bulundurmaktadır.
Sporlar	Yuvarlak bir biçimde, pürüzsüz, ince duvarlı, 4-6x3-4 μ m; inamyloid.
Yayılış alanı	Saprofit veya zayıf parazitik bir fungus olma özelliği taşıyan <i>P. torulosus</i> , geniş yapraklı ağaçlarda ve özellikle meşe, zeytin, sakız ağaçlarında yayılış göstermektedir.



Şekil 2.4. *P. torulosus*'a ait bir görsel (Anonymous 1)

2.4.3. Çeşitli *Phellinus* cinsleriyle yapılan bazı çalışmalar

Bal (2020) tarafından, tıbbi funguslardan olan *P. igniarius* ve *P. rimosus*'un antimikrobiyal aktiviteleri, toplam antioksidan durumu (TAS), toplam oksidan durumu (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirleme çalışmaları kapsamında Rel assay kitleri kullanılarak değerler belirlenmiştir. *P. igniarius*'un daha yüksek TAS, TOS ve OSI değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, *P. igniarius* ve *P. rimosus*'un antioksidan ve antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu farmakolojik araştırmalarda doğal kaynak olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Bal 2020).

2016 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada *P. linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus* ve *Ganoderma lucidum* metanol ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid içerikleri, sitotoksik ve antimigratuvar aktiviteleri ve kolon kanseri hücre dizileri (HCT-116 ve SW-480) üzerindeki antioksidan/prooksidan etkileri açısından *in vitro* olarak belirlenmiştir. Fungus ekstraktlarının toplam fenol içeriği, flavonoid konsantrasyonları ve DPPH aktivitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Sitotoksik aktivite MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testi, antimigratör aktivite ise Transwell testi ve β katenin immünofloresan boyaması kullanılarak değerlendirilmiştir. Prooksidan/antioksidan dengesi, süperoksit anyon radikali, nitrit ve GSH konsantrasyonları ölçülerek belirlenmiştir. Sonuç olarak *P. linteus*'un fenolik-flavonoid içerik ve DPPH süpürme kapasitesi açısından diğer türlerden etkili olduğu belirlenmiştir. *P. linteus* ekstraktının, her iki kanser hücre dizisinin hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Diğer ekstraktlar ise SW-480 hücre canlılığını seçici olarak inhibe etmiş, ancak önemli derecede sitotoksik etki göstermemiştir (Seklic vd. 2016).

P. igniarius'tan elde edilen etanol ekstraktının farklı fraksiyonlarının sitotoksik etkilerini değerlendirmek ve olası antikanser mekanizmasını açıklamayı hedefleyen bir çalışmada, tüm fraksiyonların sitotoksik aktivitesi MGC-803, BEL-7402 ve MCF-7 hücre dizilerinde test edilmiştir (Wang vd. 2017). Elde edilen sonuçlar hücre dizilerine karşı güçlü sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonun etil asetat fraksiyonu (EAF) olduğunu

göstermektedir. Ayrıca akış sitometrisi analizi, EAF'nin MGC-803 hücrelerinde hücre döngüsü S-fazının durmasını indükleyebileceğini ve konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptoza neden olabileceğini göstermiştir.

P. igniarius'un antikanser aktivitesini değerlendirmek ve olası mekanizmaları aydınlatmak amacıyla yapılan bir başka çalışmada *P. igniarius*'un (TPI) toplam etanol ekstraktının, HepG2, AGS, SGC-7901, Hela ve A549 olmak üzere beş insan kanser hücre dizisine karşı antikanser aktiviteleri MTT yöntemiyle belirlenmiştir (Wang vd. 2018). Çalışmanın sonucu TPI'nin, en yüksek sitotoksik aktiviteyi SGC-7901 hücrelerine karşı gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca SGC-7901 hücrelerinde, TPI uygulaması sonrası kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile nükleer parçalanma dahil olmak üzere hücre apoptozisine bağlı tipik morfolojik değişiklikler de gözlenmiştir. TPI, SGC-7901 hücre döngüsünü G0/G1 fazında bloke etmiştir ve siklin D1'in ifadesini aşağı regüle ederek apoptoza neden olmuştur. Bunun sonucu olarak belirgin bir mitokondriyal membran potansiyeli (MMP, $\Delta\psi_m$) çöküşüne neden olduğu, kaspaz-9/3 aktivasyonu ve PARP bölünmesini tetikleyerek mitokondriye bağımlı apoptozisi indüklediği belirtilmiştir.

Khadhr vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada beş Tunus fungusunun (*P. torulosus*, *Fomes fomentarius*, *Trametes versicolor*, *Pisolithus albus* ve *Fomitopsis pinicola*) etanolik ekstraktlarının toplam polifenol, lavonoid, lavonol, tanen, proantosiyanidin, antosiyanin içeriği, DPPH radikal süpürücü aktivite, demir indirgeme ve şelatlama gücü analizini yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar sekonder metabolitlerin biyolojik aktivite açısından önemli olduğunu göstermiştir (Khadhr vd. 2017).

Tayland'ın Kuzey Doğusu'ndan toplanan on bir *Phellinus* cinsi fungusun etanol ve su ekstraktları kullanılarak yapılan bir çalışmada, DPPH radikal süpürme aktivitesi, FRAP testi ve TBARS yöntemi ile bu fungusların *in vitro* antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir (Sunthudlakhar vd. 2019). Ayrıca fungus ekstraktlarının fitokimyasal profilleri TLC (ince tabaka kromatografisi) ve HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) teknikleri ile, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri sırasıyla Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür yöntemleri ile, toplam karbonhidrat ve triterpen içerikleri ise sırasıyla fenolsülfürik asit ve vanilin perklorik asit yöntemleri ile belirlenmiştir.

Thanh vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada yeni bir tirucallan tipi triterpenoid olan igniarin ve bilinen dört bileşik meshimakobnol A, meshimakobnol B, ergosterol ve ergosterol peroksit, *P. igniarius*'un meyve veren organlarının metanol ekstraktlarından saflaştırılmıştır. İzole edilen bu bileşikler, MCF-7, HepG2 ve Lu hücre dizilerine karşı sitotoksiteleri açısından incelenmiştir (Thanh vd. 2018).

P. igniarius ve *P. linteus*'un su ekstraktlarının polisakkarit ve toplam fenolik içeriğinin yanı sıra süperoksit dismutaz (SOD) benzeri ve antimutagenik aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada *P. igniarius*'un *P. linteus*'tan fenolikler ve polisakkaritler bakımından daha zengin ve daha yüksek SOD benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Yang vd. 2016).

P. igniarius ve *P. linteus*'tan alınan polisakkarit ekstraktlarının humoral bağışıklık ve tümör büyümesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, elde edilen polisakkaritlerin kimyasal yapıları FT-IR, GC-MS analizi ve C-13 NMR spektrumları ile, moleküler konformasyonları viskozite yöntemi ve SEC-MALLS-RI ile analiz edilmiştir. Ayrıca

kanser hücreleri üzerine etkileri ise MTT testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu polisakkaritlerin agregasyon olmadan suda moleküler olarak dağıtılabileceğini ve *in vitro* olarak HepG2 ve HeLa hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi olduğunu göstermiştir (Jia vd. 2018).

Yukarıda belirtilen literatür incelemesi sonucunda, ekstraktların sitotoksik etki gösterdiği prooksidan etki konsantrasyonu antioksidan etki konsantrasyonu ile karşılaştırılmamıştır. Ayrıca çalışmalarda belirtilen aynı türe ait ekstraktların prooksidan ve antioksidan aktiviteleri sağlıklı hücrelerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda her iki türe ait ekstraktların antikanser, prooksidan/antioksidan etki konsantrasyonları sağlıklı (Bj) ve kanser hücrelerinde (A431) karşılaştırılarak ortaya koyulmuştur.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Fungus ekstraktlarının elde edilmesi

P. igniarius ve *P. torulosus* basidiyokarpları kalıntılardan arındırılmak amacıyla yıkanarak temizlenmiştir. Ardından 40°C'deki bir fırında kurutulmuştur. Kurutulan bu örnekler değirmen kullanılarak ince toz şeklinde öğütülmüştür. Öğütülmüş olan 15'er gram örnek, ayrı ayrı 250 mL metanol ve steril distile su içerisine koyulmuştur. Hazırlanmış olan bu karışımlar 25-37°C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat 3 tekrarlı olacak şekilde ekstraksiyon işlemine tâbi tutulmuştur. İşlem esnasında örneklerin içerdiği bileşenlerin yüksek sıcaklık ile muamelesinden kaynaklı olarak yapılarının bozulmasını engellemek amacıyla sıcaklığın 40°C'yi geçmemesine özen gösterilmiştir. Fungus ekstraktları filtre (Whatman no 1) kullanılarak süzölmüştür ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör'de (Heidolph Laborota 4000) 40°C'nin altında, düşük basınçta uçurulmuştur. Bu işlem sonrasında ekstrakt içerisinde kalan sıvı kalıntılarından kurtulmak için, liyofilizatörde düşük basınç altında -110°C'de kurutulup konsantre edilmiştir. Liyofilize haldeki metanol ekstraktı DMSO (Dimetil Sülfoksit), su ekstraktı ise besiyeri içinde çözödürölerek stok solösyonlar hazırlanmıştır. Stok solösyonlar 0.45 ve 0.22 µm'lik milipor filtreden enjektör yardımı ile süzölerek steril edilmiş ve 2 mL'lik tüplere 1'er mL paylaştırılarak kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Hücre költürü uygulamaları

Besiyerinin hazırlanması

Besiyerinin hazırlanmasında Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco), Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), antibiyotik-antimikotik karışımı (Pen-Strep-Ampho Solution, Biological Industries) ve Non Essential Amino Acid (NEAA, Gibco) kullanılmıştır.

Satın alınmış olan FBS inaktive durumda olmadığından 56°C'de 30 dk sıcak su banyosu (Mettmert)'nda tutulmuş ve kompleman cevap oluşumuna sebep olan proteinlerin inaktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnaktivasyon işlemi sonrasında A431 (epidermoid karsinoma) hücre dizisi için 89 mL RPMI-1640 besiyeri içerisine 10 mL FBS ve 1 mL antibiyotik-antimikotik karışımı ilave edilmiştir. Bj (sağlıklı fibroblast) hücre dizisi için 88 mL DMEM besiyeri üzerine 10 mL FBS, 1 mL antibiyotik-antimikotik karışımı ve 1 mL NEAA ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan besiyerleri +4°C'de saklanmıştır.

Hücre dizilerinin kaynağı ve çoğaltılması

Çalışmamızda American Type Culture Collection (ATCC)' dan temin edilen ve Akdeniz Üniversitesi Fen Faköltesi Moleköler Biyoloji Anabilim Dalı, Moleköler Biyoloji ve Genetik laboratuvarımızda üretilen A431 ve Bj hücre dizileri kullanılmıştır. -80°C'de karyotüp içerisinde muhafaza edilen hücreler, költür odasında bulunan laminar flow (biyogölvenlik kabini, sınıf 2) içerisinde 37°C'de çözölüne kadar bekletilmiştir. Çözölme sonrasında karyotüp içeriğı steril santrifölj tüplerine aktarılmıştır. Santrifölj tüpü içerisine hücre hacminin 3 katı kadar besiyeri ilavesi yapılmış ve 1000xg'de 6 dk santrifölj

edilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant (dökelti) atılmış ve pellet (çökelti) 5 mL besiyerinde çözülerek 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklara (kültür kapları) ekilmiştir. 37°C'de %5 CO₂'li etüvde (Nuair) inkübe edilmiştir. Hücrelerin besiyerleri, pH değişimine ve hücre miktarındaki artışa bağlı olarak değiştirilmiştir.

Hücrelerin tripsinizasyonu ve sayımı

Hücre sayım işlemi için flaskların tabanına yapışan hücrelerin kaldırılması ve toplanması (tripsinizasyon işlemi) gerekmektedir. Hücrelerin tripsinizasyon ve sayım işlemleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Hücrelerin tripsinizasyon işlemi basamakları

1. Hücrelerin bulunduğu 75 cm ² 'lik flask içerisindeki besiyeri boşaltılmıştır.
2. Hücreler 3 mL PBS (fosfat tamponlu salin) çözeltisi ile yıkanmıştır.
3. Hücrelerin üzerine 3 mL Tripsin-EDTA (Biological Industries) çözeltisi ilave edilmiştir.
4. Tripsin-EDTA çözeltisi bulunduran flasklar, 37°C'de %5 CO ₂ 'li etüvde 5 dk bekletilmiştir.
5. Bekleme süresi sonunda flaskta süspanse halde bulunan hücreler santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
6. Flaska 3 mL PBS çözeltisi ilave edilerek tabanda kalan hücrelerin de toplanması sağlanmış ve aynı santrifüj tüpüne ilave edilmiştir.
7. Hücre süspanسیونunu içeren santrifüj tüpü, 1000xg'de 6 dk santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonunda tüp içerisindeki süpernatant atılmıştır.
9. Geriye kalan pellet üzerine, hücre yoğunluğuna bağlı olacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir.
10. Pellet ve besiyeri solüsyonunun homojen hale gelmesi için kısa bir pipetasyon (çek-bırak) işlemi yapılmış ve hücreler sayılabilecek duruma getirilmiştir.

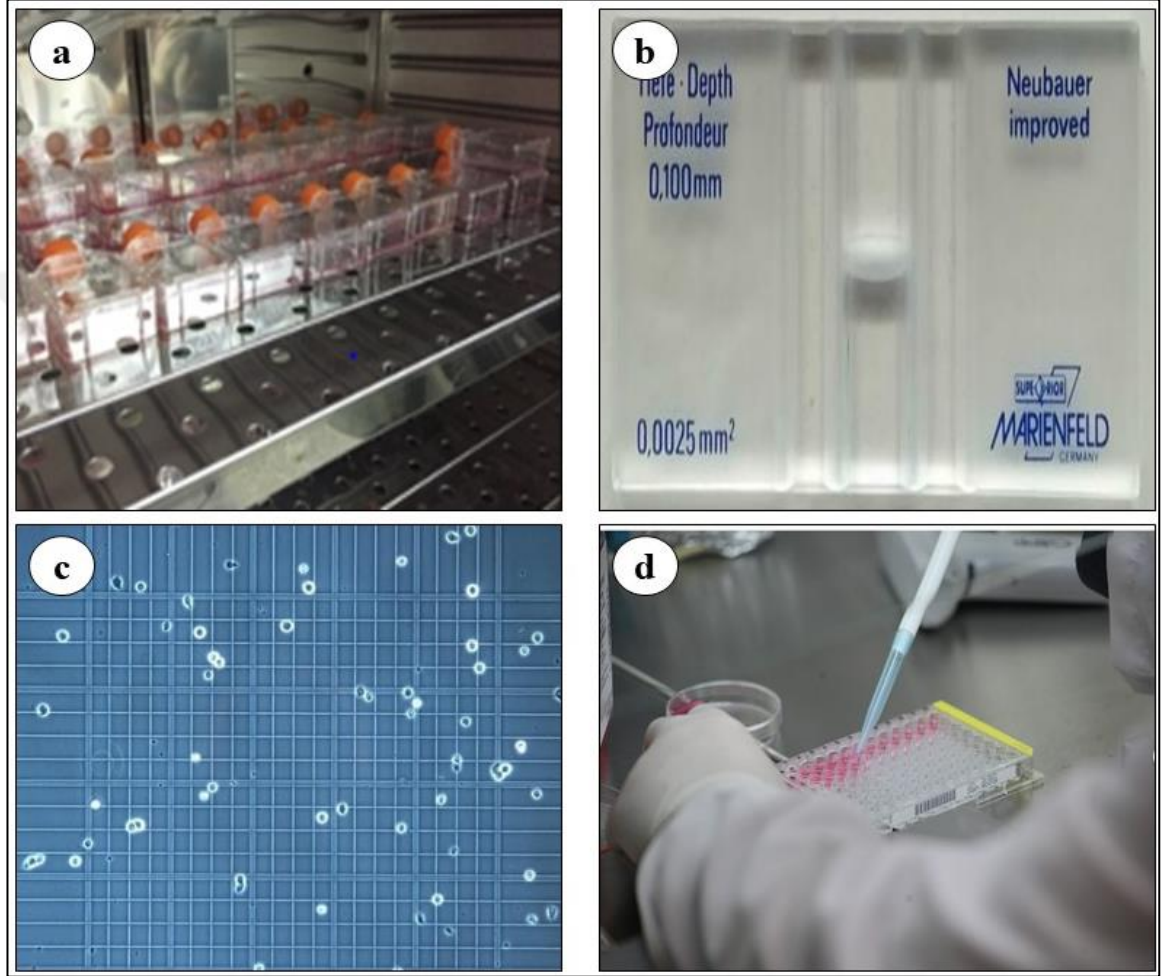
Çizelge 3.2. Hücrelerin sayım işlemi basamakları

1. Hücre sayımında kullanılacak olan Thoma lamı (Hemositometre), etil alkol kullanılarak temizlenip steril edilmiş ve üzeri lamel ile kapatılmıştır.
2. Tripsinizasyon işlemi sonrası homojen hale getirilmiş hücre solüsyonu ve Tripan Mavisi (Sigma)1/1 oranında karıştırılmış ve pipetasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.2'nin devamı

3. Hazırlanan karışım, karelerin bulunduğu bölgeyi kaplayacak miktarda alınmış ve lamelin altından lam üzerine bırakılmıştır.

4. Hücreler ışık mikroskobu (Olympus) altında 40x'lik büyütmede sayılmıştır.



Şekil 3.1. Hücre sayımı ve ekimi **a)** Hücre çoğaltımı, flasklar; **b)** Thoma lamı; **c)** Hücrelerin thoma lamı görüntüsü; **d)** Hücrelerin ekimi, kuyucuklu plaklar

Thoma lamı üzerinde iki alan yer almaktadır. Bu alanlar içerisinde 16 küçük kareden oluşan 4 büyük kare bulunmaktadır. 4 adet 4 küçük kareden oluşan bir büyük karenin bir kenarı 1 mm, yüksekliği 0.1 mm'dir. Bir büyük karenin hacmi $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3$ 'tür. Buradan yola çıkarak 1 mL içerisinde bulunan canlı veya ölü hücre sayısı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

1 mL'de bulunan canlı veya ölü hücre sayısı = 1 adet büyük karede yer alan ortalama hücre sayısı x seyreltme oranı x 10^4

Seyreltme oranı=örnek miktarı/toplam çözelti miktarı

Hücrelerin dondurulması ve saklanması (karyopreservasyon)

Flasklarda üretilmiş olan hücrelerin dondurulup saklanması gerekmektedir. Aksi taktirde bu hücreler aşırı bir şekilde çoğaldıkları için “kontak inhibisyon” sebebiyle bir süre sonra canlılıklarını kaybederler. Hücrelerin dondurularak saklanmasıdaki asıl amaç ihtiyaç duyulduğu taktirde çözündürülüp kullanılabilmesidir. Dondurma işlemi Çizelge 3.3’te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Hücre dondurma işlemi basamakları

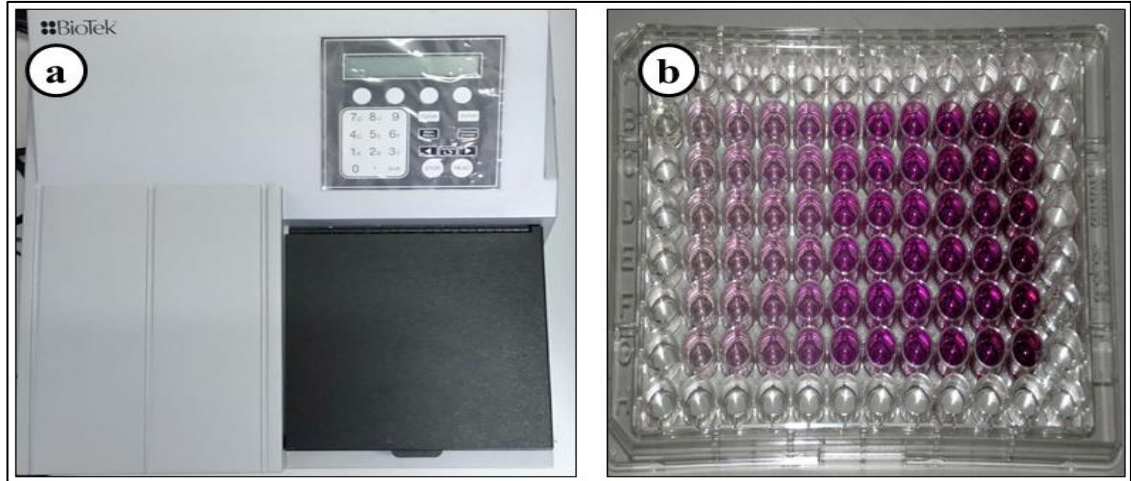
1. “Saklama çözeltisi” olarak adlandırılan ve FBS (%20) ile gliserol (%10) içeren solüsyon hazırlanmıştır.
2. Flasklardan toplanan hücre pelletleri, çoğaltıldığı besiyerinde süspansiyon haline getirilmiştir.
3. Besiyeri-hücre karışımı 1 mL saklama çözeltisinde süspanse edilmiş ve karyotüplere aktarılmıştır.
4. Karyotüpler ilk olarak +4°C’de 30 dk, ardından -30°C’de 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda karyotüpler -80°C derin dondurucuya konmuş ve kullanılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Sitotoksite ölçümleri

Fungus ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu test, canlı hücrelerde bulunan ve mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz’ın MTT ile oluşturduğu formazan derişiminin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Castell vd. 1997).

0.5 g MTT, 100 mL PBS çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiş ve stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 9:1 oranında (besiyeri:MTT) MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Ekstraktlar ile muamele edilmiş ve edilmemiş (kontrol grubu) hücreleri barındıran kuyucuklu plaklar üzerine 100 µL MTT solüsyonu eklenmiştir. Bu plaklar 2 saat etüvde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklar içerisinde bulunan çözelti uzaklaştırılmış ve DMSO (Dimetil sülfoksit) ilave edilmiştir. DMSO ilavesi ile renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.2b). Hücre canlılığı UV-visible spektrometrede 490 nm dalga boyunda (BioTek ELx808) belirlenmiştir (Şekil 3.2a). Değerlendirme aşamasında kontrol grubu absorbans değerleri %100 olarak alınmıştır.



Şekil 3.2. Sitotoksite ölçümü sırasında kullanılan **a)** UV-visible spektrometre ve **b)** kuyucuklu plakalar

***Phellinus igniarius* ve *Phellinus torulosus* ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi**

Flasklarda inkübe edilen hücreler Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de belirtildiği gibi tripsinizyon ve sayım işlemine tâbi tutulmuştur. Sonrasında hücreler 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Bir gece ön inkübasyon ile hücrelerin plak tabanına yapışması sağlanmıştır. Hücreler (kontrol grubu hücreler hariç) artan konsantrasyon değerlerinde DMSO’da çözülmüş *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarına (metanol ve su ekstraktları) 37°C ’de %5 CO_2 ’li etüvde 24 saat maruz bırakılmıştır. Sonrasında 100 μL MTT solüsyonu eklenmiştir ve 2 saat inkübe edilmiştir. Plaklarda bulunan çözelti uzaklaştırıldıktan sonra DMSO eklenmiştir. Hücre canlılığının ölçümü UV-visible spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Hücre dizileri için kullanılan *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarının (metanol ve su ekstraktları) konsantrasyonları Çizelge 3.4’te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. A431 ve Bj hücre dizileri için kullanılan *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarının konsantrasyonları

<i>P. igniarius</i> ve <i>P. torulosus</i> ekstraktlarının (metanol ve su ekstraktları) konsantrasyon değerleri ($\mu\text{g/mL}$)	
25	400
50	600
100	800
200	1000
300	

A431 ve Bj hücre dizileri üzerine güçlü bir oksitleyici ajan olan H_2O_2 'in 24 saatlik sitotoksik etkisi de aynı basamaklar uygulanarak MTT testi ile UV-visible spektrometrede (490 nm) belirlenmiştir.

Hücre dizileri için kullanılan H_2O_2 konsantrasyonları Çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. A431 ve Bj hücre dizileri için kullanılan H_2O_2 konsantrasyonları

H_2O_2 konsantrasyon değerleri (μM)	
25	400
50	600
100	800
200	1000
300	

P. igniarius ve *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarının hücre dizileri üzerindeki antioksidan etkisini belirlemek amacıyla hücreler (kontrol grubu hücreler hariç), farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile ($<IC_{50}$) bir saat ön inkübe edilmiştir ve ardından IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılmıştır. Bu şekilde antioksidan etki ortaya koyulmuştur.

3.2.2. Ekstraktların hücre membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi

Malondealdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü

Hücre dizilerinin membranı üzerine fungus ekstraktlarının etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz MDA düzey ölçümü, Wasowicz yöntemine göre yapılmıştır (Wasowics vd. 1993). Bu yöntemin temeli, hücre membranının hasar görmesi neticesinde meydana gelen ve LPO ürünü olan MDA'nın Tiyoobarbütirik Asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan bileşiğin bütanol fazında floresan spektrofotometrede (PerkinElmer LS 55) okunmasına dayanır (eksitasyon: 525 nm ve emisyon 547 nm).

MDA düzey ölçümü Çizelge 3.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. A431 ve Bj hücre dizilerinin MDA düzeylerinin ölçüm basamakları

1. Hücreler, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de belirtilen işlemlerden geçirilmiştir.
2. Birinci basamakta gerçekleştirilen işlemlerden sonra hücreler, her bir flaskta 15×10^4 olacak şekilde dağıtılmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. Bu süre sonunda hücreler IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyon değerlerinde fungus ekstraktları ve H_2O_2 'e karşı en yüksek antioksidan etki gösteren fungus ekstraktlarının konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir (kontrol grubu hücrelerine herhangi bir uygulama yapılmamıştır).

Çizelge 3.6'nın devamı

4. Ekstrakt (fungusların metanol ve su ekstraktları) uygulaması yapılan ve kontrol grubu olarak ayrılmış olan flasklarda bulunan hücreler, 24 saatin sonunda Çizelge 3.1'de belirtilen işlemlere tâbi tutulmuştur.
5. Toplanan hücreler 600xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant atılmış, pellet 1 mL PBS çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.
6. Santrifüj sonrasında oluşan pellet 500 µL proteaz inhibitör karışımı içerisinde çözülmüştür (1.5 mL proteaz inhibitör karışımı, 1180 µL steril distile su, 300 µL PBS çözeltisi ve 20 µL proteaz (Sigma) ile hazırlanmaktadır).
7. Çözülmüş bu hücreler ependorfa alınıp ultrasonik parçalayıcıda (Branson Sonifier) buz içerisinde homojenize edilmiştir (3x15 saniye tekrar).
8. Homojenizasyon sonrası hücreler, 32000xg'de 45 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir.
9. Elde edilen hücre süpernatantından 10 µL alınmıştır, 200 µL distile su ve 200 µL TBA (29 mM; 8,75 M Asetik asit) içerisinde karıştırılmıştır. Bu karışım, sıcak su banyosunda 100 °C'de 1 saat kaynatılmıştır.
10. Bu süre sonunda karışımı içeren tüpler soğutulmuş, 5M 5 µL hidroklorik asit (HCl, Merck) ve 600 µL n-butanol (Sigma) ilavesi yapılmıştır.
11. Tüpler 10 dk 3000xg'de santifüj edildikten sonra üst faz ayrılmıştır ve belirtilen dalga boylarında floresan spektrofotometrede ölçülmüştür.
12. Örneklerin MDA içerikleri ise MDA standart grafiğinden belirlenmiştir (MDA standart grafiği 1,1,3,3-tetrametoksipropan (Merck) standart solüsyonu kullanılarak hazırlanmıştır).

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmesi

GPx, H₂O₂'nin ayrışmasını katalize eden önemli bir enzimdir. GSH, kararlı, sarı bir renk gösteren 5-tio dinitrobenzoik asit anyonu üretmek için dinitrobenzoik asit ile reaksiyona girebilmektedir. GPx ölçüm prensibi, oluşan bileşiğin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. GPx aktivitesi ölçümü Elabscience GSH-Px Activity kit (E-BC-K096-S) yöntemine göre yapılmıştır (Anonymous 2).

Çizelge 3.7. A431 ve Bj hücre dizilerinin GPx aktivitesinin ölçüm basamakları

1. Hücreler, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de belirtilen işlemlerden geçirilmiştir.
2. Birinci basamakta gerçekleştirilen işlemlerden sonra hücreler, her bir flaskta 1×10^6 olacak şekilde dağıtılmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. 1×10^6 kadar hücre toplanmış ve 10 dk boyunca 1000~1500xg’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pellet ile devam edilmiştir. Hücre süspansiyonunu hazırlamak için 300~500 µL PBS (0.01 M, pH 7.4) eklenmiştir. Buzlu su banyosunda sonikasyon yapılmıştır (güç: 300 W, 3~5 saniye / zaman, 30 saniye aralık, 3~5 kez tekrarlayın). Bu süspansiyon 10 dk 10000xg’de santrifüj edildikten sonra süpernatant ile bir sonraki aşamaya geçilmiştir.
4. Enzimatik reaksiyon için kitle verilen prosedüre uygun olarak karışım tüpleri hazırlanmıştır ve 3100xg’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kromojenik reaksiyon için kullanılmıştır.
5. Kit prosedürüne uygun olarak hazırlanmış karışımlar 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrik olarak 412 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümden önce cihaz su ile sıfırlanmıştır.

Protein Tayini (Bradford Yöntemi)

Örneklerden protein ölçümü yapılarak MDA düzeyleri nM/mg protein olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda kantitatif protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford 1976). Bu yöntemin temeli boya olarak kullanılan ve negatif bir yüke sahip olan Coomassie parlak mavisi (Coomassie brilliant blue) G-250 boyasının, farklı konsantrasyon değerlerindeki protein çözeltilerinde farklı derecelerde mavi renk oluşturmaya dayanmaktadır. İlgili proteinin konsantrasyonları, standart protein/Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) yardımıyla çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden belirlenmiştir.

Protein standart grafiğinin belirlenmesinin ardından örnekler, 1:75 oranında seyreltilmiş ve 20 µL örnek üzerine 200 µL Coomassie parlak mavisi ilave edilmiştir. Bu karışım kuyucuklu plakalara alınmıştır ve 10 dk karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerin protein içeriğinin absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Protein standart grafiğinden yararlanarak örneklerin protein miktarları belirlenmiştir.

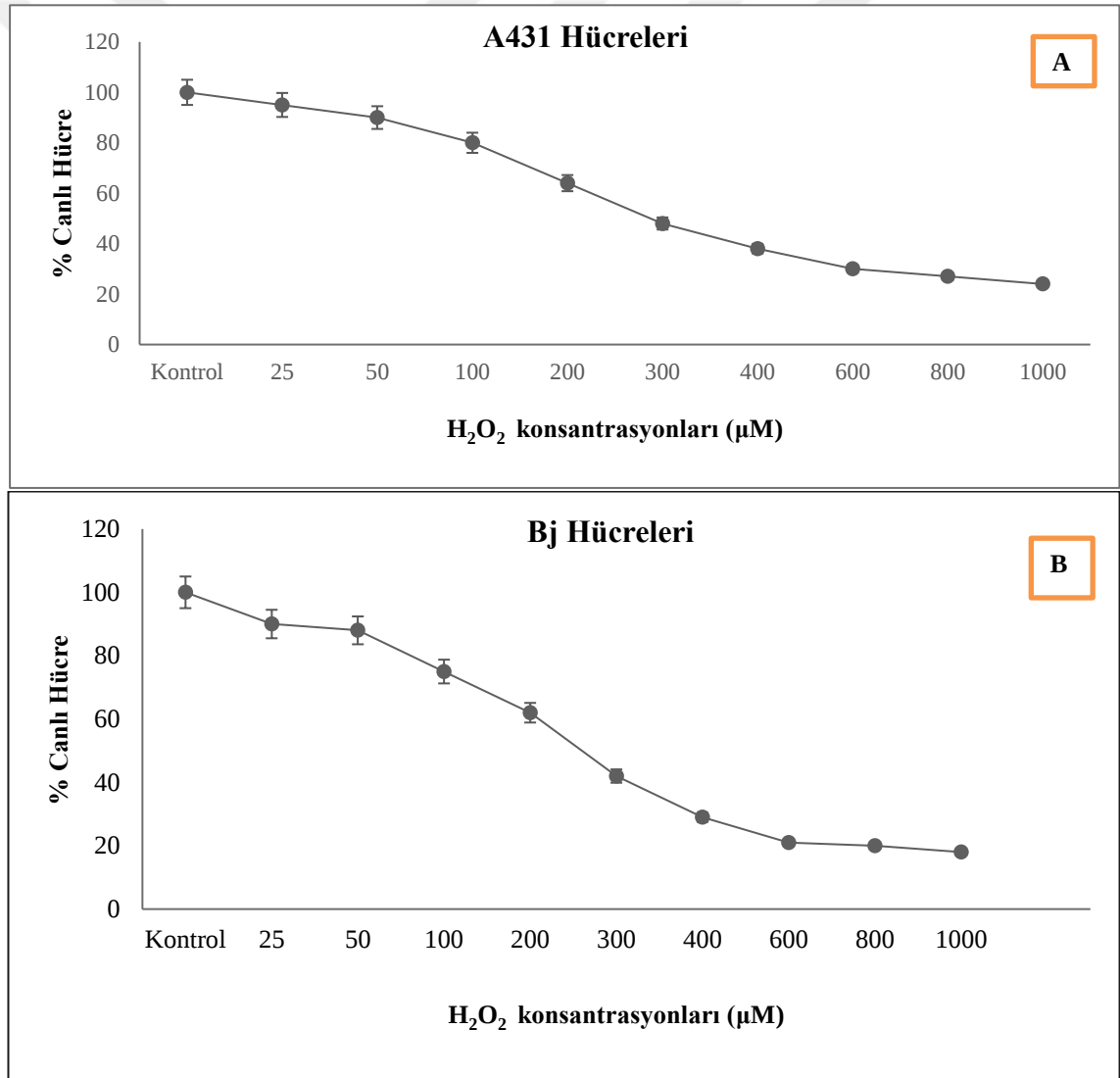
3.2.3. İstatistiksel analizler

Çalışmalar kapsamında elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM Spss Statistics 20 programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların gruplar arası değerlendirilmesi ANOVA-Post-Hoc analizi ile farkların önem seviyesinin belirtilmesi ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile gerçekleştirilmiştir (Anonymous 3).

4. BULGULAR

4.1. H₂O₂'in Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisi, konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.1). Uygulanan H₂O₂ konsantrasyonları Çizelge 3.5'te verilmiştir. A431 hücrelerinin 24 saatlik artan konsantrasyonlarda H₂O₂ ile inkübasyonu sonucunda IC₅₀ değeri 290 µM, IC₇₀ değeri 600 µM olarak belirlenirken, Bj hücrelerinde IC₅₀ değeri 260 µM, IC₇₀ değeri 392 µM olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar (p<0.05) Çizelge 4.1'de verilmiştir. 24 saatlik H₂O₂ uygulaması sonucunda Bj hücrelerinin H₂O₂'e karşı daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. A431 hücre dizisinin sağlıklı Bj hücre dizisine göre H₂O₂ uygulaması sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda 1.12 kat, IC₇₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda ise 1.53 kat daha dayanıklı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. H₂O₂ konsantrasyonlarının **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi

Çizelge 4.1. H₂O₂ konsantrasyonlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

H ₂ O ₂ konsantrasyonları (μ M)	Ortalama (X) $\pm$ S.H. % Sitotoksik etki (24 saat)	
	A431 Hücre Dizisi	Bj Hücre Dizisi
Kontrol	100 $\pm$ 1.21aA	100 $\pm$ 1.34aA
25	95 $\pm$ 1.73abA	90 $\pm$ 4.11bB
50	90 $\pm$ 1.63bA	88 $\pm$ 1.67bA
100	80 $\pm$ 4.10cA	75 $\pm$ 4.08cB
200	64 $\pm$ 2.16dA	62 $\pm$ 2.94dA
300	48 $\pm$ 2.82eA	42 $\pm$ 1.81eB
400	38 $\pm$ 2.08fA	29 $\pm$ 2.62fB
600	30 $\pm$ 1.64gA	21 $\pm$ 1.70gB
800	27 $\pm$ 1.60gA	20 $\pm$ 1.13gB
1000	24 $\pm$ 3.31gA	18 $\pm$ 1.28gB

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

S.H.: Standart Hata

4.2. *P. igniarius* ve *P. torulosus* Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.2.1. *P. igniarius* ekstraktlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

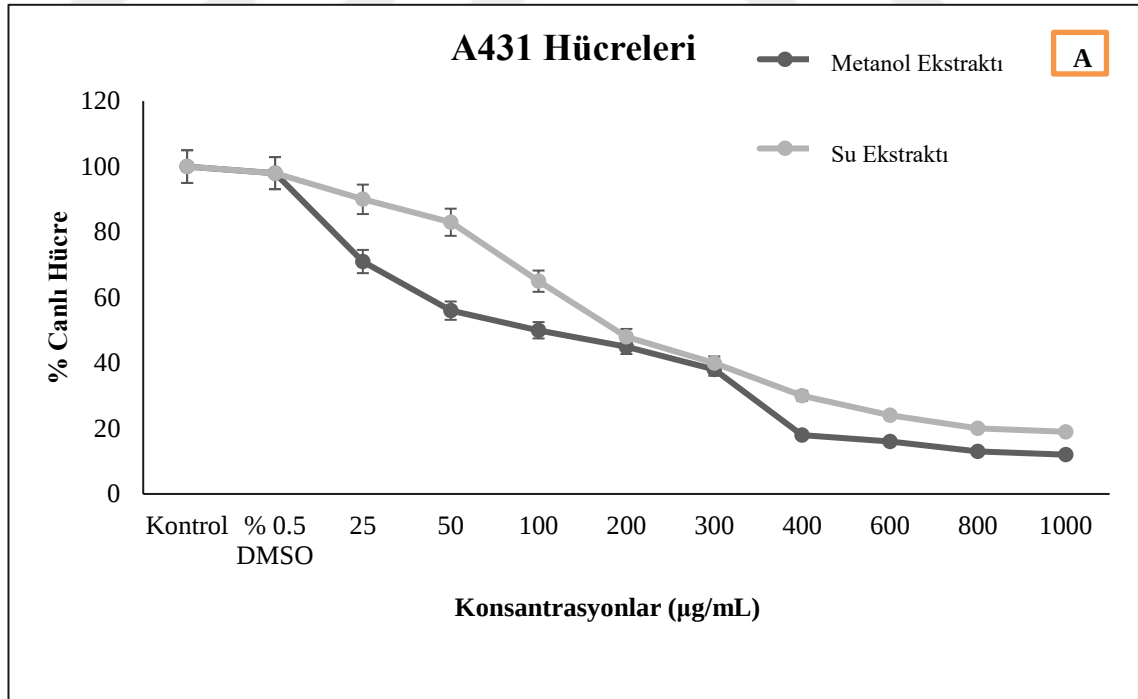
P. igniarius metanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının A431 hücre dizileri üzerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda sitotoksik etkisi araştırılmıştır ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). A431 hücre dizileri 24 saat süre ile artan konsantrasyonlarda *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılmıştır, IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin ekstraktlar ile 24 saat inkübasyonu sonucu IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ değerleri de hesaplanmıştır. A431 hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. igniarius* metanol ekstraktının IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ değerleri sırasıyla 8.6 μ g/mL, 17.2 μ g/mL ve 26.7 μ g/mL, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonları 100 μ g/mL ve 340 μ g/mL olarak bulunmuştur. *P. igniarius* su ekstraktının IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ değerleri sırasıyla 25 μ g/mL, 58.3 μ g/mL ve 86.11 μ g/mL, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonları 188.2

$\mu\text{g/mL}$ ve $400 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. İnkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p<0.05$) Çizelge 4.2’de verilmiştir.

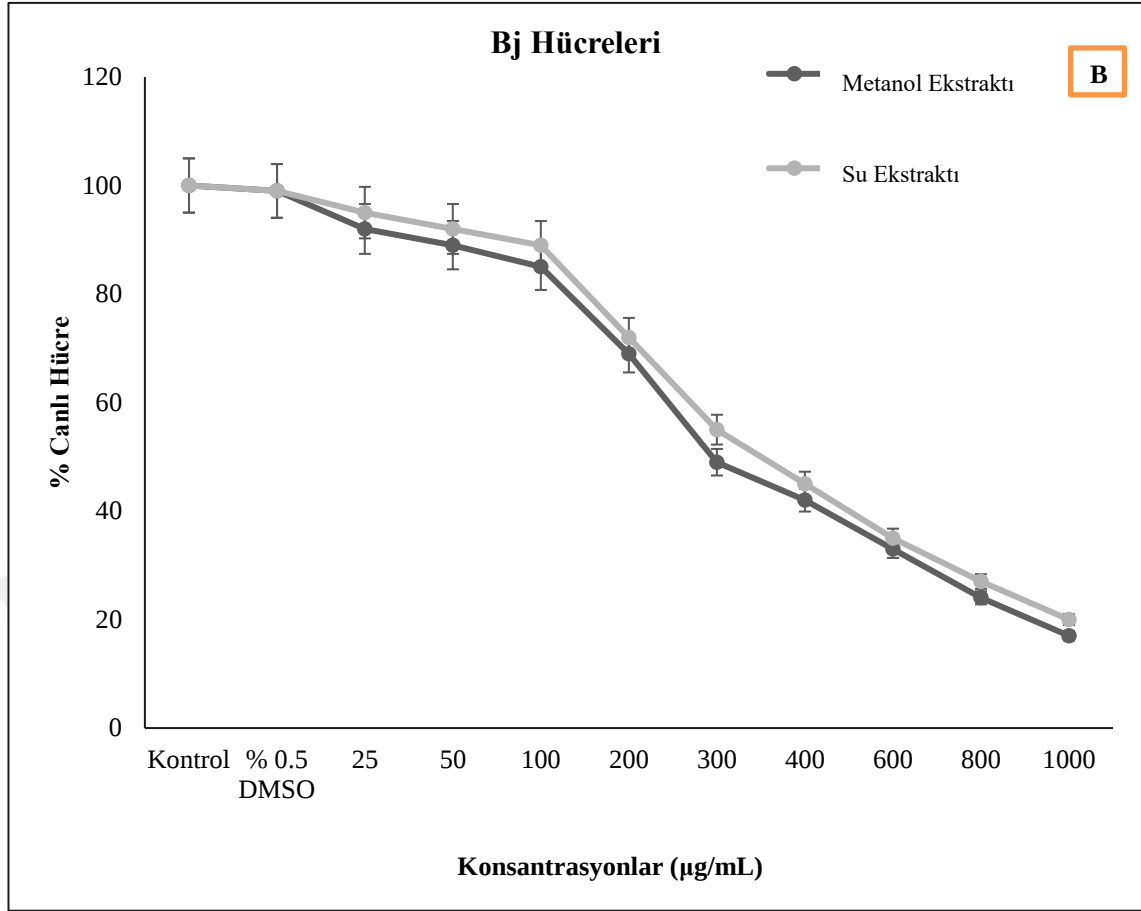
A431 hücre dizisi üzerine *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, metanol ekstraktının su ekstraktına kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı ve daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. A431 hücreleri *P. igniarius*’un su ekstraktına karşı direnç gösterirken, metanol ekstraktına karşı daha hassas bulunmuştur. Sitotoksik çalışmalarının sonucunda IC_{50} değerleri göz önünde bulundurulduğunda A431 hücrelerinin su ekstraktına karşı 1.88 kat daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

P. igniarius metanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının sağlıklı hücre olan Bj hücre dizileri üzerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda sitotoksik etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.2). Bj hücre dizileri 24 saat süre ile artan konsantrasyonlarda metanol, su ekstraktlarına maruz bırakılmıştır. IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} , IC_{50} ve IC_{70} değerleri hesaplanmıştır.

Bj hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. igniarius* metanol ekstraktının IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} , IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları $41.7 \mu\text{g/mL}$, $131.2 \mu\text{g/mL}$ ve $193.7 \mu\text{g/mL}$, $295 \mu\text{g/mL}$ ve $667 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. *P. igniarius* su ekstraktının IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri sırasıyla $83.3 \mu\text{g/mL}$, $147.4 \mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları ise $350 \mu\text{g/mL}$ ve $725 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Sitotoksik etkinin konsantrasyonlara paralel olarak arttığı belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p<0.05$) Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi



Şekil 4.2'nin devamı. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının A) A431 ve B) Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi

Bj hücre dizisi üzerine *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, su ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı ve daha düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bj hücreleri *P. igniarius* metanol ekstraktına karşı duyarlılık gösterdiği halde *P. igniarius* su ekstraktına karşı dayanıklı bulunmuştur. Sitotoksik çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz IC_{50} değerlerine göre Bj hücrelerinin *P. igniarius* su ekstraktına karşı 1.19 kat daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

Genel olarak *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, metanol ve su ekstraktlarının A431 hücre dizisi üzerine seçici bir toksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. A431 hücrelerinde Bj hücrelerine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bj hücre dizisinin A431 hücre dizisine göre *P. igniarius* metanol ekstraktına IC_{50} değerleri göz önünde bulundurulduğunda 2.95 kat, *P. igniarius* su ekstraktına ise 1.86 kat daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

<i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarının konsantrasyonları (µg/mL)	Ortalama (X) ± S.H. % Sitotoksik etki (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
Kontrol	100±0.83aA	100±0.83aA	100±0.83aA	100±0.83aA
%0.5 DMSO	99±1.07aA	99±1.07aA	99±0.99aA	99±0.99aA
25	71±2.94bB	90±1.51bB	92±1.75bA	95±1.44aA
	*			
50	56±2.16cB	83±2.08cB	89±1.12bA	92±1.52abA
	*			
100	50±1.12dB	65±0.50dB	85±0.67bA	89±0.65bA
	*			
200	45±2.98deB	48±0.95eB	69±1.37cA	70±1.34cA
300	38±2.06eB	40±2.64fB	49±0.75dA	55±1.50cdA
			*	
400	18±2.50fB	30±1.71gB	42±0.57eA	45±1.68dA
	*			
600	16±0.58fB	24±0.95ghB	33±1.27fA	35±0.98eA
	*			
800	13±2.12fB	20±2.22ghB	24±1.71gA	27±0.87fA
	*			
1000	12±2.2fA	19± 0.82hA	17±1.83hA	20±0.94gA

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler aynı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

*Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

S.H.: Standart Hata

4.2.2. *P. torulosus* ekstraktlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

A431 hücre dizisi 24 saat süre ile artan konsantrasyonlarda *P. torulosus* ekstraktlarına maruz bırakılmış ve sitotoksik etki belirlenmiştir (Şekil 4.3).

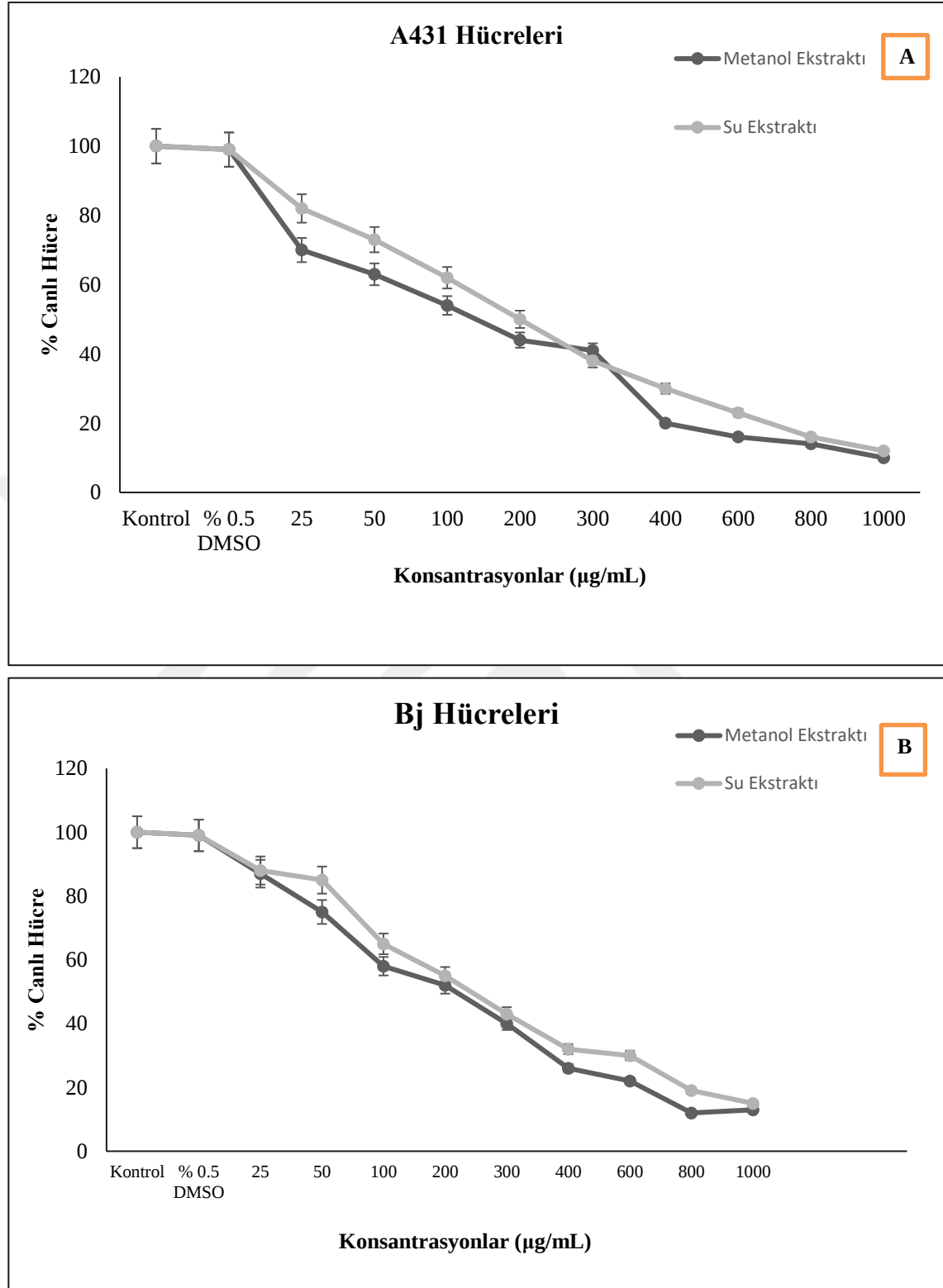
A431 hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. torulosus* metanol ekstraktının IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri sırasıyla 8.3 µg/mL, 16.7 µg/mL ve 25 µg/mL, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları 140 µg/mL ve 352.4 µg/mL olarak bulunmuştur. *P. torulosus* su ekstraktının ise IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri sırasıyla 13.9 µg/mL, 30.5 µg/mL ve 63.6 µg/mL, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları 200 µg/mL ve 445 µg/mL olarak bulunmuştur. İnkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p<0.05$) Çizelge 4.3'te verilmiştir.

A431 hücre dizisi üzerine *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, su ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı ve daha düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre A431 hücre dizisi *P. torulosus* su ekstraktının *P. torulosus* metanol ekstraktına oranla 1.43 kat daha dayanıklı olduğu bulunmuştur.

P. torulosus metanol ve su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının Bj hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.3). Bj hücre dizileri 24 saat süre ile artan konsantrasyonlarda metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılmıştır. IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} , IC_{50} ve IC_{70} değerleri hesaplanmıştır.

Bj hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. torulosus* metanol ekstraktının IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri sırasıyla 19.2 µg/mL, 39.6 µg/mL ve 64.7 µg/mL, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları 216.6 µg/mL ve 371.4 µg/mL olarak bulunmuştur. *P. torulosus* su ekstraktının IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri sırasıyla 20.8 µg/mL, 62.5 µg/mL ve 87.5 µg/mL, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonları 241.7 µg/mL ve 600 µg/mL olarak bulunmuştur.

Sitotoksik etki konsantrasyonlara paralel olarak artmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p<0.05$) Çizelge 4.3'te verilmiştir. Bj hücre dizisi üzerine *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri karşılaştırıldığında, metanol ekstraktının su ekstraktına kıyasla daha düşük konsantrasyon değerlerinde hücre canlılığını azalttığı ve daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bj hücreleri *P. torulosus* su ekstraktına *P. torulosus* metanol ekstraktına oranla IC_{50} değerleri göz önünde bulundurulduğunda 1.12 kat daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine doza bağlı sitotoksik etkisi

Çizelge 4.3. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktları konsantrasyonlarının hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

<i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının konsantrasyonları (µg/mL)	Ortalama (X) ± S.H. % Sitotoksik etki (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
Kontrol	100±0.83aA	100±0.83aA	100±0.91aA	100±0.98aA
%0.5 DMSO	99±1.07aA	99±0.99aA	99±1.14aA	99±1.20aA
25	70±1.63bA	82±1.82bB		
	*		87±0.52bA	88±0.67bA
50	63±0.87cB	73±2.45cB	75±1.07bA	85±0.85bA
	*		*	
100	54±3.69dB	62±1.64dB	58±1.67cA	65±1.32cA
	*		*	
200	44±1.39eB	50±2.06eB		
	*		52±0.41cA	55±0.52dA
300	41±2.16eA	38±2.04fB	40±0.57dA	43±0.62eA
400	20±2.58gB	32±2.65fA	26±1.08eA	32±1.14fA
	*		*	
600	16±1.73ghB	23±2.14gB	22±1.25eA	30±1.04fA
	*		*	
800	14±0.96ghA	16±1.56hA	12±0.96fA	19±0.80gA
1000	10±1.00hA	12±1.23hA	13±0.82fA	15±0.51gA

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler aynı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

*Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

S.H.: Standart Hata

Çizelge 4.4. Fungus ekstraktlarının IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonları

IC Değerleri (µg/mL)	A431 Hücre Dizisi				Bj Hücre Dizisi			
	Pİ		PT		Pİ		PT	
	ME	SE	ME	SE	ME	SE	ME	SE
IC ₁₀	8.6 µg/mL	25 µg/mL	8.3 µg/mL	13.9 µg/mL	41.7 µg/mL	83.3 µg/mL	19.2 µg/mL	20.8 µg/mL
IC ₂₀	17.2 µg/mL	58.3 µg/mL	16.7 µg/mL	30.5 µg/mL	131.2 µg/mL	147.4 µg/mL	39.6 µg/mL	62.5 µg/mL
IC ₃₀	26.7 µg/mL	86.11 µg/mL	25 µg/mL	63.6 µg/mL	193.7 µg/mL	200 µg/mL	64.7 µg/mL	87.5 µg/mL
IC ₅₀	100 µg/mL	188.2 µg/mL	140 µg/mL	200 µg/mL	295 µg/mL	350 µg/mL	216.6 µg/mL	241.7 µg/mL
IC ₇₀	340 µg/mL	400 µg/mL	352.4 µg/mL	445 µg/mL	667 µg/mL	725 µg/mL	371.4 µg/mL	600 µg/mL

ME: Metanol Ekstraktı; SE: Su Ekstraktı; Pİ: *P. igniarius*; PT: *P. torulosus*

Genel olarak *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerine sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, metanol ve su ekstraktlarının A431 hücre dizisi üzerine seçici bir toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. A431 hücrelerinde Bj hücrelerine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Sitotoksite ölçümleri sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda Bj hücre dizisi A431 hücre dizisi ile karşılaştırıldığında *P. torulosus* metanol ekstraktına karşı 1.56 kat, *P. torulosus* su ekstraktına karşı 1.21 kat daha dayanıklı bulunmuştur.

Sitotoksite hesaplamaları sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda A431 hücrelerinin *P. torulosus* su ekstraktına karşı, *P. igniarius* su ekstraktına kıyasla 1.1 kat, *P. torulosus* metanol ekstraktına karşı *P. igniarius* metanol

ekstraktına kıyasla 1.4 kat; Bj hücrelerinin *P. igniarius* su ekstraktına karşı *P. torulosus* su ekstraktına kıyasla 1.45 kat, *P. igniarius* su ekstraktına karşı *P. torulosus* su ekstraktına kıyasla 1.36 kat daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

A431 hücre dizisi Bj hücre dizisine göre *P. torulosus* su ekstraktına oranla *P. igniarius* su ekstraktına 1.28 kat, *P. torulosus* metanol ekstraktına oranla *P. igniarius* su ekstraktına göre 2.17 kat daha hassas olduğu ortaya koyulmuştur.

Sonuç olarak her iki ekstrakta karşı A431 hücrelerinin sağlıklı Bj hücrelerine kıyasla daha hassas olduğu görülmüştür.

4.3. *P. igniarius* ve *P. torulosus* Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerine Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi

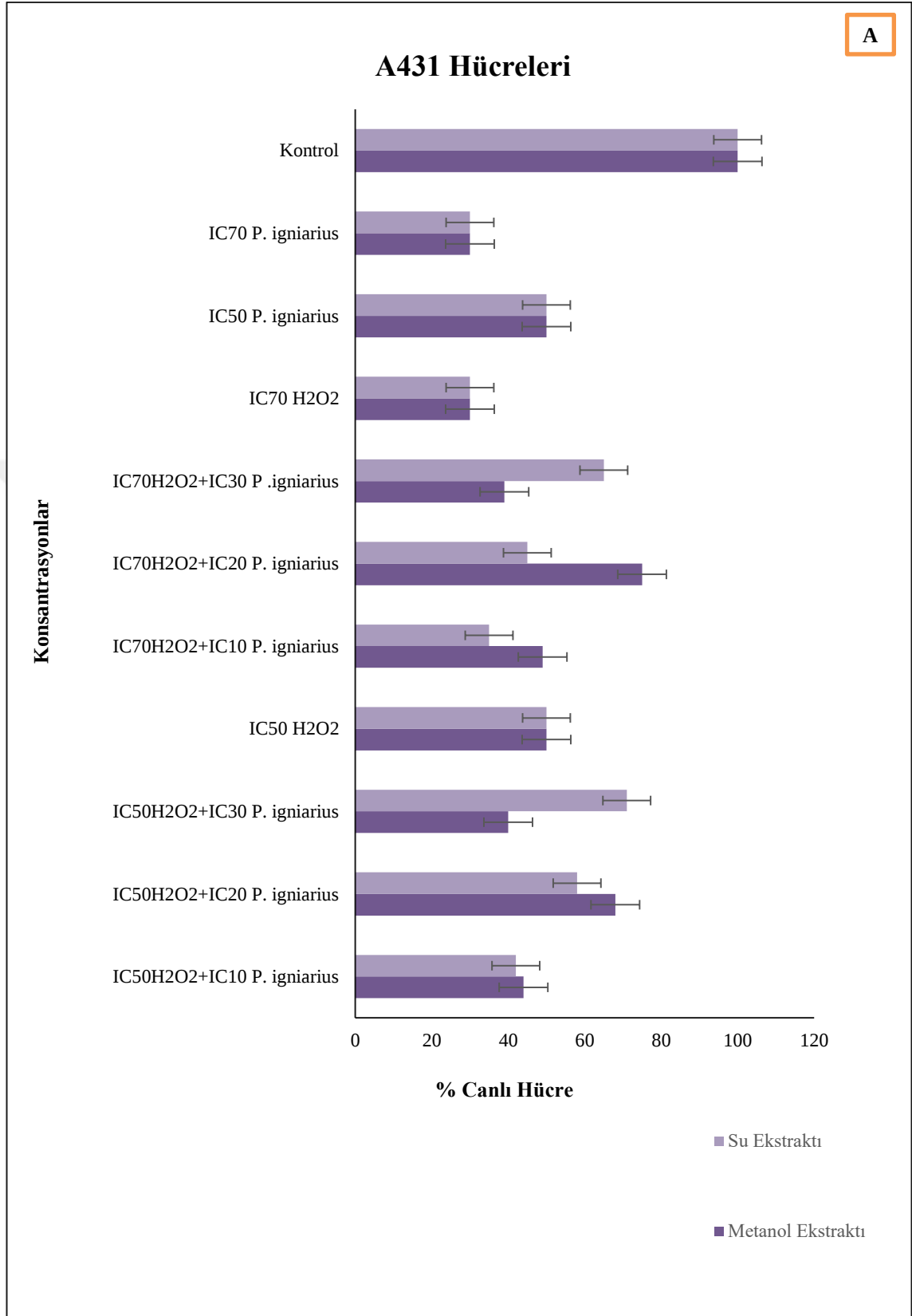
4.3.1. *P. igniarius* ekstraktlarının hücre dizileri üzerine antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Ekstraktların antioksidan etkilerini ortaya koymak için, A431 hücreleri düşük konsantrasyonlarda ($<IC_{50}$) *P. igniarius* metanol ve su ekstraktları ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra devamında 24 saat IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e maruz bırakılmıştır. A431 hücre dizisinde ekstraksiyon konsantrasyonlarından hangisinin H_2O_2 'e karşı en güçlü antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4).

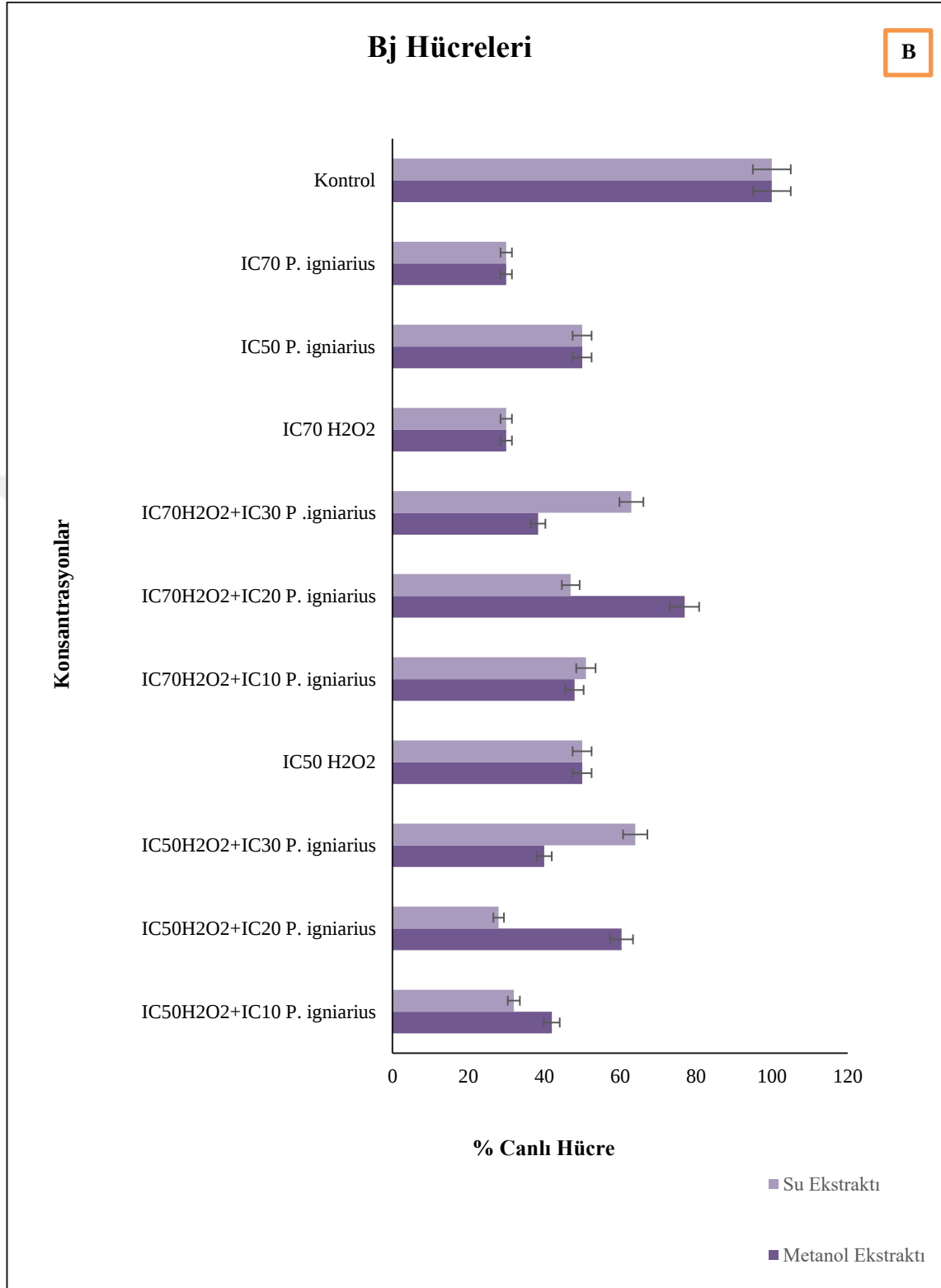
Ekstraktlar ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra 24 saat H_2O_2 'e maruz bırakılarak bulunan sitotoksite sonuçları ve istatistiksel farklılıklar ($p<0.05$) Çizelge 4.5'te verilmiştir.

A431 hücre dizisinde *P. igniarius* metanol ekstraktı için hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{20} kombinasyonunda görülmüştür. *P. igniarius* su ekstraktı için ise hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki ise IC_{30} kombinasyonunda görülmüştür.

Bj hücrelerini aynı uygulamaya maruz bırakıldığında *P. igniarius* metanol ekstraktı için hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{20} kombinasyonunda görülmüştür. *P. igniarius* su ekstraktı için ise hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki ise IC_{30} kombinasyonunda görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. H₂O₂'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyonlarda *P. igniarius* metanol ve su ekstraktların (<IC₅₀) **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi



Şekil 4.4'ün devamı. H₂O₂'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyonlarda *P. igniarius* metanol ve su ekstraktların (<IC₅₀) **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi

Çizelge 4.5. H₂O₂ sitotoksitesine karşı *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının (<IC₅₀) hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi

<i>P. igniarius</i> metanol ve su ekstraktlarının konsantrasyonları (µg/mL)+ H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. % Antioksidan etkisi (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₁₀ <i>P. igniarius</i>	44±0.52dA	42±0.74dA	42±0.35dA	32±1.27dB
			*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₂₀ <i>P. igniarius</i>	68±0.43bA	58±0.51bA	60.4±0.13bB	28±1.30eB
	*		*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₃₀ <i>P. igniarius</i>	40±0.66eA	71±0.59aA	40±0.88eA	64±0.94aB
	*		*	
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₁₀ <i>P. igniarius</i>	49±0.59cA	35±1.14deB	48±0.71cA	51±0.74bA
	*			
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₂₀ <i>P. igniarius</i>	75±1.23aA	45±0.70cA	77±1.73aA	47±0.25cA
	*		*	
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₃₀ <i>P. igniarius</i>	39±0.75eA	65±0.52bcA	38.4±1.62eA	63±0.19aA
	*		*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂	50±0.75cA	50±0.75cA	50±0.40cA	50±0.40bA
IC ₇₀ H ₂ O ₂	30±0.45fA	30±0.45eA	30±0.30fA	30±0.30deA

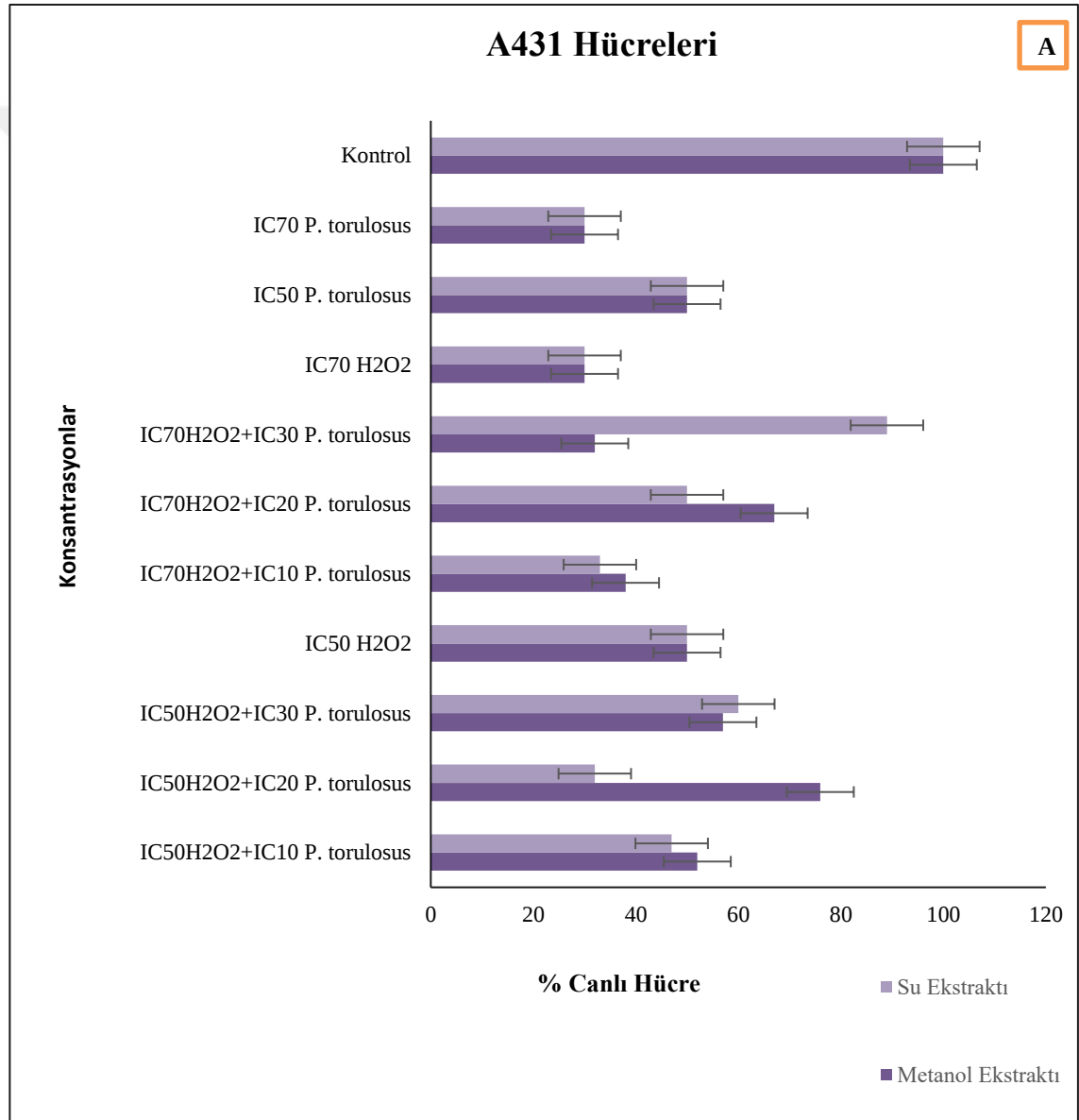
X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler aynı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir (p<0.05).

* Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

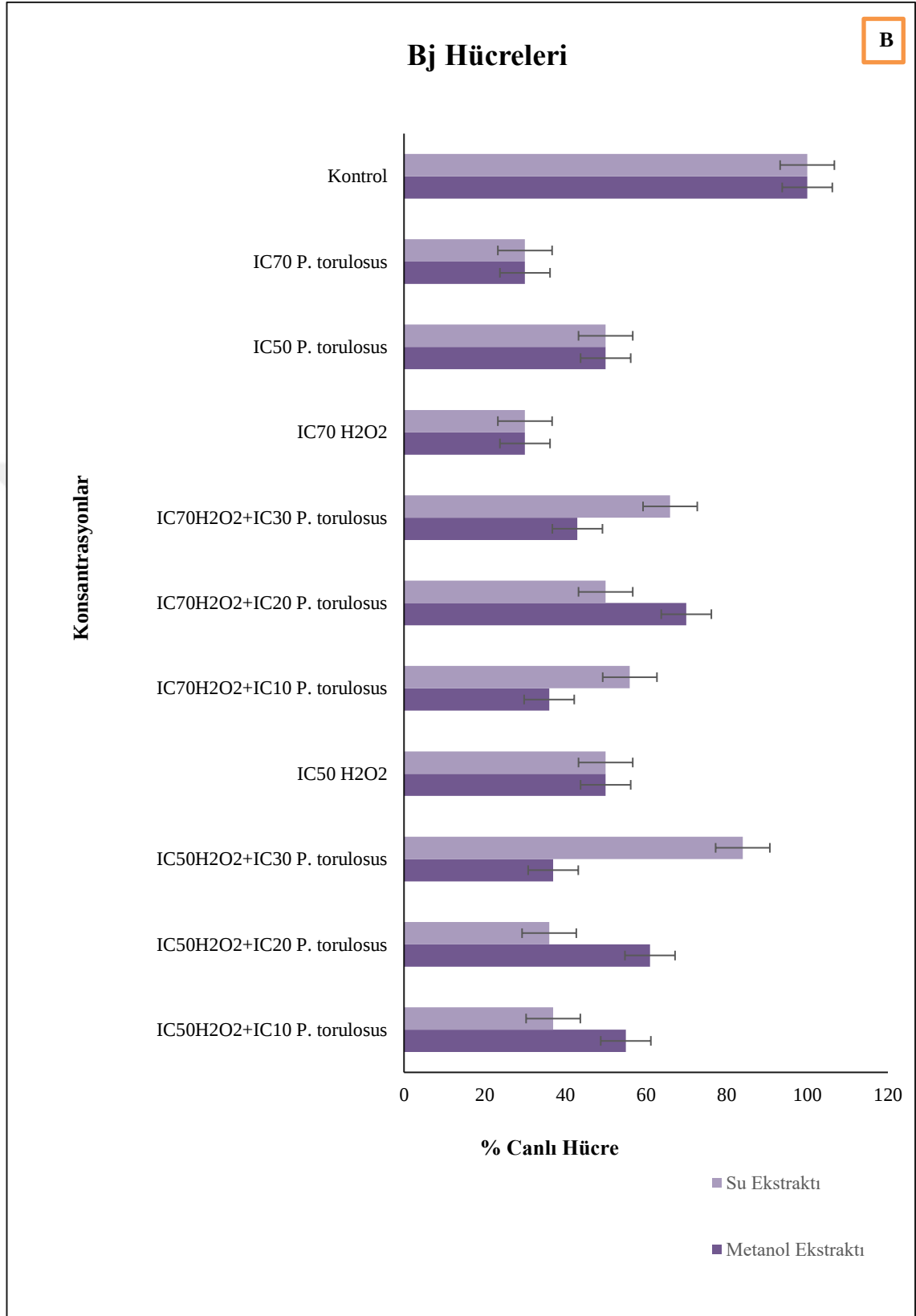
S.H.: Standart Hata

4.3.2. *P. torulosus* ekstraktlarının hücre dizileri üzerine antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Ekstraktların antioksidan etkilerini ortaya koymak için, A431 hücreleri düşük konsantrasyonlarda ($<IC_{50}$) *P. torulosus* metanol ve su ekstraktları ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra devamında 24 saat H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılmıştır. Sitotoksik sonuçları ve istatistiksel farklılıklar ($p<0.05$) Çizelge 4.6'da verilmiştir. A431 ve Bj hücre dizilerinde *P. torulosus* metanol ekstraktı için hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{20} kombinasyonunda görülmüştür. *P. torulosus* su ekstraktı için ise hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{30} kombinasyonunda görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. H_2O_2 'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyon değerlerinde *P. torulosus* metanol ve su ekstraktların ($<IC_{50}$) **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi



Şekil 4.5'in devamı. H₂O₂'in sitotoksik etkisine karşı farklı konsantrasyon değerlerinde *P. torulosus* metanol ve su ekstraktların (<IC₅₀) **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi

Çizelge 4.6. H₂O₂ sitotoksitesine karşı *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının (<IC₅₀) hücre dizileri üzerine antioksidan etkisi

<i>P. torulosus</i> metanol ve su ekstraktlarının konsantrasyonları (µg/mL)+H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. % Antioksidan etkisi (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₁₀ <i>P. torulosus</i>	52±0.98dA	47±1.34dA	55±0.36cA	37±1.65eB
			*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₂₀ <i>P. torulosus</i>	76±0.64aA	32±0.97efA	61±0.32bB	36±1.74eA
	*		*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂ +IC ₃₀ <i>P. torulosus</i>	57±0.69cA	60±0.73bA	37±0.41fB	84±1.90aA
			*	
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₁₀ <i>P. torulosus</i>	38±0.22eA	33±1.24eB	36±0.12fA	56±0.67cA
			*	
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₂₀ <i>P. torulosus</i>	67±0.73bA	50±0.93cA	70±0.24aA	50±0.63dA
	*		*	
IC ₇₀ H ₂ O ₂ +IC ₃₀ <i>P. torulosus</i>	32±0.77fB	89±0.59aA	43±0.45eA	66±0.55bB
	*		*	
IC ₅₀ H ₂ O ₂	50±0.75dA	50±0.75cA	50±0.40dA	50±0.40dA
IC ₇₀ H ₂ O ₂	30±0.45fA	30±0.45fA	30±0.30gA	30±0.30fA

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük aynı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir (p<0.05). *Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

S.H.: Standart Hata

4.4. *P. igniarius* ve *P. torulosus* Ekstraktlarının Hücre Dizilerinin Membranı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Hücreler yüksek dozda oksidanlara maruz kaldıklarında oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres, hücre biyomolekülleri içerisinde en fazla lipitlere zarar vererek bu moleküllerin peroksidasyonuna neden olur. LPO ürünü olan MDA düzeyi, bize ekstraktların hücre membranına verdiği zararı açıklar.

4.4.1. *P. igniarius* ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizilerinde MDA düzeylerinin belirlenmesi

Ekstraktların A431 ve Bj hücreleri üzerindeki prooksidan etkisini ortaya koymak için, hücreler 24 saat boyunca IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında su ve metanol ekstraktlarına maruz bırakılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür.

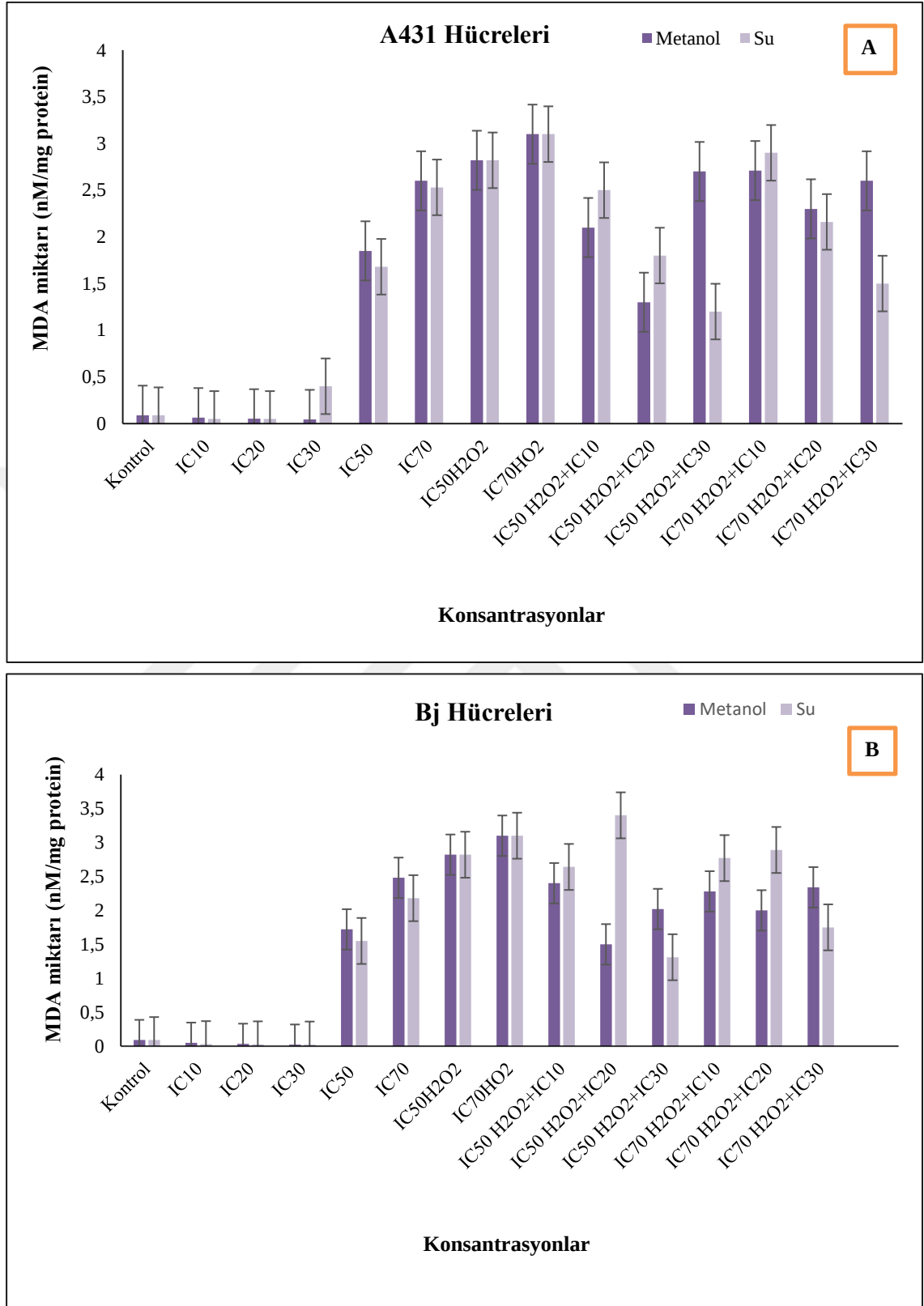
Ekstraktların antioksidan (koruyucu) etkilerini ortaya koymak için, antioksidan testi çalışmalarından elde ettiğimiz düşük konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile hücreler ön inkübasyona bırakılmıştır (1 saat) ve devamında güçlü bir oksidan olan H₂O₂ ile inkübe edilmiştir ve MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bu sonuçlar sadece H₂O₂'e maruz bırakılan deney sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlardaki ekstraktların (<IC₅₀) MDA düzeyleri üzerine etkisi de Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

MDA miktarları MDA ve BSA standart grafiklerinden yararlanılarak nM/mg protein olarak belirlenmiştir. MDA standart grafiği ($y=4.95x + 11.8$) ve BSA standart grafiği ($y=2.5x + 0.3$) ise Şekil 4.8'de verilmiştir.

Tek başına *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan A431 hücrelerinin MDA düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 30.8 ve 43.3 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için ise sırasıyla 28 ve 42.2 kat daha fazla bulunmuştur. Ancak ekstraktlara düşük konsantrasyonlarda (IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀) maruz bırakılan hücrelerde ölçtüğümüz MDA düzeyi kontrol grubundan farklı değildir.

Ayrıca tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinin MDA düzeyleri tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki H₂O₂ uygulanan hücreler ile kıyaslanmıştır.

IC₅₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.52 kat daha az bulunurken, IC₇₀ *P. igniarius* metanol uygulanan hücrelerde IC₇₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.2 kat daha az bulunmuştur. IC₅₀ *P. igniarius* su ekstraktı uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.65 kat daha az bulunurken, IC₇₀ *P. igniarius* su uygulanan hücrelerde IC₇₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.24 kat daha az bulunmuştur.



Şekil 4.6. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizilerinin membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi

Tek başına *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan Bj hücrelerinin MDA düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 19.1 ve 27.5 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 17.2 ve 24.2 kat daha fazla bulunmuştur. Tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan Bj hücrelerinin MDA düzeyleri tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki H₂O₂ uygulanan hücreler ile kıyaslanmıştır. IC₅₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.74 kat daha az bulunurken, IC₇₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerde IC₇₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.4 kat daha az bulunmuştur. IC₅₀ *P. igniarius* su uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.9 kat daha az bulunurken, IC₇₀ *P. igniarius* su uygulanan hücrelerde IC₇₀ değerinde H₂O₂ uygulanan hücrelere oranla MDA düzeyi 1.6 kat daha az bulunmuştur.

Tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 47 ve 51.6 kat MDA artışı gözlenmiştir. Bj hücrelerinde ise bu oranlar (IC₅₀ ve IC₇₀ için) sırasıyla 33 ve 38.9 olarak belirlenmiştir. Sadece IC₅₀ H₂O₂ uygulanan A431 hücrelerindeki MDA düzeyi IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 2.2 kat artarken, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2.35 kat artmıştır. Sadece IC₅₀ H₂O₂ uygulanan Bj hücrelerindeki MDA düzeyi IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 2 kat artarken, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2.3 kat artmıştır. Tek başına IC₇₀ H₂O₂ uygulanan A431 hücrelerindeki MDA düzeyi IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.35 kat artarken, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2.1 kat artmıştır. Sadece IC₇₀ H₂O₂ uygulanan Bj hücrelerindeki MDA düzeyi IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.7 kat artarken, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 2 kat artmıştır.

Düşük konsantrasyonlarda ekstraktlar ile ön inkübasyona maruz bırakılan hücreler devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e maruz bırakılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bu deney sonuçları da tek başına H₂O₂ sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Ekstraktların IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ konsantrasyonlarıyla 24 saat ön inkübasyona bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerinde MDA seviyesinde meydana gelen azalma ekstraktların güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı antioksidan etkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6).

Düşük konsantrasyonlarda *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının H₂O₂ ile birlikte uygulanması sonucunda ekstraktlar antioksidan bir madde gibi hücre membran yapısını korurken, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre MDA miktarını arttırmıştır ve prooksidan madde gibi bir davranış sergilemiştir.

Çizelge 4.7. *P. igniarius* ekstraktlarının hücre dizilerinin membranı üzerine etkileri

Uygulanan Konsantrasyonlar Ekstrakt (µg/mL)+ H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. MDA miktarı (nM/mg protein) (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
Kontrol	0.06±0.02 _{1A}	0.06±0.02 _{1A}	0.09±0.07 _{1A}	0.09±0.07 _{1A}
IC₅₀ <i>P. igniarius</i>	1.85±0.04 _{fA}	1.70±0.03 _{fA}	1.72±0.64 _{fB}	1.55±0.82 _{fB}
	*		*	
IC₇₀ <i>P. igniarius</i>	2.6±0.08 _{bcA}	2.53±0.18 _{bcA}	2.48±0.62 _{cB}	2.18±0.73 _{dB}
			*	
IC₅₀ H₂O₂	2.82±0.03 _{bB}	2.82±0.03 _{bA}	3±0.57 _{bA}	3±0.57 _{bA}
IC₇₀ H₂O₂	3.1±0.01 _{aB}	3.1±0.01 _{aB}	3.5±0.24 _{aA}	3.5±0.24 _{aA}
IC₅₀ H₂O₂+IC₁₀ <i>P. igniarius</i>	2.1±0.08 _{eB}	2.5±0.63 _{bB}	2.4±0.25 _{cdA}	2.64±0.03 _{cA}
	*		*	
IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P. igniarius</i>	1.3±0.16 _{gB}	1.8±0.44 _{eB}	1.5±0.16 _{gA}	3.4±0.14 _{aA}
	*		*	
IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P. igniarius</i>	2.7±0.58 _{bcA}	1.2±0.06 _{hB}	2.02±0.11 _{eB}	1.31±0.27 _{gA}
	*		*	
IC₇₀ H₂O₂+IC₁₀ <i>P. igniarius</i>	2.71±0.08 _{bcA}	2.9±0.15 _{bA}	2.28±1.05 _{dB}	2.77±0.06 _{cB}
	*		*	
IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P. igniarius</i>	2.3±0.17 _{dA}	2.16±0.29 _{dB}	2±0.91 _{eB}	2.89±1.61 _{bcA}
	*		*	
IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P. igniarius</i>	2.6±0.41 _{cA}	1.5±0.33 _{gB}	2.34±0.07 _{cdB}	1.75±1.08 _{eA}
	*		*	

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler aynı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

*Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir. S.H.: Standart Hata

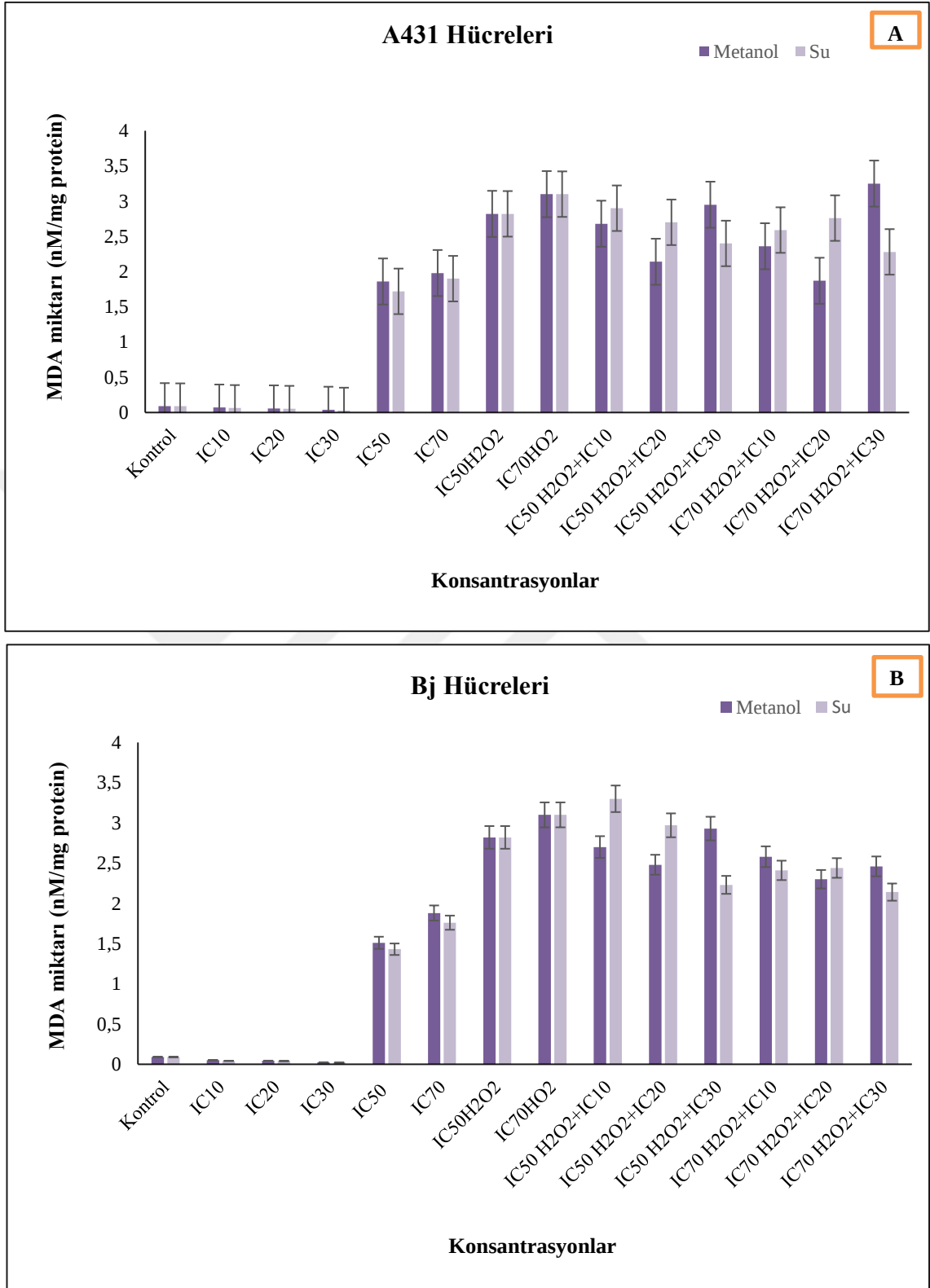
4.4.2. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizilerinde MDA düzeylerinin belirlenmesi

Ekstraktların antioksidan (koruyucu) etkilerini ortaya koymak için, antioksidan testi çalışmalarından elde ettiğimiz düşük konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile hücreler 1 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Devamında güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e maruz bırakılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bu sonuçlar sadece H_2O_2 'e maruz bırakılan deney sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlardaki ekstraktların ($<IC_{50}$) MDA düzeyleri üzerine etkisi de Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tek başına *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılan A431 hücrelerinin MDA düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 31 ve 33 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 28.7 ve 31.7 kat daha fazla bulunmuştur. Ancak ekstraktlara düşük konsantrasyonlarda (IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30}) maruz bırakılan hücrelerde ölçtüğümüz MDA düzeyi kontrol grubundan farklı değildir.

Tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinin MDA düzeyleri tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki H_2O_2 uygulanan hücreler ile kıyaslanmıştır. IC_{50} *P. torulosus* metanol uygulanan hücrelerde IC_{50} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 1.54 kat daha az bulunurken, IC_{70} *P. torulosus* metanol uygulanan hücrelerde IC_{70} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 1.5 kat daha az bulunmuştur. IC_{50} *P. torulosus* su uygulanan hücrelerde IC_{50} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 1.7 kat daha az bulunurken, IC_{70} *P. torulosus* su uygulanan hücrelerde IC_{70} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 1.63 kat daha az bulunmuştur.

Tek başına *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılan Bj hücrelerinin MDA düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 17.1 ve 20.9 oranında daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 15.9 ve 19.55 oranında daha fazla bulunmuştur. IC_{50} *P. torulosus* metanol uygulanan hücrelerde IC_{50} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 2 kat daha az bulunurken, IC_{70} *P. torulosus* metanol uygulanan hücrelerde IC_{70} H_2O_2 uygulanan hücelere oranla MDA düzeyi 1.9 kat daha az bulunmuştur.

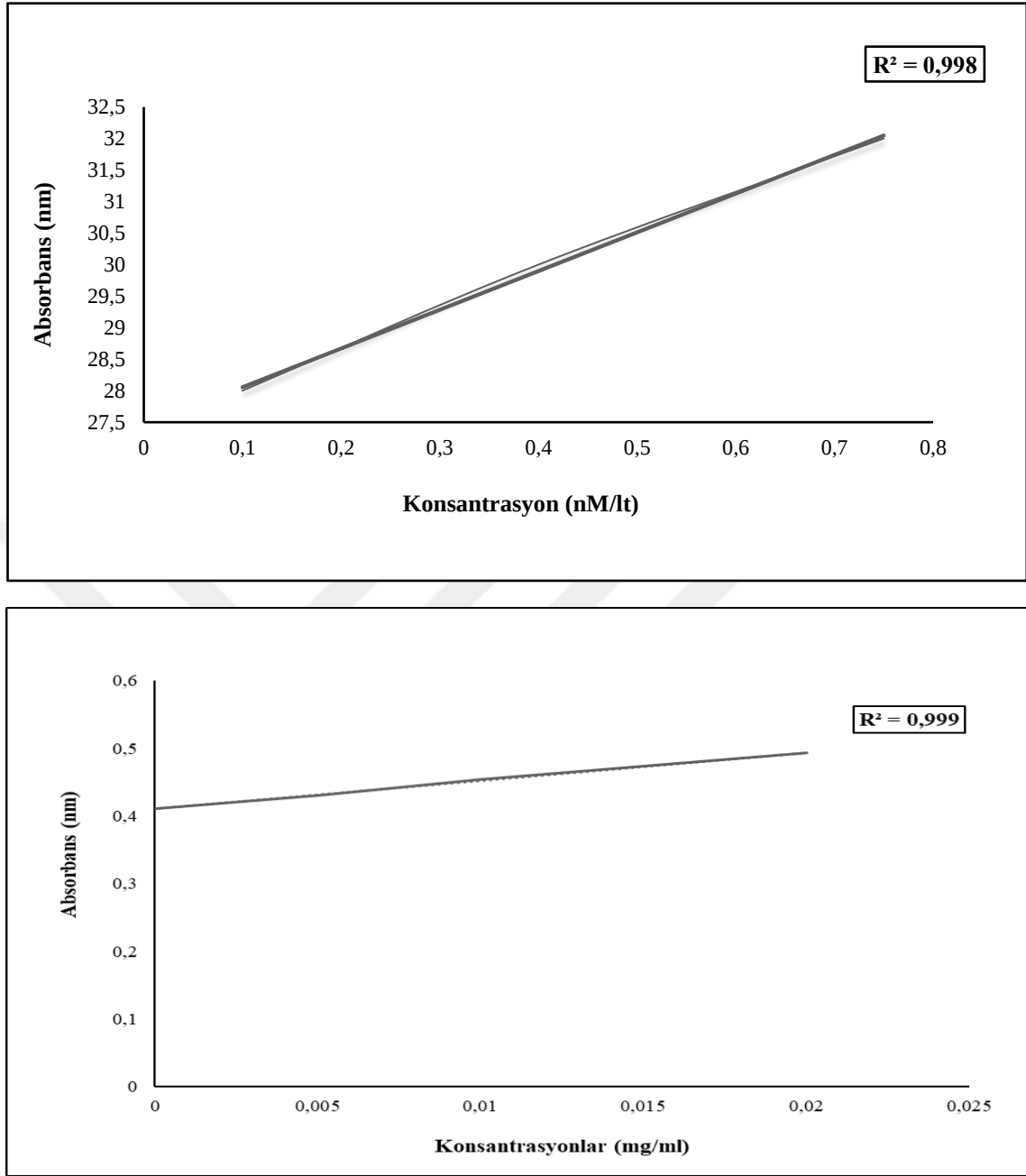


Şekil 4.7. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının **A)** A431 ve **B)** Bj hücre dizilerinin membranı üzerine etkilerinin belirlenmesi

Çizelge 4.8. *P. torulosus* ekstraktlarının hücre dizilerinin membranı üzerine etkileri

Uygulanan Konsantrasyonlar Ekstrakt (µg/mL)+ H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. MDA miktarı (nM/mg protein) (24 saat)			
	A431 Hücre Dizisi		Bj Hücre Dizisi	
	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Su Ekstraktı
Kontrol	0.06±0.02gA	0.06±0.02gA	0.09±0.07gA	0.09±0.07hA
IC₅₀ <i>P.torulosus</i>	1.83±0.05fA	1.68±0.02fA	1.51±0.21fA	1.43±0.16gB
	*			
IC₇₀ <i>P.torulosus</i>	1.98±0.08efA	1.9±0.05eA	1.88±0.07eA	1.76±0.04fB
			*	
IC₅₀ H₂O₂	2.82±0.03bcB	2.82±0.03bcB	3±0.57bA	3±0.57cA
IC₇₀ H₂O₂	3.1±0.01abB	3.1±0.01aB	3.5±0.24aA	3.5±0.24aA
IC₅₀ H₂O₂+IC₁₀ <i>P.torulosus</i>	2.68±0.07cA	2.9±0.02bB	2.7±0.83cA	3.3±0.03bA
	*		*	
IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P.torulosus</i>	2.14±0.35eB	2.7±0.44cB	2.48±0.31dA	2.97±0.08cA
	*		*	
IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P.torulosus</i>	2.95±0.41bA	2.4±0.27dA	2.93±0.48bA	2.23±0.33eB
	*		*	
IC₇₀ H₂O₂+IC₁₀ <i>P.torulosus</i>	2.36±0.53dB	2.59±0.61cA	2.58±0.87cdA	2.41±0.13dB
	*		*	
IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P.torulosus</i>	1.87±0.21fB	2.76±0.29bcA	2.46±0.01dA	2.44±0.01dB
	*			
IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P.torulosus</i>	3.25±0.47aA	2.28±0.82dA	2.5±0.02dB	2.18±0.25eB
	*		*	

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05). *Aynı hücre dizisine uygulanan farklı ekstrakt grupları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir. S.H.: Standart Hata



Şekil 4.8. A) MDA standart grafiği ve B) BSA standart grafiği

Tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonunda H_2O_2 'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 47 ve 51.6 oranında MDA düzeylerinde artış görülmüştür. Bj hücrelerinde ise bu oranlar (IC_{50} ve IC_{70} için) sırasıyla 33 ve 38.9 olarak belirlenmiştir. Tek başına IC_{50} H_2O_2 uygulanan A431 hücrelerindeki MDA düzeyi IC_{50} H_2O_2 + IC_{20} *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.32 kat artarken, IC_{50} H_2O_2 + IC_{30} *P. torulosus* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 1.04 kat artmıştır. Bj hücrelerine uygulanan *P. torulosus* metanol ve su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonunda ortaya çıkan MDA düzeyi, H_2O_2 IC_{50} konsantrasyonuna oranla sırasıyla 1.98 kat ve 2.1 kat daha az bulunmuştur. Sadece IC_{50} H_2O_2 uygulanan Bj hücrelerindeki MDA düzeyi IC_{50} H_2O_2 + IC_{20} *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.21 kat

artarken, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 1.02 kat artmıştır.

IC₇₀ H₂O₂ uygulanan A431 hücrelerindeki MDA düzeyi IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.65 kat artarken, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 1.36 kat artmıştır. Sadece IC₇₀ H₂O₂ uygulanan Bj hücrelerindeki MDA düzeyi IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelerine göre 1.42 kat artarken, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su ekstraktına maruz kalan hücrelerde ise 1.6 kat artmıştır.

Düşük konsantrasyonlarda ekstraktlar ile ön inkübasyona maruz bırakılan hücreler devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e maruz bırakılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Bu deney sonuçları da tek başına H₂O₂ sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Ekstraktların IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ konsantrasyonlarıyla 24 saat ön inkübasyona bırakılan A431 ve Bj hücre dizilerinde meydana gelen MDA düzey değişimleri, H₂O₂'e karşı ekstraktların antioksidan etkisini göstermektedir (Şekil 4.7). Düşük konsantrasyonlarda *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının H₂O₂ ile birlikte uygulanması sonucunda ekstraktlar antioksidan bir madde gibi hücre membran yapısını korurken, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre MDA miktarını arttırmıştır ve prooksidan bir madde gibi davranış sergilemiştir.

4.5. *P. igniarius* ve *P. torulosus* Ekstraktlarının Hücre Dizileri Üzerindeki GPx Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.5.1. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi

Ekstraktların A431 ve Bj hücreleri üzerine etkisini ortaya koymak için, hücreler 24 saat boyunca IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında su ve metanol ekstraktlarına maruz bırakılarak GPx aktiviteleri ölçülmüştür. Ekstraktların oksitleyici bir ajan ile muamele edilmesi sonucunda hücrelerin oksidatif hasara karşı kendini korumak amacıyla sentezledikleri bir enzim olan GPx düzeylerinin değişiminin belirlenmesi için hücreler, antioksidan deneyleri sonucunda elde edilen düşük konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile ön inkübasyona maruz bırakılmıştır. Sonrasında güçlü bir oksitleyici ajan olan H₂O₂'e maruz bırakılarak GPx aktiviteleri ölçülmüştür. Bu sonuçlar sadece H₂O₂'e maruz bırakılan deney sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Tek başına *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 12.4 ve 17.6 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 9 ve 10 kat daha fazla bulunmuştur. Bj hücreleri *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.1 ve 11 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için ise sırasıyla 4.53 ve 6 kat daha fazla bulunmuştur.

Güçlü bir oksitleyici ajan olan H₂O₂'e 24 saat maruz kalan hücrelerin GPx düzeyleri kontrol ve ekstrakt grubu ile karşılaştırılmıştır.

Tek başına IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 16 ve 27.2 kat GPx düzeyinde artış görülmüştür. Bj hücrelerinde ise bu oranlar (IC₅₀ ve IC₇₀ için) sırasıyla 17.33 ve 21.6 olarak belirlenmiştir.

Düşük konsantrasyonlarda ekstraktlarla ön inkübasyona maruz bırakılan hücreler devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e maruz bırakılarak GPx düzeyleri ölçülmüştür. Bu deney sonuçları da tek başına H₂O₂ sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

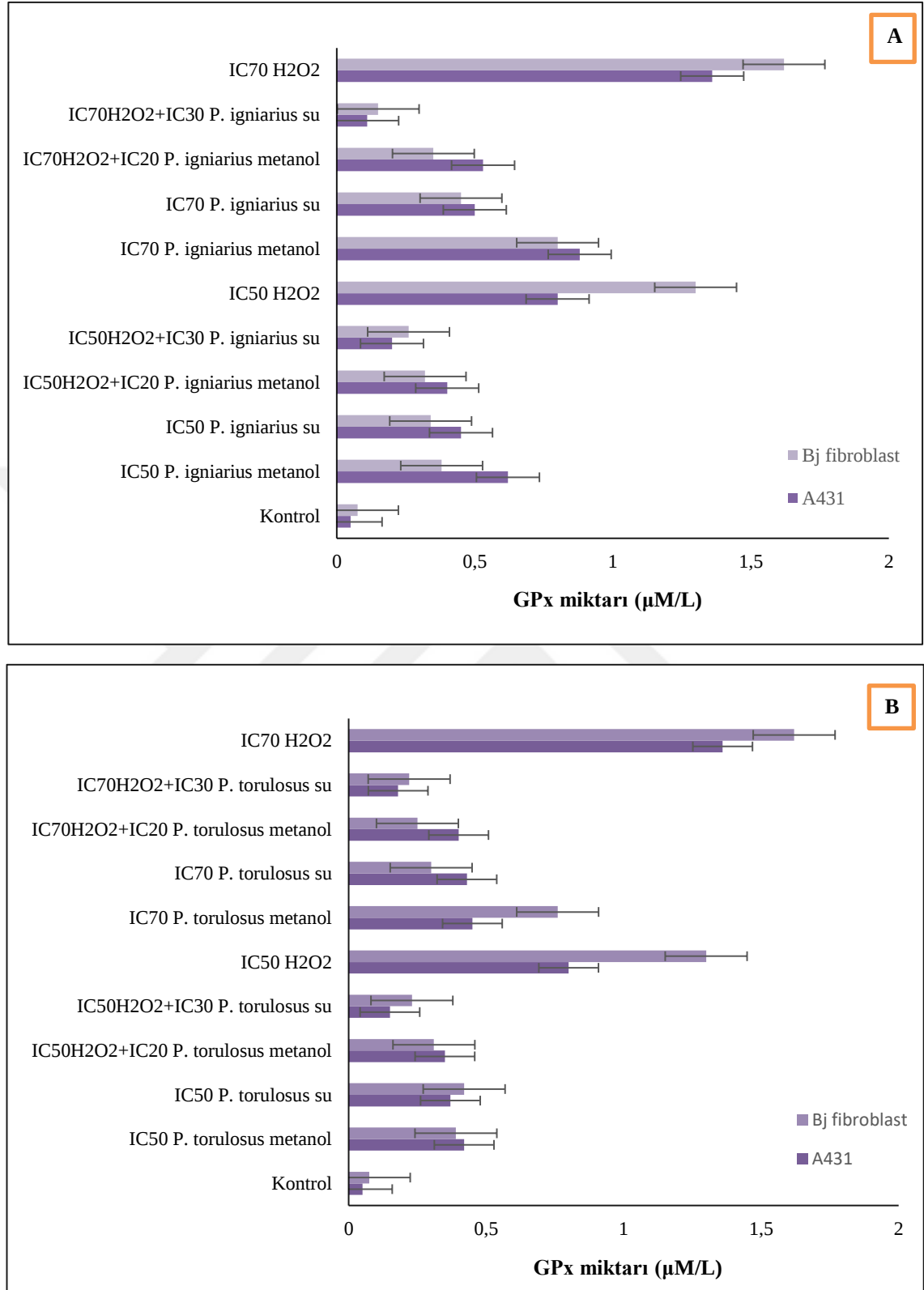
P. igniarius uygulanan A431 hücrelerinde IC₅₀ H₂O₂ ve IC₇₀ H₂O₂'e göre sırasıyla IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 2 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 2.6 kat, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su kombinasyonunda 4 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su kombinasyonunda 12.4 kat GPx düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise IC₅₀ H₂O₂ ve IC₇₀ H₂O₂'e göre sırasıyla IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 4.1 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 4.6 kat, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su kombinasyonunda 5 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* su kombinasyonunda 3.35 kat GPx düzeylerinde azalma meydana gelmiştir.

4.5.2. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi

Ekstraktların A431 ve Bj hücreleri üzerine etkisini ortaya koymak için, hücreler 24 saat boyunca IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında su ve metanol ekstraktlarına maruz bırakılarak GPx aktiviteleri belirlenmiştir. GPx düzey değişimlerinin belirlenmesi için, düşük konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile hücreler ön inkübasyona maruz bırakılmıştır. Sonrasında oksitleyici bir ajan olan H₂O₂'e maruz bırakılarak GPx aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Tek başına *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan A431 hücreleri GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 8.4 ve 9 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 7.4 ve 8.6 kat daha fazla bulunmuştur. Bj hücreleri *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.2 ve 10.1 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.6 ve 4 kat daha fazla bulunmuştur.

P. torulosus uygulanan A431 hücrelerinde IC₅₀ H₂O₂ ve IC₇₀ H₂O₂'e göre sırasıyla IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 2.3 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 3.4 kat, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su kombinasyonunda 5.3 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su kombinasyonunda 7.55 kat GPx düzeyinde azalma meydana gelmiştir. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise IC₅₀ H₂O₂ ve IC₇₀ H₂O₂'e göre sırasıyla IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 4.2 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 6.5 kat, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su kombinasyonunda 5.7 kat, IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. torulosus* su kombinasyonunda 7.4 kat GPx düzeyinde azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.9. A) *P. igniarius* ve B) *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ ve IC₇₀ değerlerinin A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx aktivitelerinin belirlenmesi

Çizelge 4.9. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx miktarının belirlenmesi

Uygulanan Konsantrasyonlar Ekstrakt (µg/mL)+ H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. GPx miktarı (µM/L) (24 saat)	
	A431 Hücre Dizisi	Bj Hücre Dizisi
Kontrol	0.05±0.67dA	0.075±0.75fA
IC₅₀ H₂O₂	0.8±0.42bB	1.3±0.44bA
IC₇₀ H₂O₂	1.36±0.69aB	1.62±1.48aA
IC₅₀ <i>P. igniarius</i> metanol ekstraktı	0.62±0.94cA	0.38±0.53eB
IC₅₀ <i>P. igniarius</i> su ekstraktı	0.45±0.91cA	0.34±0.28eB
IC₇₀ <i>P. igniarius</i> metanol ekstraktı	0.88±0.55bA	0.8±0.47cA
IC₇₀ <i>P. igniarius</i> su ekstraktı	0.5±0.67cA	0.45±0.43dA
IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P.</i> <i>igniarius</i> metanol ekstraktı	0.4±1.61dA	0.32±0.58eA
IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P.</i> <i>igniarius</i> su ekstraktı	0.2±0.67dA	0.26±1.17eA
IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P.</i> <i>igniarius</i> metanol ekstraktı	0.53±0.89cA	0.35±0.78eB
IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P.</i> <i>igniarius</i> su ekstraktı	0.11±0.43dA	0.15±0.45fA

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05). S.H.: Standart Hata

Çizelge 4.10. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücre dizileri üzerindeki GPx miktarının belirlenmesi

Uygulanan Konsantrasyonlar Ekstrakt (µg/mL)+ H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	Ortalama (X) ± S.H. GPx miktarı (µM/L) (24 saat)	
	A431 Hücre Dizisi	Bj Hücre Dizisi
Kontrol	0.05±0.67dA	0.075±0.75eA
IC₅₀ H₂O₂	0.8±0.42bB	1.3±0.44bA
IC₇₀ H₂O₂	1.36±0.69aB	1.62±1.48aA
IC₅₀ <i>P. torulosus</i> metanol ekstraktı	0.42±0.88cA	0.39±0.51dA
IC₅₀ <i>P. torulosus</i> su ekstraktı	0.37±0.52cA	0.42±0.65dA
IC₇₀ <i>P. torulosus</i> metanol ekstraktı	0.45±0.83cB	0.76±1.04cA
IC₇₀ <i>P. torulosus</i> su ekstraktı	0.43±0.08cA	0.3±1.13dB
IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P. torulosus</i> metanol	0.35±0.73cA	0.31±0.55dA
IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P. torulosus</i> su	0.15±1.17dB	0.23±0.87dA
IC₇₀ H₂O₂+IC₂₀ <i>P. torulosus</i> metanol ekstraktı	0.4±1.25cA	0.25±0.36dB
IC₇₀ H₂O₂+IC₃₀ <i>P. torulosus</i> su ekstraktı	0.18±1.67dA	0.22±1.11dA

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

S.H.: Standart Hata

5. TARTIŞMA

Phellinus cinsi, Hymenochaetaceae familyasına ait bir tıbbi fungus grubudur (Ranadive vd. 2012). Index Fungorum'a (2021) göre dünya çapında 455 *Phellinus* taksonu bulunmaktadır (Anonymous 4). *Phellinus*'u binlerce yıldır Asya ülkeleri kanser, uçuk, kulak ağrısı, döküntü, iske mi ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanmaktadır (Chen vd. 2016).

Daha önceki çalışmalarda, *Phellinus* cinsine ait bazı türlerin antioksidan (Wang vd. 2005; Ajith ve Janardhanan 2007), antiinflatuar (Elsayed vd. 2014) ve antikanser gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Laovachirasuwan vd. 2016). *Phellinus* türlerinde fitokimyasal bileşenlerin analiz edildiği çalışmalarda, polisakkaritlerin (Zapora vd. 2016) triterpenoidlerin (Yin vd. 2015), fenoliklerin ve flavonoidlerin (Chen vd. 2016) bulunduğu belirtilmiştir. Bu bileşenlerin çoğu antioksidan olarak etki göstermektedirler. Antioksidanlar, insan vücudundaki serbest radikal reaksiyonlarının nötralizasyonunda önemli rol oynarlar (Bagchi vd. 2000). Serbest radikaller hücrelere zarar verebilecek oksidatif strese yol açar. Bu hasar kanser, diyabet ve ayrıca inflamasyon gibi hastalıklara neden olmaktadır (Lobo vd. 2010).

Bu sebeple, kayda değer antioksidan aktiviteye ve düşük sitotoksititeye sahip güçlü biyoaktif maddelerin keşfi ve araştırılması, doğal ürünlerden tedavi edici ilaçların geliştirilmesi için önem arz etmektedir. Doğal ürünler, kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesinde anahtar rol oynayan daha az toksik ajanlardır (Song vd. 2013). Ayrıca günümüzde fitokimyasallar, kanser hastalığının önlenmesi ve tedavisi için kullanılmak üzere popülerlik kazanmaktadır (Jang vd. 1997). Bir dizi biyoaktif madde, moleküler mekanizmalarla kanseri önleme potansiyeli göstermektedirler (Nosrati vd. 2017).

Kanser tedavisinde makrofungusların kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi açısından makrofunguslardan elde edilen ekstraktların *in vitro* çalışmalarla prooksidan ve antioksidan özelliklerinin ortaya konulması gerekmektedir. Antioksidan olarak tüketilen doğal kaynaklı ekstraktlar ile ilgili bilinmesi gereken şudur ki; oksidasyon reaksiyonları üzerine farklı antioksidan konsantrasyonlarının etkisi pek çok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler sayılabilir. Funguslardan elde edilen ekstraktlar koşullara bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda farklı biyolojik aktiviteler gösterebilmektedirler.

Çalışmamızda, sekonder metabolitler açısından zengin olan *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarının A431 ve B_j hücrelerinde prooksidan ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için hücre dizileri güçlü bir oksitleyici ajan olan H₂O₂ ile inkübe edilmeden önce düşük konsantrasyonlarda *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarına maruz bırakılarak ekstraktların oksidatif hasara karşı antioksidan etkileri araştırılmıştır. Aynı yöntemle membran hasarı sonucu ortaya çıkan MDA miktarı ve GPx aktivitesi ölçülerek *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarının antioksidan mekanizma üzerine etkileri belirlenmiştir. Ekstraktların hücreler üzerine prooksidan etkisini ortaya koymak için hücreler artan konsantrasyonlarda ekstraktlara maruz bırakılarak sitotoksik etkileri ve membran hasarı ölçülmüştür.

Çalışmamızda *P. igniarius*, *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. A431 hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. igniarius* metanol ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri 100 µg/mL ve 340 µg/mL olarak bulunurken, *P. igniarius* su ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri 188.2 µg/mL ve 400 µg/mL olarak bulunmuştur. *P. torulosus* metanol ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonu 140 µg/mL ve 352.4 µg/mL olarak bulunurken, *P. torulosus* su ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonu 200 µg/mL ve 445 µg/mL olarak bulunmuştur.

Ancak kanser tedavilerinde kullanılacak olan ve yeni geliştirilen terapötiklerin sağlıklı hücrelere de zarar verme olasılığının göz önüne alınması ve bu hücrelere de aynı uygulamalar yapıp sonuçların karşılaştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda sağlıklı hücre dizisi olarak seçilen Bj hücre dizisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda *P. igniarius* metanol ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri 295 µg/mL ve 667 µg/mL olarak bulunurken, *P. igniarius* su ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri 350 µg/mL ve 725 µg/mL olarak bulunmuştur. *P. torulosus* metanol ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonu 216.6 µg/mL ve 371.4 µg/mL olarak bulunurken *P. torulosus* su ekstraktının IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonu 241.7 µg/mL ve 600 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, yüksek metastaz özelliğine sahip A549 (alveolar bazal epitelyal kanser hücresi), Bel7402 (HeLa türevi), HCT-8 (intestinal karsinoma hücresi) ve HepG2 (karaciğer kanseri) hücre dizilerinde *P. linteus*'tan elde edilen bir polisakkaritin (PL-N1) antitümör aktivitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler 72 saat 50 µg/mL PL-N1 ile muamale edilmiştir ve A549, Bel7402 ve HCT-8 hücrelerinde çok az ya da neredeyse hiç sitotoksik etki gerçekleşmemiştir. Ancak HepG2 hücrelerinde 50 µg/mL konsantrasyon değerinde %13 oranında inhibisyon ve antitümör aktivite gözlenmiştir. Ayrıca, PL-N1, 50-200 µg/mL konsantrasyon aralığında doza bağımlı bir davranış sergilemiştir. HepG2 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkileri, %12.7'den %24'e yükselmiştir. HepG2 kanser hücreleri üzerindeki en yüksek inhibisyon oranı 200 µg/mL'de %24 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, PL-N1, HepG2 hücre proliferasyonu üzerinde potansiyel inhibisyon etki göstermiştir. Çalışmanın sonuçları belirli bir dereceye kadar, PL-N1'in HepG2 hücrelerinin büyümesine karşı antitümör aktivitesi sergilediğini göstermiştir (Pei vd. 2015). PL-N1 sitotoksik etkiyi sadece HepG2 hücrelerinde göstermiştir (200 µg/mL'de %24). Çalışmamızda kullandığımız A431 hücrelerinde 200 µg/mL'lik *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla %45 ve %48 inhibisyon oranı gözlenirken, *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla %44 ve %50 inhibisyon oranı görülmüştür. Ekstraktların 24 saatlik sitotoksik etkisi PL-N1'in göstermiş olduğu 72 saatlik sitotoksik etkiden daha fazla bulunmuştur. Dolayısıyla ekstraktların aynı konsantrasyonda artan zamana bağlı olarak hücre ölümlerinin de artacağı göz önünde bulundurulursa ekstraktların sitotoksik etkisinin PL-N1'den daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir.

P. linteus metanol ekstraktının kolon kanseri hücre dizilerindeki (HCT-116 ve SW-480) sitotoksik etkisi MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. HCT-116 hücre dizisinde 24 ve 72 saat inkübasyon sonucunda IC₅₀ değeri sırasıyla 261.1 µg/mL ve 200.58 µg/mL olarak bulunmuştur. SW-480 hücre dizisinde 24 ve 72 saat inkübasyon sonucunda IC₅₀ değeri sırasıyla 170.94 µg/mL ve 169.80 µg/mL olarak bulunmuştur. *P. linteus* ekstraktına karşı SW-480 hücreleri HCT-116 hücrelerinden daha fazla duyarlılık

göstermiştir. Çalışmada kullanılan farklı fungus ekstraktlarının ise (*Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus* ve *Ganoderma lucidum*) hücrelerde önemli derecede sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Seklic vd. 2016). *P. linteus* ekstraktının HCT-116 ve SW-480 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda sırasıyla 261.1 µg/mL ve 170.94 µg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada kullandığımız A431 hücrelerinde IC₅₀ değerleri *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla 100 µg/mL ve 188.2 µg/mL; *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarında sırasıyla 140 µg/mL ve 200 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktlarının A431 hücreleri üzerine 24 saatlik sitotoksik etkisi *P. linteus* ekstraktının HCT-116 ve SW-480 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisinden daha fazla bulunmuştur. Ancak su ekstraktlarının A431 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi *P. linteus* ekstraktının SW-480 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinden düşük bulunmuştur.

P. igniarius'tan elde edilen PPI (*P. igniarius* polisakkariti) ile 50, 100, 200 ve 400 µg/mL'de 24 saat süre ile inkübe edilen RAW264.7 makrofaj hücrelerinin canlılıkları MTT testi kullanılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı sırasıyla %96.31, %97.79, %96.14 ve %91.38 olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler *P. igniarius*'un RAW264.7 makrofaj hücrelerinde önemli bir sitotoksikite göstermediğini ortaya koymuştur (Kim vd. 2019). Başka bir çalışmada farklı ekstraksiyon yöntemiyle *P. igniarius*'tan elde edilen PPI (*P. igniarius* polisakkariti)'nın da RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Wang vd. 2019). *P. igniarius*'tan elde edilen PPI'nın bağışıklık sisteminde yer alan ve sağlıklı hücrelerden olan makrofajlar üzerine sitotoksik etki göstermemesi ileride bu maddelerin ilaç olarak kullanımının önünü açabilir. Ayrıca kanser hücrelerinde daha fazla sitotoksik etki göstermesi çok önemlidir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerine bakacak olursak; *P. igniarius* metanol ekstraktının 50, 100, 200 ve 400 µg/mL'de A431 hücre canlılığı sırasıyla %56, %50, %45, %18 olarak belirlenirken, *P. igniarius* su ekstraktının hücre canlılığına etkisi ise %83, %65, %48, %30 olarak bulunmuştur. *P. igniarius* metanol ekstraktının 50, 100, 200 ve 400 µg/mL'de Bj hücre canlılığı sırasıyla %89, %85, %69, %42 olarak belirlenirken, *P. igniarius* su ekstraktının hücre canlılığına etkisi %92, %89, %70, %45 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla ekstraktlar sağlıklı Bj hücrelerinde A431 kanser hücrelerine oranla daha az sitotoksik etki yaratmıştır. Bu sonuç *P. igniarius* ekstraktlarının kanser tedavisinde kullanılabileceğini akla getirmektedir.

Ticari olarak satılan *P. linteus* ekstraktlarından PL-ES ve PL-I-ES'nin prostat kanseri (PC-3, DU-145, LNCaP), T24 (idrar torbası kanser hücresi), ACHN (böbrek kanseri hücresi), A549 (alveolar bazal epitelyal kanser hücresi), MCF-7 (meme kanseri hücresi), AGS (gastrik kanseri), HepG2 (karaciğer kanser hücresi), U87 (beyin kanser hücresi) hücre dizileri üzerine antikanser etkilerinin belirlenmesi için hücreler 100 µg/mL PL-ES, 100 µg/mL ve 250 µg/mL PL-I-ES ile inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, PL-ES'nin (100 µg/mL), belirlenen kanser hücrelerinin tümünde %40-80 oranında büyümede bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. PL-I-ES (100 µg/mL), PC-3, MCF-7, AGS ve HepG2 hücre dizilerinde %20-60 oranında büyümede bir azalma göstermiş, ancak geri kalan hücreler üzerine çok az etkili olmuştur. Buna karşın, PL-I-ES (250 µg/mL), DU-145, LNCaP ve ACHN dışındaki hücrelerde %25-90 oranında büyümeyi azaltmıştır. Elde edilen veriler 250 µg/mL PL-I-ES'nin 100 µg/mL'den önemli ölçüde daha etkili olduğunu göstermektedir.

Bu nedenle hem PL-ES hem de PL-I-ES'nin antikanser etkileri olduğunu ancak PL-ES'nin PL-I-ES'den daha güçlü olduğunu göstermektedir (Konno vd. 2015). Çalışmamızda kullandığımız *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının 100 ve 250 µg/mL'lik konsantrasyonlarının A431 hücre dizileri üzerine etkisine bakacak olursak; *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktlarının 100 µg/mL'de A431 hücre canlılığına etkisi sırasıyla %50 ve %54; su ekstraktında ise %62 ve %65 olarak belirlenmiştir. *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktlarının 250 µg/mL'de A431 hücre canlılığına etkisi sırasıyla %41.5 ve %44; su ekstraktında ise %42.5 ve %46 olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler sonucunda 250 µg/mL *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktının 100 µg/mL ve 250 µg/mL *P. igniarius* ve *P. torulosus* su ekstraktlarından daha etkili olduğunu göstermektedir. Ticari olarak satılan *P. linteus* ekstraktlarından PL-ES ve PL-I-ES'nin kullandığımız ekstraktlardan tüm hücrelerde daha düşük sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür.

P. igniarius'tan elde edilen suda çözünebilir hücrelerarası polisakkarit çeşitlerinden olan (IPS), IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 ve IPSW-4'ün antitümör potansiyelini değerlendirmek için HepG2, HGC (karaciğer kanseri hücreleri) ve SW480 (kolon kanseri hücresi) hücre dizilerinin kullanıldığı bir çalışmada tüm hücreler, 10, 30, 50, 70 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında saflaştırılmış polisakkarit ekstraktları ile 24 saat inkübe edilmiştir ve MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, test edilen saflaştırılmış polisakkaritlerin hepsinin HepG2 ve SW480 hücre dizilerine karşı büyüme inhibisyonu etkilerine sahip olduğunu ancak HGC hücre dizisi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi sergilemediğini göstermiştir. Dört saflaştırılmış polisakkarit ekstraktında IPSW-1, HepG2 hücreleri üzerinde en güçlü inhibitör etkiyi göstermiştir ve bunu IPSW-2 izlemiştir. IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 ve IPSW-4'ün HepG2 hücrelerinin canlılığı sırasıyla %61, %65, %75 ve %71 olarak bulunmuştur. IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 ve IPSW-4'ün HepG2 hücreleri üzerindeki en yüksek inhibisyon oranları 70 µg/mL konsantrasyonunda %39, %35, %25 ve %29 olarak belirlenmiştir. SW480 hücre dizilerinde, IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 ve IPSW-4, 10–100 µg/mL konsantrasyon aralığında doza bağı bir davranış sergilemiştir. IPSW-1, 58.98 µg/mL'lik IC₅₀ değeri ile en güçlü inhibitör etkiyi göstermiştir. Bunu 66.21 µg/mL'lik IC₅₀ değeri ile IPSW-3 izlemiştir. Saflaştırılmış polisakkaritler arasında en düşük antitümör aktiviteye sahip olan IPSW-4 olarak belirlenmiştir (Li vd. 2015). *P. igniarius* ve *P. torulosus*'tan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ konsantrasyonlarını değerlendirecek olursak, *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 100 µg/mL ve 188.2 µg/mL; *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 140 µg/mL ve 200 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri yukarıda belirttiğimiz saflaştırılmış polisakkaritlerden daha yüksek bulunmuştur. *P. igniarius*'tan izole edilen polisakkaritlerin *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarından daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

P. baumii'den saflaştırılarak elde edilmiş PPB'nin (*P. baumii* polisakkariti) HeLa (rahim ağzı kanseri) ve SGC-7901 (gastrik kanser) hücre dizileri üzerinde antiproliferasyon etkisi araştırılmıştır. PPB, HeLa hücrelerinin proliferasyonunu doza bağı olarak (0.0125-0.6 mg/mL) belirgin şekilde inhibe etmiştir. PPB konsantrasyonu 0.4 ve 0.6 mg/mL'ye yükseldiğinde, proliferasyonun inhibisyon oranı sırasıyla %83.74 ve %90.63'e ulaşmıştır. 5-Fu'nun etkisi ile karşılaştırıldığında, PPB, 0.4 mg/mL konsantrasyonda HeLa hücrelerine karşı daha güçlü inhibitör etki göstermiştir (p<0.01).

Ayrıca 0.2, 0.4 ve 0.6 mg/mL konsantrasyonlarında PPB, SGC-7901 hücrelerinin proliferasyonunu sırasıyla %93.88, %95.56 ve %96.55 oranında inhibe etmiştir (Liu vd. 2016). Çalışmamızda 200 µg/mL, 400 µg/mL ve 600 µg/mL (0.2, 0.4 ve 0.6 mg/mL) konsantrasyonlarında A431 hücrelerinde *P. igniarius* metanol ekstraktının inhibisyon oranları sırasıyla %45, %18, %16; *P. igniarius* su ekstraktının inhibisyon oranları sırasıyla %48, %30, %24; *P. torulosus* metanol ekstraktının inhibisyon oranları sırasıyla %44, %20, %18; *P. torulosus* su ekstraktının inhibisyon oranları sırasıyla %50, %32, %23 olarak belirlenmiştir. *P. baumii*'den izole edilen polisakkaritlerin *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarından daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

P. igniarius'tan elde edilen *P. igniarius* selenyum ile zenginleştirilmiş misel polisakkaritleri (PSeP) ile muamele edilen HaCaT (keratinosit hücreleri), 1000 µg/mL'lik konsantrasyonda bile sitotoksik etki göstermemiştir. Ayrıca tüm konsantrasyonlarda hücrelerin hayatta kalma oranı %80'in üzerindedir. Elde edilen sonuçlar, PSeP'nin pratik olarak toksik olmayan bir madde olduğunu göstermiştir (Luo vd. 2021). Çalışmamızdan elde edilen verilere göre *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sağlıklı Bj hücreleri üzerinde PSeP'e kıyasla daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ancak PSeP kanser hücrelerinde test edilmemiştir.

P. igniarius etanol ekstraktının kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, MTT testi ile değerlendirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda *P. igniarius* etanol ekstraktının SGC-7901 (gastrik kanser hücresi), AGS (gastrik kanser hücresi), HeLa (rahim ağzı kanseri hücresi), HepG2 (karaciğer kanseri hücresi) ve A549 (alveolar bazal epitelyal kanser hücresi) hücrelerinin IC₅₀ değerleri 110.7, 270.5, 314.2, 361.6 ve 531.7 µg/mL olarak bulunmuştur ve hücre canlılığını inhibe ettiği belirtilmiştir. *P. igniarius* etanol ekstraktının, SGC-7901 hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik etkiyi sergilediği görülmüştür (Wang vd. 2018). Çalışmamızda 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilere göre *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 100 µg/mL ve 188.2 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurulduğunda çalışmadan elde edilen verilerden daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Antioksidan olarak tüketilen doğal besin kaynaklarımızın antioksidan özelliğini ortaya koyan pek çok test (DPPH, FRAP, TAS, TOS, OSI vb.) bulunmaktadır. Günümüze kadar yapılan bu çalışmalarda antioksidanların canlı hücrelere veya deney hayvanlarına uygulanmaması elde edilen sonuçların ön veri olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. Bu durumda testlerden elde edilen sonuçların canlı hücreler veya deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çünkü yukarıda da belirtildiği gibi oksidasyon reaksiyonları üzerine farklı antioksidan konsantrasyonlarının etkisi antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler gibi pek çok faktöre bağlıdır. Bu yüzden çalışmamızda ekstraktların sağlıklı ve kanser hücreleri üzerine güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı antioksidan etkisini araştırmış bulunmaktayız.

P. igniarius ve *P. rimosus* etanol ekstraktlarının toplam antioksidan durumu (TAS), toplam oksidan durumu (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirleme çalışmaları kapsamında Rel assay kitleri kullanılarak TAS, TOS ve OSI değerleri belirlenmiştir. Örneklerin TAS değerlerinin belirlenmesinde kalibratör olarak Trolox

kullanılmıştır ve sonuçlar mmol Trolox eşdeğer/L olarak ifade edilmiştir. TOS değerinin belirlenmesinde kalibratör olarak H₂O₂ kullanılmıştır ve sonuçlar µmol H₂O₂ eşdeğer/L olarak ifade edilmiştir. Antioksidan bileşiklerin yüzde olarak ne kadar oksidan bileşiği tolere ettiğini gösteren OSI değeri TOS/(TASx10) olarak belirlenmiştir. *P. igniarius*'un TAS (mmol/L), TOS (µmol/L) ve OSI değerleri sırasıyla 5.364, 20.854 ve 0.389 olarak bulunurken, *P. rimosus*'un TAS (mmol/L), TOS (µmol/L) ve OSI değerleri sırasıyla 3.772, 24.323 ve 0.645 olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerle *P. igniarius*'un daha yüksek TAS, TOS ve OSI değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, *P. igniarius* ve *P. rimosus*'un antioksidan potansiyele sahip olduğu farmakolojik araştırmalarda doğal kaynak olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Bal 2020).

P. igniarius suşlarının fungal kültür süpernatantlarından peroksidaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Peroksidaz, lignin ve aromatik hidrokarbon bozunma fonksiyonlarına sahip birçok fungus tarafından üretilen hücre dışı enzimlerdir. *P. igniarius* ve dietilsülfat mutant suşunun peroksidaz aktiviteleri, inkübasyonun 9. gününde zirveye ulaşmıştır ve ardından zamanla kademeli bir şekilde azalma göstermiştir. Aslında, inkübasyonun 9. gününde dietilsülfat mutant suşu diğer suşların peroksidaz aktivitesinin iki katından fazlasını göstermiştir. Nitröz asit ve dietilsülfat mutant suşunun peroksidaz aktiviteleri, inkübasyon süreci boyunca *P. igniarius*'un aktivitesinden daha yüksek bulunmuştur. Mutant suşların maksimum peroksidaz aktiviteleri farklı zaman dilimlerinde *P. igniarius*'tan daha fazladır. Bu çalışmada, üç suştan elde edilen fungal kültür süpernatantlarının antioksidan özellikleri, DPPH ve FRAP'a karşı süpürücü aktivitesi test edilerek belirlenmiştir. *P. igniarius*'un polifenoller etkili antioksidanlardır (Shou vd. 2016) ve FRAP yöntemi, doğrudan serbest radikal süpürme aktivitesi yerine demir iyonu azaltan antioksidan gücü değerlendirmek için kullanılabilir. DPPH süpürme aktivitesinin sonucunun aksine, Nitröz asit mutant suşunun FRAP aktivitesi, 30 günlük inkübasyon periyoduna kadar yaklaşık 15 gün boyunca *P. igniarius*'tan daha yüksek kalmıştır. Bununla birlikte, Nitröz asit mutant suşunun DPPH süpürme aktivitesi 21 güne kadar *P. igniarius*'unkine yakın veya altında bulunmuştur. Daha sonra, Nitröz asit mutant suşunun süpürücü aktivitesi yükselmiştir ve *P. igniarius*'tan daha yükseğe çıkmıştır. Dietilsülfat mutant suşunun ortalama FRAP aktivitesi seviyesi, 21 günlük inkübasyondan kaynaklanan *P. igniarius* suş seviyesini aşmaktadır. Bu sonuçlar, DPPH deneyinden elde edilen sonuçlardan farklıdır. 18. günden sonra *P. igniarius*'un FRAP'ı ile diğer suşların FRAP'ı arasında önemli bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$). Mutant suşların fermentasyon kültürlerindeki, özellikle dietilsülfat mutant suşunun toplam fenolik içeriği azalmıştır (Guo vd. 2019).

Beş Tunus fungusunun (*P. torulosus*, *Fomes fomentarius*, *Trametes versicolor*, *Pisolithus albus* ve *Fomitopsis pinicola*) toplam polifenol içeriğinin Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlendiği çalışmada, *P. torulosus* etanol ekstraktının toplam polifenol içeriği 33.1 mg/g olarak belirlenmiştir. Ekstraktların toplam flavonoid miktarları, 6 ila 10.9 mg/g arasında geniş ölçüde değiştiğini göstermektedir. En büyük miktarlardan biri *P. torulosus* ekstraktlarından elde edilmiştir. En yüksek demir iyon şelatlama gücü, *P. torulosus*'un etanol ekstraktında gözlenmiştir. Bu sonuçlar, toplam flavonoid ve tanen içeriklerine atfedilebilir, bu da demir şelatlama kapasitesi ile ilgili olduğu için peroksidasyon koruyucularının potansiyellerini düşündürmektedir (Shyu vd. 2009). Fenolik bileşiklerin miktarları ile demir iyon-şelatlama gücü ($r^2>0.83$) arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Antioksidan kapasite, DPPH radikal süpürme

aktivitesi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere dayanarak, antiradikal aktivitenin fungus türlerine bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Bu aktivite *P. torulosus*'un etanol ekstraktlarında ($IC_{50} = 0.025$ mg/mL) daha önemlidir ve düşük IC_{50} değerlerinin test edilmiş yüksek bir antioksidan aktiviteye karşılık geldiğine dikkat çekmektedir (Khadri vd. 2017).

Dört tıbbi fungus türünden (*Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* ve *P. linteus*) elde edilen etanolik polisakkarit ekstraktlarının, 0.1-10 mg/mL konsantrasyonlarında, DPPH radikalleri üzerindeki süpürücü aktiviteleri sırasıyla %12.3–75.5, %44.7–66.6, %58.8–94.5, ve %77.9–86.9 olarak belirlenmiştir. 0.1-10 mg/mL'de, pozitif kontrol olan BHT (butillendirilmiş hidroksitoluen), askorbik asit ve α -tokoferol'ün radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla %1.1-55.2, %80.6-87 ve %79.9-78.4 olarak bulunmuştur. Ekstraktlar ve pozitif kontrollerde 5 mg/mL'de radikal süpürücü aktiviteleri şu sırayla azalmıştır: *G. lucidum* > *P. linteus* > askorbik asit > α -tocopherol $\approx$ *A. bisporus* > *A. brasiliensis* > BHT. *G. lucidum* ve *P. linteus* polisakkarit ekstraktlarının indirgeme gücü ise konsantrasyon 0.1'den 5.0 mg/mL'ye yükseldikçe artmıştır ve 5.0–20.0 mg/mL'de sırasıyla 3.01–3.14 ve 3.14–3.11 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, 5.0 mg/mL'de 3.92 indirgeme gücüne sahiptir. Elde edilen sonuçlar *G. lucidum* ve *P. linteus*'tan elde edilen polisakkarit ekstraktlarının 5 mg/mL'de yüksek indirgeme gücüne sahip olduğunu göstermektedir. *G. lucidum* ve *P. linteus*'tan elde edilen polisakkarit ekstraktları, özellikle düşük EC_{50} değerlerinde (<0.1 mg/mL) çok iyi DPPH süpürücü aktivite göstermiştir. Ancak EC_{50} değerleri için önemli bir fark bulunmamıştır (Kozarski vd. 2011).

P. rimosus, *P. wahlbergii* ve *P. nigricans*'ın su, etanol ve alkaloid ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin DPPH ve FRAP testi kullanılarak değerlendirildiği çalışmada DPPH sonuçları (EC_{50}) sırasıyla *P. rimosus* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 20.12, 8.26, 94.15; *P. wahlbergii* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 72.90, 9.64, 81.11; *P. nigricans* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 22.52, 7.03, 34.49 olarak belirlenmiştir. FRAP sonuçları (Fe II mmol/mg) sırasıyla *P. rimosus* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 0.11, 0.33, 0.13; *P. wahlbergii* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 0.06, 0.28, 0.16; *P. nigricans* su, etanol ve alkaloid ekstraktları için 0.07, 0.28, 0.16 olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite *P. nigricans* etanol ekstraktında gözlenmiştir. Bunu sırasıyla *P. rimosus* ve *P. wahlbergii* izlemiştir. Bununla birlikte *P. nigricans*'ın etanol ekstraktının EC_{50} 'si, *P. rimosus* ve *P. wahlbergii*'den önemli ölçüde farklı bulunmamıştır. Elde edilen veriler. *Phellinus* türlerinin aktif antioksidan bileşenlerinin olduğunu göstermiştir (Laovachirasuwan vd. 2016).

P. linteus'un (PL) etanol ekstraktının, 10 ila 300 μ g/mL konsantrasyon aralığında doğrudan DPPH radikalini süpürdüğü belirlenmiştir. PL'nin EC_{50} değeri 22.07 μ g/mL, pozitif kontrol olarak kullanılan Vitamin C'ninki ise 5.11 μ g/mL olarak hesaplanmıştır. *P. linteus*'un etanol ekstraktının 300 μ g/mL konsantrasyonunda ürik asit oluşumu tamamen baskıladığı ortaya koyulmuştur. IC_{50} konsantrasyonu 146.80 μ g/mL olarak bulunurken bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol, 5.15 g/mL'lik bir IC_{50} değeri göstermiştir. Elde edilen veriler *P. linteus*'un etanol ekstraktının ksantin oksidaz enziminin inhibitör aktivitelerine sahip olduğunu açıkça göstermiştir (Song vd. .2003).

P. igniarius'tan elde edilen kurutulmuş misel içeren (MEM) ve misel içermeyen (MEB) metanol ekstraktı ile *P. igniarius* su ekstraktının (HWEM) antioksidan

aktiviteleri, konsantrasyonları ile pozitif korelasyon göstermiştir. MEM ve MEB, HWEM'den daha yüksek antioksidan etki sergilemiştir. 5 mg/mL'de antioksidan aktiviteler MEM ve MEB için %62.3 ve %51.2 iken, HWEM için %28.2 olarak belirlenmiştir. BHA ve α -tokoferol, 1 mg/mL'de sırasıyla %94.9 ve %98.1'lik antioksidan etki göstermiştir, ancak askorbik asit, %38'lik bir aktivite göstermiştir. MEM, MEB ve HWEM'in DPPH radikalleri üzerindeki süpürme yeteneklerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığını belirlenmiştir. 5 mg/mL'de, süpürme yetenekleri MEM, MEB ve HWEM için sırasıyla %72.2, %21.1 ve %24.2 idi. 10 mg/mL'de, süpürme yetenekleri MEM, MEB ve HWEM için sırasıyla %80.1, %30 ve %43.1 idi. Bununla birlikte, 0,5 mg/mL'de BHA ve α -tokoferolün oldukça yüksek süpürme yetenekleri sırasıyla %93.7 ve %97.4 idi. Ek olarak, askorbik asit, 0,5 mg/mL'de %6,2'lik daha düşük süpürme kabiliyeti ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, ekstraktların, muhtemelen birincil antioksidanlar olarak hareket eden serbest radikal süpürücüler olduğunu göstermiştir. MEM, MEB ve HWEM'in şelatlama yetenekleri 5 ila 20 mg/mL'de sırasıyla %60.3 ila %83.2, %79.1 ila %86.5, %44.6 ve %87.4 idi. 5 ila 20 mg/mL aralığında, 3 ekstraktın demir iyonları üzerindeki şelatlama yetenekleri, MEB > MEM > HWEM olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, *P. igniarius* (su) kültüründen elde edilen ekstraktların, belirgin bir şelatlayıcı demir kapasitesi olduğunu göstermektedir. MEM, MEB ve HWEM'in süpürme yetenekleri, bir doza bağlı bir değişim göstermiştir. 100 ila 500 μ g/mL'de, MEM, MEB ve HWEM'in süperoksit anyonları üzerindeki süpürme yetenekleri sırasıyla %17.5 ila %42.3, %6.2 ila %25.2 ve %18.6 ila %45.6 idi. Bununla birlikte, askorbik asidin süpürme kabiliyeti 100 ila 500 μ g/mL'de %38.6 ila %48.6 idi. Elde edilen veriler, MEM ve HWEM'in orta düzeyde süperoksit radikal süpürme aktiviteleri gösterdiğini, ancak MEB'nin süpürme aktivitesinde en düşük olduğunu ortaya koymuştur (Lung vd. 2010).

P. igniarius'tan elde edilen PSeP için, düşük konsantrasyonlarda ROS süpürme yeteneği düşük bulunmuştur. HaCaT hücrelerinin H_2O_2 tarafından 30 dakika süre ile indüklenmesinden sonra, HaCaT hücrelerinin ROS seviyesi, normal hücrelere kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, konsantrasyon 300 μ g/mL'ye yükseldiğinde, ROS seviyeleri ile normal hücreler arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Doz artışıyla pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Bu nedenle, PSeP, HaCaT hücrelerinde ROS üzerinde iyi bir süpürücü etkiye sahip olarak bulunmuştur. ABTS süpürme testi, PSeP'nin doza bağlı süpürme aktivitesini ortaya koymuştur. Süpürme aktivitesi C vitamininden çok düşük olmasına rağmen, ROS seviyesinde istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle, PSeP'nin serbest radikal süpürücü aktivitesi, H_2O_2 'yi doğrudan etkilememiştir. Tüm gruptaki aktif GPx, yara iyileşme süresinin artmasıyla artmıştır. PSeP, model grubundan daha yüksek GPx seviyesi ile sonuçlanan organik selenyum içermektedir. Normal dokularda bile yara iyileşmesinin geç evresinde model grubunkinden çok daha fazla bulunmuştur ($p < 0.01$). CAT ve SOD aktivitesi polisakkaritlerin eklenmesiyle önemli ölçüde değişmemiştir ($p > 0.05$). PSeP'nin antioksidan kapasitesi inflamasyonu azaltmaya yardımcı olduğundan, iki enzimin aktivitesi düşük ve orta doz gruplarında 6, 12 ve 18 günde değişen derecelerde artış göstermiştir (Luo vd. 2021).

DPPH radikaline yönelik standartları içeren numunelerin süpürücü aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada, *P. igniarius*'un su, %50 etil alkol, %80 etil alkol, etil alkol ve etil asetat ekstraktlarının radikal süpürücü aktiviteleri (IC_{50} , μ g/mL) sırasıyla, 332.85, 159.19, 122.76, 58.10, 154.50 olarak bulunmuştur. *P. torulosus*'un su, %50 etil alkol, %80 etil alkol, etil alkol ve etil asetat ekstraktlarının radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla, 134.27,

18.88, 7.30, 19.23, 49.57 olarak bulunmuştur. *P. torulosus*'un %80 etil alkol ekstraktı, (7.30 µg/mL) IC₅₀'si, DPPH radikaline karşı en yüksek süpürme kabiliyetini göstermiştir. Bu aktivite, kuersetin kadar iyi bir etki göstermiştir. Ayrıca askorbik asit ve BHT aktivitesinden önemli ölçüde daha yüksektir. Bu sonuçlar, *Phellinus* funguslarından elde edilen ekstraktların doğal antioksidan kaynağı olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Seephonkai vd. 2011).

P. linteus (PL), *Cordyceps sinensis* (CS), *Lentinus edoides* (LE), *Coprinus camatus* (CC) ve *Ganoderma lucidum* (GL)'un metanol ekstraktının antioksidan potansiyeli, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin yanı sıra serbest radikal süpürme aktiviteleri belirlenerek değerlendirilmiştir. En yüksek fenolik ve flavonoid içeriği PL'de bulunmuştur ve bu ekstrakt, test edilen diğer ekstraktlardan önemli ölçüde daha yüksek bileşik içeriğine sahiptir. PL'nin DPPH radikal süpürme kapasitesi (5.32 µg/mL), diğer dört numunenin kapasitesinden ve hatta kontrol maddeleri BHA ve klorojenik asitten bile önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. LE, CC ve CS en düşük temizleme kapasitesini göstermiştir. 24 saatlik uygulama sonrasında HCT-116 ve SW-480 hücrelerinde GSH seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, •O₂ üretimi her iki hücre dizisinde önemli ölçüde artmıştır. HCT-116 üzerindeki en yüksek •O₂ üretimine LE ve CS ekstraktları ve SW-480 hücrelerinde PL ekstraktları neden olmuştur. •O₂-seviyesi, SW-480 hücrelerinde CS ve LE ile inkübasyon haricinde, ekstraktların dozlarıyla ters orantılı bulunmuştur. Bu sonuçlar, fungus ekstraktlarının HCT-116 ve SW-480 kanser hücre dizilerinde prooksidan etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Seklic vd. 2016).

P. igniarius ve *P. linteus*'tan elde edilen su ekstraktlarının fenol ve flavonoid içeriklerinin belirlendiği çalışmada, *P. igniarius* su ekstraktında fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin seviyeleri *P. linteus* su ekstraktından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Ek olarak, *P. igniarius* su ekstraktının fenolik ve flavonoid içeriği *P. linteus* su ekstraktından ~1.5 kat daha yüksektir ve *P. igniarius* su ekstraktının da polisakkarit içeriği, *P. linteus* su ekstraktında gözlemlenenden ~2 kat daha yüksektir. Buna karşılık *P. linteus* su ekstraktının, *P. igniarius* su ekstraktından yaklaşık 1.2 kat daha yüksek β-1,3-glukan içerdiği belirlenmiştir (p<0.05). Bu sonuçlar *P. igniarius* su ekstraktının *P. linteus* su ekstraktından 1.7 kat daha yüksek SOD-benzeri aktiviteye (p<0.05) sahip olduğunu ortaya koymuştur (Yang vd. 2016).

PIPS (*P. igniarius* polisakkariti)'in hidroksil radikal süpürücü etkisi, c-PIPS (ultasonik olarak uyarılmış *P. igniarius* polisakkariti) ve Vc (C vitamini) ile karşılaştırılarak değerlendirilen bir çalışmada tüm örneklerin doza bağlı bir şekilde hidroksil radikallerini süpürme kabiliyetine sahip olduğu bulunmuştur. PIPS'nin temizleme kapasitesi, test edilen konsantrasyon aralığında (0.05–1.5 mg/mL) c-PIPS'den daha güçlüdür. PIPS'nin hidroksil radikali süpürme etkisi Vc'den çok daha düşüktür. Bu çalışmada, daha yüksek miktarlarda düşük moleküler ağırlığa ve hidroksil gruplarına sahip PIPS, c-PIPS'den daha güçlü bir hidroksil radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. Ayrıca polisakkarit yapısında bulunan teukronik asit de hidroksil radikallerinin süpürülmesinde önemli rol oynamıştır. Bu nedenle, ultrasonik uyarım sadece *P. igniarius* miselyum fermentasyonu sırasında polisakkaritlerin üretimini iyileştirmekle kalmamıştır, aynı zamanda polisakkaritlerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri ve radikal süpürme kapasitelerini de arttırmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak *P. igniarius* ve *P. igniarius* kaynaklı polisakkaritler, gıda ve ilaç endüstrisi için etkili bir doğal antioksidan olarak geliştirilebilir (Zhang vd. 2014).

P. linteus, *P. nigricans* ve *P. igniarius* etanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerinin belirlendiği çalışmada, etanol ekstraktları tüm deneylerde su ekstraktlarından önemli ölçüde daha yüksek aktivite göstermiştir. DPPH testinde, *P. linteus*'un etanol ekstraktı, su ekstraktına kıyasla en yüksek antioksidan etkiyi göstermiştir. *P. linteus* ve *P. nigricans*'tan elde edilen etanol ekstraktları, sırasıyla 14.06 µg/mL ve 15.41 µg/mL değerleri ile ABTS testinde en yüksek antioksidan etkiyi gösterirken, *P. igniarius* etanol ekstraktı 18.4 µg/mL değeri ile ABTS radikallerine yanıt olarak orta düzeyde antioksidan etki sergilemiştir. FRAP testinde, *P. linteus* ve *P. igniarius*'tan elde edilen etanol ekstraktı en yüksek antioksidan etkiyi sergilerken, her iki fungustan elde edilen *Phellinus* ekstraktları sırasıyla en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğini göstermiştir. En yüksek toplam fenolik içeriği, *P. linteus*'un etanol ekstraktında (184.80 mg GAE/g) gözlenirken, *P. igniarius*'tan elde edilen etanol ekstraktı, en yüksek toplam flavonoid içeriğini (353.30 RE/g) göstermiştir (Thammavong vd. 2021).

P. torulosus, *P. allardii*, *P. fastuosus*, *P. sanfordii* ve *Inonotus pachyphloeus* gibi bazı tıbbi fungusların etanol ekstraktlarının antioksidan potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada, DPPH, hidroksil radikalleri, süperoksit radikallerini süpürücü potansiyelleri ve indirgeme gücü *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Fungus ekstraktlarının serbest süpürücü aktivitesi, *P. fastuosus* > *P. sanfordii* > *I. pachyphloeus* > *P. torulosus* > *P. allardii* olarak belirlenmiştir. *P. fastuosus* ve *P. sanfordii* ekstraktları, istatistiksel olarak birbirleri ile ve standart kateşin ile karşılaştırılabilir derecede DPPH ve süperoksit radikal süpürücü aktiviteleri sergilemiştir. *P. fastuosus* ekstraktı (EC₅₀: 16 µg/mL), en önemli hidroksil radikal süpürme aktivitesini standarttan bile daha yüksek göstermiştir. *P. torulosus* ekstraktı (EC₅₀: 320 µg/mL), indirgenmiş glutatyon formuyla karşılaştırılabilir istatistiksel olarak en önemli indirgeme gücünü sergilemiştir. Test edilen fungus ekstraktlarının kayda değer miktarda karbonhidrat, fenol ve protein içerdiği bulunmuştur. Serbest radikal süpürücü aktivitesi, fenol içerikleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu tıbbi funguslar doğal antioksidanlardır ve detaylı çalışmalardan sonra nutrasötik ilaçlara dahil edilebilirler (Azeem vd. 2020).

P. igniarius, *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının H₂O₂ sitotoksitesine karşı antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için A431 ve Bj hücre dizileri IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ konsantrasyonunda ekstraktlar ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu hücrelerde *P. igniarius* ve *P. torulosus*'un her iki ekstraktının da H₂O₂ sitotoksitesine karşı antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. A431 ve Bj hücrelerinde *P. igniarius*, *P. torulosus* metanol ekstraktları için hem IC₅₀ hem de IC₇₀ H₂O₂ konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC₂₀ kombinasyonunda görülmüştür. *P. igniarius*, *P. torulosus* su ekstraktları için hem IC₅₀ hem de IC₇₀ H₂O₂ konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC₃₀ kombinasyonunda görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ekstraktların yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiğini, IC₅₀ değerinden daha düşük konsantrasyonlarda ise H₂O₂ sitotoksitesine karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Hücresel redoks dengesinin değişmesine sebep olan antioksidanların azalması sonucunda ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) aşırı üretimiyle ifade edilen oksidatif stres, lipidlere, proteinlere ya da DNA'ya zarar verebilir. Funguslardan izole edilen bu sekonder metabolitler, antioksidan etki gösterebilir. Bir veya daha fazla aromatik halka ya da OH grubu barındıran fenolik bileşikler, metabolizma esnasında meydana gelen ROS

oluşumunu azaltıp antioksidan savunma mekanizmalarını uyararak antioksidan etki göstermektedir.

Oksidatif stres sonucu hücre membranlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonu ile oluşan MDA düzeyleri membran hasarı ölçümü için bir marker olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda membran hasarını ortaya koymak için hücreler tek başına H_2O_2 (IC_{50} ve IC_{70}) ve ekstrakt konsantrasyonlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılarak MDA düzeyleri ölçülmüştür. Tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 47 ve 51.7 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir. Tek başına IC_{50} konsantrasyonlarında *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 30.8 ve 28 kat MDA düzey artışı belirlenirken, IC_{70} konsantrasyonlarında *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 43.3 ve 42.2 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir. Sağlıklı hücre grubu olan Bj hücrelerine *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının tek başına IC_{50} konsantrasyonlarında uygulanması ile birlikte hücrelerde kontrol grubuna göre sırasıyla 19.1 ve 17.2 kat MDA artışı gözlenmiştir. *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının IC_{70} konsantrasyonunda Bj hücrelerine uygulanmasıyla kontrol grubuna göre sırasıyla 27.5 ve 24.2 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir.

Ekstraktların güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'nin yarattığı oksidatif strese karşı antioksidan etkisini ortaya koymak için hücreler düşük konsantrasyonlarda ekstraktlar ile ön inkübasyona bırakılmıştır, sonrasında 24 saat IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 ile inkübe edilmiştir ve MDA düzeylerindeki değişim belirlenmiştir.

Tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 33.3 ve 38.9 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir. Tek başına IC_{50} konsantrasyonlarında *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 31 ve 28.7 kat MDA düzey artışı belirlenirken, IC_{70} konsantrasyonlarında *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılan A431 hücrelerinde ise kontrol grubuna göre sırasıyla 33 ve 31.7 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir. Sağlıklı hücre grubu olan Bj hücrelerine *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının tek başına IC_{50} konsantrasyonlarında uygulanması ile birlikte hücrelerde kontrol grubuna göre sırasıyla 16.8 ve 15.9 kat MDA düzey artışı gözlenmiştir. *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının IC_{70} konsantrasyonunda Bj hücrelerine uygulanması ile kontrol grubuna göre sırasıyla 20.9 ve 19.5 kat MDA düzey artışı belirlenmiştir.

Ekstraktların H_2O_2 'in yarattığı oksidatif strese karşı antioksidan etkisini ortaya koymak için, hücreler düşük konsantrasyonlarda ekstraktlar ile ön inkübasyona maruz bırakılmıştır ve sonrasında 24 saat H_2O_2 ile muamale edilmiştir. A431 ve Bj hücrelerinde MDA düzeylerinin tek başına H_2O_2 uygulamasına göre (IC_{50} ve IC_{70}) azaldığı görülmüştür.

İlk olarak düşük konsantrasyonlarda ekstraktlara ardından H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde, *P. igniarius*, *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının antioksidan bir madde gibi davranıp hücreleri membran degradasyonuna karşı koruduğu, yüksek konsantrasyonlarda tek başına ekstraktlara maruz bırakıldığında ise MDA miktarının artmasıyla prooksidan bir madde özelliği sergilediği görülmektedir.

Hücrelerin sitoplazmasında bulunan ve H_2O_2 'in yarattığı oksidatif strese karşı hücreleri koruyan GPx, elektron kaynağı olarak GSH kullanarak H_2O_2 'yi metabolize etmektedir. Tek başına *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 12.4 ve 17.6 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 9 ve 10 kat daha fazla bulunmuştur. *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 8.4 ve 9 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 7.4 ve 8.6 kat daha fazla bulunmuştur.

Bj hücreleri *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 5.1 ve 11 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 4.53 ve 6 kat daha fazla bulunmuştur. *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 5.2 ve 10.1 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC_{50} ve IC_{70} için sırasıyla 5.6 ve 4 kat daha fazla bulunmuştur.

Tek başına IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e maruz bırakılan A431 hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 16 ve 27.2 oranında GPx düzeyinde artış görülmüştür. Bj hücrelerinde ise bu oranlar (IC_{50} ve IC_{70} için) sırasıyla 17.33 ve 21.6 olarak belirlenmiştir.

P. igniarius uygulanan A431 hücrelerinde $IC_{50} H_2O_2$ ve $IC_{70} H_2O_2$ 'e göre sırasıyla $IC_{50} H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 2 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 2.6 kat, $IC_{50} H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su kombinasyonunda 4 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su kombinasyonunda 12.4 kat GPx düzeyinde azalma meydana gelmiştir. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise $IC_{50} H_2O_2$ ve $IC_{70} H_2O_2$ 'e göre sırasıyla $IC_{50} H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 4.1 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{20}$ *P. igniarius* metanol kombinasyonunda 4.6 kat, $IC_{50} H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su kombinasyonunda 5 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{30}$ *P. igniarius* su kombinasyonunda 3.35 kat GPx düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür.

P. torulosus uygulanan A431 hücrelerinde $IC_{50} H_2O_2$ ve $IC_{70} H_2O_2$ 'e göre sırasıyla $IC_{50} H_2O_2+IC_{20}$ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 2.3 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{20}$ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 3.4 kat, $IC_{50} H_2O_2+IC_{30}$ *P. torulosus* su kombinasyonunda 5.3 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{30}$ *P. torulosus* su kombinasyonunda 7.55 kat GPx düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise $IC_{50} H_2O_2$ ve $IC_{70} H_2O_2$ 'e göre sırasıyla $IC_{50} H_2O_2+IC_{20}$ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 4.2 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{20}$ *P. torulosus* metanol kombinasyonunda 6.5 kat, $IC_{50} H_2O_2+IC_{30}$ *P. torulosus* su kombinasyonunda 5.7 kat, $IC_{70} H_2O_2+IC_{30}$ *P. torulosus* su kombinasyonunda 7.4 kat GPx düzeylerinde azalma meydana gelmiştir.

IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına 24 saat maruz bırakılan hücre dizilerinde GPx aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı, yüksek konsantrasyonlarda prooksidan, düşük konsantrasyonlarda ise antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. İki hücre dizisinde de en yüksek GPx aktivitesi IC_{70} konsantrasyonunun uygulanması sonucunda görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada *P. rimosus*'un etil asetat ekstraktının, riboflavinin fotoindirgenmesiyle üretilen bir süperoksit süpürücüsü olduğu bulunmuştur ve önemli derecede süperoksit inhibe edici aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Üretilen süperoksit anyonunu, 22.1 µg/mL (IC₅₀) konsantrasyonundaki ekstraktları inhibe etmiştir. Fe⁺³ - askorbat-EDTA-H₂O₂ sisteminden üretilen hidroksil radikali tarafından deoksiribozun Tiyobarbütirik asite bozunması, *P. rimosus*'un etil asetat ekstraktı ile belirgin şekilde azaltılmıştır. IC₅₀ konsantrasyonu 68 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu, ekstraktın hidroksil radikali süpürme aktivitesini göstermektedir. Sodyum nitroprussid çözeltilerinin fosfat tamponlu salin içinde 25°C'de 150 dakika inkübe edilmesi nitrik oksit oluşumuyla sonuçlanmıştır. *P. rimosus* etil asetat ekstraktı, nitrik oksit radikallerinin oluşumunu etkili bir şekilde azaltmıştır. Bu, ekstraktın belirgin bir nitrik oksit süpürme aktivitesi olduğunu göstermektedir. IC₅₀ konsantrasyonu 438 µg/mL olarak bulunmuştur (Ajith vd. 2002). Çalışmamızda IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktı kombinasyonlarının A431 hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen MDA seviyesi ölçüm verileri sırasıyla 1.3 nM/mg protein ve 2.14 nM/mg protein olarak belirlenirken, IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* ve *P. torulosus* su ekstraktı kombinasyonunun A431 hücrelerine uygulanması sonucunda 1.2 nM/mg protein ve 2.4 nM/mg protein olarak belirlenmiştir. Sağlıklı Bj hücrelerine IC₅₀ H₂O₂+IC₂₀ *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanması sonucunda sırasıyla 1.5 nM/mg protein ve 2.48 nM/mg protein; IC₅₀ H₂O₂+IC₃₀ *P. igniarius* ve *P. torulosus* su ekstraktı uygulanması sonucunda 1.31 nM/mg protein ve 2.23 nM/mg protein olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak A431 ve Bj hücrelerinde *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının düşük konsantrasyonlarının H₂O₂ muamelesi öncesinde uygulanması tek başına IC₅₀ H₂O₂ uygulamasına göre MDA oluşumunu azalttığı belirlenmiştir.

Sıçanlarla gerçekleştirilen bir çalışmada ağaçta yaşayan bir fungus olan *P. rimosus*'un, etil asetat ekstraktının sıçan karaciğer homojenatında Fe²⁺/askorbat kaynaklı lipid peroksidasyonunu önlediği görülmüştür. MDA oluşumunun *P. rimosus* etil asetat ekstraktı tarafından engellendiği belirlenmiştir (IC₅₀, 162 µg/ml). Elde edilen sonuç, *P. rimosus* etil asetat ekstraktının önemli derecede *in vitro* antioksidan aktivite sergilediğini göstermiştir (Ajith vd. 2002). *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının IC₅₀ konsantrasyonlarında A431 ve Bj hücre dizilerine uygulanması sonucunda MDA seviyeleri belirlenmiştir. Her iki hücre dizisinde de IC₅₀ konsantrasyonlarında *P. igniarius* ve *P. torulosus* su ekstraktlarının metanol ekstraktlarına göre MDA oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (A431 hücrelerinde *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla IC₅₀ değerleri: 100 µg/mL ve 188.2 µg/mL; *P. torulosus* metanol ve su ekstraktı sırasıyla IC₅₀ değerleri 140 µg/mL ve 200 µg/mL; Bj hücrelerinde *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla IC₅₀ değerleri: 295 µg/mL ve 350 µg/mL; *P. torulosus* metanol ve su ekstraktı sırasıyla IC₅₀ değerleri 216.6 µg/mL ve 241.7 µg/mL).

P. linteus'tan elde edilen inotilon'un fareler üzerinde MDA düzeylerinde meydana getirdiği değişimlerin incelendiği çalışmada, farelerde Carr pençe enjeksiyonu sonrasındaki 5. saatte ödemli pençede MDA düzeyinin anlamlı şekilde yükseldiği belirlenmiştir. 5 mg/kg inotilon ve 10 mg/kg indometasin uygulaması ile birlikte MDA düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Carr grubu ile karşılaştırıldığında LPS ile inhibe edilen farelerinin MDA düzeyleri sırasıyla 18.3, 39.7 ve 43.3 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada inotilon tedavisi ile MDA düzeyinde anlamlı düşüşler meydana gelirken, CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde anlamlı artışlar meydana gelmiştir. MDA üretiminin baskılanması muhtemelen CAT, SOD ve GPx aktivitelerindeki artıştan

kaynaklanmaktadır (Huang vd. 2017). A431 hücrelerine uygulanan *P. igniarius* su ekstraktı *P. igniarius* metanol ekstraktına göre MDA seviyesini 10.8 kat azaltırken, Bj hücrelerinde su ekstraktı metanol ekstraktına göre 11.1 kat MDA seviyesini azaltmıştır. *P. torulosus* su ekstraktı uygulanan A431 hücrelerinde MDA seviyesi *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelere kıyasla 10 kat azalmıştır. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise *P. torulosus* su ekstraktı metanol ekstraktına oranla MDA seviyesini 10.5 kat azaltmıştır. A431 hücrelerine uygulanan *P. igniarius* su ekstraktı *P. igniarius* metanol ekstraktına göre GPx seviyesini 1.37 kat azaltırken, Bj hücrelerinde su ekstraktı metanol ekstraktına göre 1.12 kat GPx seviyesini azaltmıştır. *P. torulosus* su ekstraktı uygulanan A431 hücrelerinde GPx seviyesi *P. torulosus* metanol ekstraktı uygulanan hücrelere kıyasla 1.1 kat azalmıştır. Sağlıklı Bj hücrelerinde ise *P. torulosus* metanol ekstraktı su ekstraktına oranla GPx seviyesini 0.92 kat azaltmıştır. Tek başına *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan A431 hücrelerinin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 12.4 ve 17.6 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 9 ve 10 kat daha fazla bulunmuştur. Bj hücreleri *P. igniarius*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. igniarius* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.1 ve 11 kat daha fazla bulunurken, *P. igniarius* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 4.53 ve 6 kat daha fazla bulunmuştur. Tek başına *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılan A431 hücrelerimizin GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 8.4 ve 9 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 7.4 ve 8.6 kat daha fazla bulunmuştur. Bj hücreleri *P. torulosus*'un metanol ve su ekstraktlarına (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakıldığında GPx düzeyleri kontrol grubuna göre *P. torulosus* metanol IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.2 ve 10.1 kat daha fazla bulunurken, *P. torulosus* su IC₅₀ ve IC₇₀ için sırasıyla 5.6 ve 4 kat daha fazla bulunmuştur.

Çalışmamızda ekstrakt uygulamaları sonucunda kontrol grubuna oranla MDA düzeylerinde önemli derecede azalmalar meydana gelmiştir. GPx aktivitelerinde ise önemli derecede artış olmuştur.

P. linteus'tan elde edilen PL-ES ve PL-I-ES tarafından uygulanan oksidatif stresin şiddetini değerlendirmek için LPO testi kullanılmıştır. PC-3, DU-145, LNCaP, T24, ACHN, A549, MCF-7, AGS, HepG2, U87 kanser hücrelerinin tümü 24 saat boyunca 100 µg/mL PL-ES veya 250 µg/mL PL-I-ES ile muamele edilmiş ve oluşan MDA miktarı belirlenmiştir. PL-ES (100 µg/mL), kontrol grubuna kıyasla tüm kanser hücrelerinde 1.8-2.7 kat daha fazla MDA miktarında artışına neden olmuştur. PL-I-ES (250 µg/mL), yedi kanser hücrelerinde MDA oluşumunda 1.5 ila 2.5 kat artış göstermiş, ancak üç kanser hücresi (DU-145, LNCaP, ACHN) üzerinde çok az etkisi olmuştur. Sonuç olarak, PL-ES ve PL-I-ES tarafından oksidatif stresin indüklendiğini bunun da MDA düzeyini arttırdığını belirtmişlerdir (Konno vd. 2015). 24 saat *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının 100-350 µg/mL konsantrasyonlarına maruz bırakılan A431 ve Bj hücrelerinde önemli ölçüde MDA miktarında artış gözlenirken, *P. igniarius* metanol ve su ekstraktlarının 140-241.7 µg/mL konsantrasyonlarına maruz bırakılan A431 ve Bj hücrelerinde önemli ölçüde MDA miktarında artış gözlenmiştir.

Deney modeli olarak sıçanların kullanıldığı ve Elisa testi ile MDA içeriğinin belirlenmesi amaçlanan çalışmada, *P. igniarius*'tan elde edilen P-Sep'in 7. günde, yara iyileşme süresindeki artışla birlikte tüm gruplarda MDA düzeyinin azaldığı belirlenmiştir.

Ancak düşük ve orta doz gruplarındaki MDA içeriği model grubuna göre daha düşük bulunmuştur ve 18. günde normal seviyeye ulaşmıştır. Miyeloperoksidaz (MPO), sabit içeriği %5 olan n6trofil spesifik bir enzimdir ve inflamatuvar infiltrasyon derecesini yansıtabilir. Düşük ve orta doz gruplarındaki MPO içeriği, model grubundakinden önemli ölçüde düşük bulunmuştur. İlginç bir şekilde antioksidan sonuçları yüksek dozlardaki PSeP'nin yara iyileşmesini desteklemediğini göstermiştir (Luo vd. 2021).

Aynı değerlendirmeler A431 ve Bj hücre dizileri üzerinde gerçekteştirildiğinde *Phellinus* cinsine ait ekstraktlarımızın düşük konsantrasyonlarda antioksidan, yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. H₂O₂ uygulaması öncesinde antioksidan konsantrasyonlarındaki ekstraktlar ile ön inkübasyona bırakılan hücrelerde MDA ve GPx seviyesinin azalması, yüksek konsantrasyonlarda ise bu seviyelerin artması *Phellinus* fungus ekstraktlarının doğal bir antioksidan kaynağı olma potansiyeline sahip olduğunun göstergesidir.

Çalışmamızda kullandığımız *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücreleri üzerine antioksidan ve prooksidan aktivitesi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Her iki hücre dizisi farklı konsantrasyonlarda ekstraktlara maruz bırakılmıştır ve sitotoksik etkinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Güçlü bir oksitleyici ajan olan H₂O₂'nin IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarına karşı *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının düşük konsantrasyonlarda (<IC₅₀) antioksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler MDA ve GPx aktivitelerinin belirlenmesi ile desteklenmiştir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada *P. igniarius* ve *P. torulosus*'tan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının A431 ve Bj hücreleri üzerindeki 24 saatlik antioksidan ve prooksidan etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların her iki hücre dizisinde de sitotoksik etkiyi konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için A431 ve Bj hücre dizilerinin güçlü bir oksitleyici ajan olan H₂O₂ ile inkübe edilmeden önce düşük konsantrasyonlarda *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarına maruz bırakılmıştır. Böylelikle ekstraktların oksidatif hasara karşı antioksidan etkileri araştırılmıştır. Aynı yöntemle membran hasarı sonucu ortaya çıkan MDA miktarı ve GPx aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. *P. igniarius* ve *P. torulosus* metanol ve su ekstraktlarının antioksidan mekanizma üzerine etkileri ortaya koyulmuştur. Elde edilen veriler sonucunda *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarda prooksidan, düşük konsantrasyonlarda ise antioksidan bir madde gibi davrandığı belirlenmiştir.

P. igniarius ve *P. torulosus* ekstraktlarının *in vitro* testler ile prooksidan ve antioksidan özelliklerinin ortaya koyulması *Phellinus* cinsine ait funguslardan yeni ilaçların üretilmesine katkı sağlayacaktır. *P. igniarius* ve *P. torulosus* ekstraktları A431 epidermoid karsinoma hücrelerinde sitotoksik etkiye ve membran hasarı oluşumuna neden olmasından dolayı yeni antikanser ilaçlarının üretimi için doğal kaynak potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca literatür incelemeleri sonucunda *P. igniarius* ve *P. torulosus*'tan elde edilen metanol ve su ekstraktlarının kanser (A431) ve sağlıklı fibroblast (Bj) hücre dizileri üzerindeki antioksidan ve prooksidan etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın yeni kanser tedavi stratejilerinin belirlenmesi konusunda yol gösterici olacağına inanmaktayız.

7. KAYNAKLAR

- Acer, E. ve Kaya Erdoğan, H. 2019. Sık görülen deri kanserlerinin epidemiyolojisi. *Eskişehir Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Halk Sağlığı Dergisi*, 4, 52-60.
- Ajith, A.T. and Janardhanan, K.K. 2007. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr*, 40 (3): 157-162.
- Ajith, T.A and Janardhanan, K.K. 2002. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol*, 81 (3): 387-91.
- Ajuwon, O., Marnewick, J. and Davids, L. 2015. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and its major flavonoids potential against oxidative stress-induced conditions, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. Intech Open Book Series, Open, fast, peer-reviewed 10.5772/61614. <https://www.intechopen.com/chapters/49269>.
- Akgün, Y. 2021. Birinci basamak sağlık kuruluşlarına başvuran yetişkinlerin deri kanseri hakkında bilgi düzeyleri ve güneş ışınlarından korunma durumları. Uzmanlık tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Hatay, 100s.
- Akturan, S., Gümüş, B., Özer, Ö., Balandız, H. ve Erenler, A.K. 2019. TÜİK verilerine göre Türkiye'de 2009 ve 2016 yılları arasındaki ölüm oranları ve nedenleri. *Konuralp Tıp Dergisi*, 11 (1): 9-16.
- Alam, M.D.N., Bristi, N.J. and Rafiquzzaman, M.D. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-52.
- Altınar, A., Atalay, H. ve Bilal, T. 2018. Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7 (1): 51-55.
- American Cancer Society. 2021. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf> [Son erişim tarihi: 22.12.2021].
- Anonim 1. <https://images.app.goo.gl/jDccUFe6TF8euKwU6> [Son erişim tarihi: 06.09.2021].
- Anonim 2. <https://www.adilmedya.com/wp-content/uploads/%C5%9Famanizim-1024x628.jpg> [Son erişim tarihi: 05.09.2021].
- Anonim3. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Son erişim tarihi: 22.12.2021].
- Anonim 4. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars> [Son erişim tarihi: 08.08.2021].
- Anonim 5. <https://ultimate-mushroom.com/poisonous/175-phellinus-igniarius.html> [Son erişim tarihi: 22.12.2021].
- Anonymous1. https://en.wikipedia.org/wiki/Fuscoporia_torulosa [Son erişim tarihi: 22.12.2021].

- Anonymous2. https://www.elabscience.com/pglutathione_peroxidase_gsh_px_activity_assay_kit-40393.html [Son erişim tarihi: 22.12.2021].
- Anonymous 3. www.ibm.com/tr-tr/products/spss-statistics.
- Anonymous 4. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> [Son erişim tarihi: 22.12.2021].
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş. ve Yılmaz, B. 2019. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü süperoksit dismutaz (Sod), katalaz (Cat) ve glutatyon peroksidaz (Gpx). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26 (3): 362 -369.
- Azeem, U., Shri, R. and Dhingra, G.S. 2020. *In vitro* antioxidant efficacy of some selected medicinal mushrooms from India. *Int J Med Mushrooms*, 22 (7): 641-649.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J, Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S. and Pruess, H.G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148 (2-3): 187-197.
- Bal, C. 2020. Anti-oxidative and antimicrobial activities of *Phellinus igniarius* and *Phellinus rimosus*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29 (5): 3428-3432.
- Bal, C., Sevindik, M., Akgul, H. and Selamoglu Z. 2019. Oxidative stress index and antioxidant capacity of *Lepistanuda* collected from Gaziantep/Turkey. *Sigma*, 37 (1):1-5.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248.
- Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., Ponsoda, X. and Bort, R. 1997. The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 13 (4-5): 331-338.
- Chen, H., Tian, T., Miao, H. and Zhao, Y.Y. 2016. Traditional uses, fermentation, phytochemistry and pharmacology of *Phellinus linteus*: a review. *Fitoterapia*, 113 (9): 6-26.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C. and Mecocci, C: 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 39: 841 – 852.
- Çaylak, E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1): 73-83.
- Dong, Y., Qiu, P., Zhu, R., Zhao, L., Zhang, P., Wang, Y., Li, C., Chai, K., Shou, D. and Zhao, H. 2019. A combined phytochemistry and network pharmacology approach to reveal the potential antitumor effective substances and mechanism of *Phellinus igniarius*. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 266.
- Elsayed, E.A., Enshasy, H., Wadaan, M.A. and Aziz, R. 2014. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators Inflamm*, Article ID 805841.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11: 81-128.
- Giles, G.I. 2006. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 12: 4427-4443.
- Guo, J., Liu, C., Zhang, C., Wang, J., Wang, S., Liu, X., Gao, X. and Wu, X. 2019. Nitrous acid and diethyl sulfate, as chemical mutagenic agents, to improve the biomass, metabolites, enzyme activity, and antioxidant activity of wild *Phellinus igniarius*. *Food Science and Technology Research*, 25: (3) 459-466.
- Habif, S., Turgan, N., Mutaf, I. et al: 1997. Plasma catalase, glutathione peroxidase and selenium levels in adult diabetic patients. *Tr J Med Sci*, 27:139-141.
- Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts 1. *The FASEB Journal*, 1(5), 358-364.
- Huang, G.J., Huang, S.S. and Deng, J.S. 2017. Anti-inflammatory activities of inotilone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF- κ B, and MAPK activation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 7 (5): e35922.
- Işık, H. 2008. Tokat yöresinde bulunan bazı makromantar türlerinin antimikrobial aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 82 s.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Metha, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275 (5297): 218-220.
- Jia, X., Gao, M., Li, M., Wu, Y., Zeng, Y. and Xu, C. 2018. Molecular characterization of two polysaccharides from *Phellinus vaninii* lju and their cytotoxicity to cancer cell lines. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 18 (9): 1356-1363.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş. 2016a. Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1): 50-59.
- Karagöz, S. 2015. Bazı mantar türlerinin antiviral aktivitelerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 84 s.
- Khadhri, A., Aouadhi, C. and Aschi-Smiti, S. 2017. Screening of bioactive compounds of medicinal mushrooms collected on Tunisian territory. *International journal of medicinal mushrooms*, 19 (2): 127-135.
- Kim, E.H., Choi, Y.S. and Kim, Y.M. 2019. Antioxidative and anti-inflammatory effect of *Phellinus igniarius* on RAW 264.7 macrophage cells. *J Exerc Rehabil*, 25;15 (1): 2-7.
- Konno, S., Chu, K., Feuer, N., Phillips, J. and Choudhury, M. 2015. Potent Anticancer Effects of Bioactive Mushroom Extracts (*Phellinus linteus*) on a Variety of Human Cancer Cells. *J Clin Med Res*, 7 (2): 76-82.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J., Leo J.L.D. and Griensven, V. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus*

- brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129: 4, 1667-1675.
- Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, Memon Z, Ahmed N, Hasnain SN. 2018. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag Res*, 2;10:403-416.
- Lai V, Cranwell W, Sinclair R. 2018. Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clin Dermatol*, 36(2):167-176.
- Laovachirasuwan, P., Judprakob, C., Sinaphet, B. and Phadungkit, M. 2016. In vitro antioxidant and antimutagenic activities of different solvent extracts of *Phellinus* spp. *Int Food Res J*, 23 (6): 2608-2615.
- Li, S.C., Yang, X.M., Ma, H.L., Yan, J.K. and Guo, D.Z. 2015. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. *Carbohydr Polym*, 20; 133:24-30.
- Limon-Pacheco, J. and Gonshebbat, M.E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674 (1-2): 137-147.
- Liu, M.M., Zeng, P., Li, X.T. and Shi, L.G. 2016. Antitumor and immunomodulation activities of polysaccharide from *Phellinus baumii*. *Int J Biol Macromol*, 91: 1199-205.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants, and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4 (8): 118-126.
- Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. 2012. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 166(5):1069-1080.
- Lung, M. Y., Tsai, J.C. and Huang, P. C. 2010. Antioxidant properties of edible basidiomycete *Phellinus igniarius* in submerged cultures. *J Food Sci*, 75 (1): E18-24.
- Luo, L., Wang, Y., Zhang, S., Guo, L., Jia, G., Lin, W., Gao, Z., Gao, Y. and Sun, T. 2021. Preparation and characterization of selenium-rich polysaccharide from *Phellinus igniarius* and its effects on wound healing. *Carbohydr Polym*, 15; 264: 117982.
- Mao, X.L. 2000. The Macro fungi in China. Henan Science and Technology Publishing House, Zhengzhou, 477 pp.
- Nosrati, N., Bakovic, M. and Paliyath, G. 2017. Molecular mechanisms and pathways as targets for cancer prevention and progression with dietary compounds. *Int J Mol Sci*, 18 (10): 1-22.
- Oden, M.K. 2019. An investigation of the use of mushrooms in the research on Environmental Pollution. *Mantar Dergisi*, 10 (2): 167-174.
- Pastore, A., Federicia G., Bertinib, E. and Piemonteb, F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333: 19-39.
- Pei, J.J., Wang, Z.B. and Ma, H.L. 2015. Structural features and antitumor activity of a novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia. *Carbohydrate polymers*. 115; 472-7.

- Ranadive, K. R., Jagtap, N. V. and Vaidya, J. G. 2012. Host diversity of genus *Phellinus* from world. *Elixir Appl. Botany* 52, 11402–11408.
- Rodríguez-García, A., García-Vicente, R., Morales, M.L., Ortiz-Ruiz, A., and Martínez-López, J. Linares, M. 2020. Protein carbonylation and lipid peroxidation in hematological malignancies. *Antioxidants (Basel)*, 1; 9 (12): 1212.
- Ryvarden, L. 1994. European Polypores. Lubrecht & Cramer Ltd., 523–524 pp.
- Seephonkai, P., Samchai, S., Thongsom, A., Sunaart, S., Kiemsanmuang, B. and Chakuton, K. 2011. DPPH Radical Scavenging Activity and Total Phenolics of *Phellinus* Mushroom Extracts Collected from Northeast of Thailand, Chinese *Journal of Natural Medicines*, 9 (6): 441-445.
- Seklic, D., Stankovic, M., Milutinović, M., Topuzovic, M., Stajn, A. and Markovic, S. 2016. Cytotoxic, antimigratory, pro-and antioxidative activities of extracts from medicinal mushrooms on colon cancer cell lines. *Archives of Biological Sciences*, 68: 131-131.
- Sevindik, M. 2018a. Investigation of oxidant and antioxidant status of edible mushroom *Clavariadelphus truncatus*. *Mantar Dergisi*, 9 (2): 165-168.
- Sevindik, M. 2018b. Investigation of oxidant and antioxidant status of edible mushroom *Clavariadelphus truncatus*. *Mantar Dergisi*, 9 (2): 165-168.
- Sevindik, M. 2020. Antioxidant and antimicrobial capacity of *Lactifluus rugatus* and its antiproliferative activity on A549 cells. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 19 (2): 423-427.
- Sevindik, M., Akgül, H., Günal, S. ve Doğan, M. 2016. *Pleurotus ostreatus* ' un doğal ve kültür formlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16 (1): 153-156.
- Sevindik, M., Eraslan, E.C. ve Akgül, H. 2015. Bazı makrofungus türlerinin ağır metal içeriklerinin belirlenmesi. *Ormancılık Dergisi*, 11 (2): 48-53.
- Shou, D., Dong, Y., Wang, N., Li, H., Zhang, Y., and Zhu, Y. 2016. Simultaneous Quantification of Antioxidant Compounds in *Phellinus igniarius* Using Ultra Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *PloS. One*, 11: e0163797.
- Shyu, Y.S., Lin, J.T., Chang, Y.T., Chiang, C.J. and Yang, D.J. 2009. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. *Food Chemistry – Food Chem*, 115(2); 515-521.
- Song, F.Q., Liu, Y., Kong, X.S., Chang, W. and Song, G. 2013. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (3): 1571-1578.
- Song, L., Sun, P.L. and Guo, B.B. 2005. Recent studies on Sang Huang. *Edible Fungi of China*, 24: 7-15 pp.
- Song, T.Y., Lin, H.C., Yang, N.C. and Hu, M.L. 2008. Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linneaus: Fries) Quelet. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 50–56.

- Song, Y.S., Kim, S.H., Sa, J.H., Jin, C., Lim, C.J. and Park, E.H. 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol*, 88 (1): 113-6.
- Sunthudlakhar, P., Sithisarn, P., Wannissorn, B., Jarikasem, S. and Rojsanga, P. 2019. Phytochemical profiles, antioxidant and antibacterial activities of 11 *Phellinus* mushrooms collected in Thailand. *The Natural Products Journal*, 9 (2): 144-156.
- Taysi, S., Gul, M., Sari, R.A., Akcay, F. ve Bakan, N. 2002b. Oxidant/antioxidant status in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*, 40: 684–688.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, RA. ve Bakan, E. 2002a. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 21 (5): 200–204.
- Thammavong, S., Phadungkit, M.i., Laovachirasuwan, P., Naksuwankul, K., Saentaweek, W., Silsirivanit, A. and Wongkham, S. 2021. Antioxidant and cytotoxic activity of *Phellinus* mushrooms from Northeast Thailand, *Research Journal of Pharmacognosy*, 91-99.
- Thanh, N.T., Tuan, N.N., Kuo, P.C., Dung, D.M., Phuong, D.L., Giang, D.T.T., Wu, T.S. and Thang, T.D. 2018. Chemical constituents from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*. *Natural Product Research*, 32 (20): 2392-2397.
- Türkecul, İ. 2001. Tokat yöresinde yetişen makromantarlar üzerinde taksonomik bir araştırma. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 78 s.
- Uchida, K. 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 42: 318-343.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40.
- Wang, F.F., Liu, F., Shi, C., Ma, W., Wang, K.J. and Li, N. 2017. Cytotoxic activities of fractions of the willow bracket medicinal mushroom, *Phellinus igniarius* (Agaricomycetes), and the induction of cell cycle arrest and apoptosis in MGC-803 cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19 (6): 561-570.
- Wang, F.F., Shi, C., Yang, Y., Fang, Y., Sheng, L. and Li, N. 2018. Medicinal mushroom *Phellinus igniarius* induced cell apoptosis in gastric cancer SGC-7901 through a mitochondria-dependent pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 102, 18-25.
- Wang, F.F., Shi, C., Yang, Y., Fang, Y., Sheng, L. and Li, N. 2018. Medicinal mushroom *Phellinus igniarius* induced cell apoptosis in gastric cancer SGC-7901 through a mitochondria-dependent pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 102: 18-25.
- Wang, Y., Wang, S.J, Mo, S.Y, Li, S., Yang, Y.C. and Shi, J.G. 2005. Phelligradimer A, a highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius*. *Org Lett*, 7 (21): 4733-4736.
- Wang, Y.Q., Mao, J.B., Zhou, M.Q., Jin, Y.W., Lou, C.H., Dong, Y., Shou, D., Hu, Y., Yang, B., Jin, C.Y., Shi, H.C., Zhao, H.J and Wen, C.P. 2019. Polysaccharide from *Phellinus igniarius* activates TLR4-mediated signaling pathways in

- macrophages and shows immune adjuvant activity in mice. *Int J Biol Macromol*, 15; 123: 157-166.
- Wasowics, W., Neve, J. and Petretz, A. 1993. Optimized steps in flourometric determination of thiobarbitric acid-reactive substances in serum; importance ofextraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clinical Chemistry*, 39: 2522-2526.
- Wasser, S.P. 2017. Medicinal mushrooms in human clinical studies. Part I. Anticancer, oncoimmunological, and immunomodulatory activities: A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19: 279-317.
- Yang, N.C., Wu, C.C., Liu, R., Chai, Y.C. and Tseng, C. 2016. Comparing the functional components, SOD-like activities, antimutagenicity, and nutrient compositions of *Phellinus igniarius* and *Phellinus linteus* mushrooms. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (2): 343-349.
- Yıldız Turp, G. ve Boylu, M. 2018. Tıbbi ve yenilebilir mantarlar ve et ürünlerinde kullanımı. *Yüüüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 144-153.
- Yılmaz, A. ve Takka, S. 2020. Tümöral ekstraselüler matriks bileşenlerine kemoterapötik ilaç hedefleme. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 45, 2, 175-186.
- Yin, R.H, Zhao, Z.Z., Ji, X., Dong, Z.J., Li, Z.H., Feng, T. and Lui, K.J. 2015. Steroids and sesquiterpenes from cultures of the fungus *Phellinus igniarius*. *Nat Prod Bioprospect*, 5 (1): 17-22.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. 2012. Kanseri Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2): 7-18.
- Young, I.S. and Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54:176-186.
- Zapora, E., Wolkowycki, M., Bakier, S. and Zjawiony, J.K. 2016. *Phellinus igniarius*: A pharmacologically active polypore mushroom. *Natural Product Communications*, 11 (7): 1043-1046.
- Zhang, C.F and Huang, R.H. 2007. The pharmacological effects of R are Medicinal Bacterium-PI. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 1: 68-70.
- Zhang, H., Ma, H., Liu, W., Pei, J., Wang, Z., Zhou, H. and Yan, J. 2014. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. *Carbohydr Polym*, 26; 113:380-7.
- Zhang, X., Liu, J., Qian, C. Kanand, J. and Jin, C. 2019. Effect of grafting method on the physical property and antioxidant potential of chitosan film functionalized with gallic acid. *Food hydro colloids*, 89: 1-10.

ÖZGEÇMİŞ

BÜRKE ÇIRÇIRLI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2018	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya *Bölüm ve Fakülte Birinciliği, Yüksek Onur Belgesi

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler: 1 (Bir)

1- Eraslan E.C., Çirçirli, B., Özkan, A., Akgül, H. (2021). Anticancer mechanisms of action of macrofungus extracts, *Eurasian Journal of Medical and Biological Sciences*, <http://eurasianscience.com/index.php/ejmbs/article/view/6>, early online.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler (En sonuncusu en başta): 12 (On iki)

1. Çirçirli, B., Emre, M.C. (2021). Nanoparçacıkların yeşil sentezi, antikanser ve korozyon önleyici aktiviteleri, 6. *International Academic Studies Congress (UBCAK)*, 26-28 Temmuz, Online, 571-580. sayfa (**Sözlü Bildiri**).
2. Çirçirli, B., Emre, M.C., Özkan, A. (2021). Titanyum dioksit ve zirkonyum dioksitin A431 hücre canlılığı ve membran üzerine etkilerinin karşılaştırılması, 6. *International Academic Studies Congress (UBCAK)*, 26-28 Temmuz, Online, 581-585. sayfa (**Sözlü Bildiri**).
3. Çirçirli, B., Özkan, A., Akgül, H., Doğan, H.H. (2020). *Terfezia boudieri* Chatin metanol ve su ekstraktlarının A431 hücre dizileri üzerine etkilerinin araştırılması, 2. *International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech)*, 7-9 Ekim, Gaziantep, Türkiye, 43. sayfa (**Sözlü Bildiri**).
4. Çirçirli, B., Özkan, A., Yücel, G. (2020). Timol ve karvakrol'un A549 hücreleri üzerine sitotoksik ve antioksidan etkisinin araştırılması, 2. *International Eurasian*

Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech), 7-9 Ekim, Gaziantep, Türkiye, 42. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.

5. **Çırçırılı, B.**, Eraslan, E.C., Özkan, A. (2020). *Suillus luteus*'un terapötik özellikleri, *II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi*, 23-26 Nisan, Ankara-Türkiye, 127-132. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
6. Eraslan, E.C., **Çırçırılı, B.** (2020). Pharmacological potentials of *Russula* species, *II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi*, 23-26 April, Ankara-Turkey, 143-147. pages **(Oral Presentation)**.
7. Eraslan, E.C., **Çırçırılı, B.** (2020). Biological activities of *Tricholoma* species, *II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi*, 23-26 April, Ankara-Turkey, 148-152. Pages **(Oral Presentation)**.
8. **Çırçırılı, B.**, Eraslan, E.C., Özkan, A., Akgül, H. (2020). *Pyrofomes demidoffii* (Lév.) Kotl. & Pouzar mantarının A431 ve Bj Fibroblast hücreleri üzerine etkisinin araştırılması, *II. Uluslararası 23 Nisan Bilimsel Çalışmalar Kongresi*, 23-26 Nisan, Ankara-Türkiye, 167-168. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
9. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Akgül, H. (2020). *Phellinus igniarius* (L.) Quél türünden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının A431 hücre dizisi üzerine prooksidan ve antioksidan etkilerinin araştırılması, *3. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (eurasianbiochem)*, 19-20 Mart, Ankara-Türkiye, 87. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.
10. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Özcan, G., Demirci, G. (2020). Investigation of cytotoxic effects of gold, silver and gold-silver nanoparticles synthesized in *Pelargonium sidoides* root extract on H1299 cell line, *3. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (eurasianbiochem)*, 19-20 March, Ankara- Turkey, 87. pages **(Poster Presentation)**.
11. **Çırçırılı, B.**, Özkan, A., Bayram, E., Kızıl, Ç., Girişken, H., Özcan, G. (2018). Comparison of anticancer effects of nitrogen doped graphene, reduced graphene oxide and drug doped graphene on cancer cell lines, *1. Euroasia Biochemical Approaches and Technologies Congress (EBAT)*, 27-30 October 2018, Antalya, Turkey, Abstract Book, 50. pages **(Oral Presentation)**.
12. **Çırçırılı, B.**, Girişken, H., Erdoğan, A., Özkan, A. (2018). Timol ve karvakrolun A431 (epidermal karsinom) hücrelerinin hücre zarı üzerine prooksidan ve antioksidan etkisinin araştırılması, *1. International Health Science and Life Congress (IHSLC)*, 02-05 May 2018, Burdur, Türkiye, Bildiri Kitabı, 172. sayfa **(Sözlü Bildiri)**.