

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARA TIRMA PROJELER KOORDİNASYON BİRİMİ



**Pisolithus arhizus Türünün Antimikrobiyal, Antigenotoksisite, Sitotoksisite
Aktivitelerinin ve Flavonoid içeriğinin Belirlenmesi**

Proje No: TSA-2014-5232

Normal Ara tırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Dil ad ONBALI

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Ara tırmacının Adı Soyadı

Prof.Dr.Gökçen YUVALI ÇELİK

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Ara . Gör. BERRAK ALTINSOY

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Prof. Dr. Belma ASLIM

Gazi Üniversitesi/Fen Fakültesi

Haziran 2015

KAYSER

TE EKKÜR: Bu proje kapsamında ülkemizde yeti en bir mantar türü olan *Pisolithus arhizus*'a ait ekstraktların biyolojik aktivitelerini ara tırmak üzere çe itli çalı malar gerçekte tirilmi tir. Böyle bir çalı manın gerçekte tirilmesi için ara tırmacılara maddi destek sa layan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri (ERÜ BAP) Birimine ve makrofungus örne inin temin ve te hisinde deste ini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Hakan ALLI' ya sonsuz te ekkürlerimizi sunarız.

Ç İNDEK İLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2-3
1. G İR İŞ / AMAÇ VE KAPSAM	4-5
2. GENEL B İLG İLER	6-15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16-23
4. BULGULAR	24-27
5. TARTI İMA VE SONUÇ	28-34
6. KAYNAKLAR	35-40

ÖZET

Pisolithus arrhizus (Scop.) Rauschert (Basidiomycetes) türü okalıptüs ve çam ağaçlarının birçok türünü çevreleyen kökleri toprakta bulunan bir ektomikorizal mantardır. Birçok ekosistemde ektomikorizal mantarlar topraktaki mikrobiyal kitlenin en önemli üyelerindedir. Bu projede kullanılması öngörülen *P. arrhizus* makrofungusu Türkiye'de yaygın yayılı gösteren tıbbi de eri yüksek bir türdür. Literatürde bazı makrofungusların yapısında antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser ajanlar bulundu u bildirilmekle birlikte Türkiye'de yaygın olarak bulunabilen *P. arrhizus* türünün biyolojik ajan kayna ı olarak çalı ılmamı olması dikkat çekmektedir. Çalı mada ile Kütahya ili ve çevresinden, **110R019 No'lu TUB TAK** projesi kapsamında toplanan *P. arrhizus* türünün iki farklı çözücüyle elde edilen ekstraktlarının barsak patojeni bakteriler kar ı antimikrobiyal aktivitesi ve HT-29 (insan kolon kanser hücre hattı) hücre hattında sitotoksik potansiyeli sa lıklı hücreler ile kar ıla tırılarak gösterilmi tir. Antimikrobiyal etkisi Minimum nhibisyon konsantrasyonu (M K) göre, sitotoksitesi WST kit metoduna göre tespit edilmi tir. Bunlara ek olarak Flavonoid içeri inin tespiti HPLC metoduna göre yapılmı tir ve DNA üzerindeki antigenotoksisitesi Comet tekni i kullanılarak ortaya konulmu tir. Bu ba lamda proje kapsamında bazı makrofungus türü *Pisolithus arrhizus'un* antimikrobiyal, sitotoksite antigenotksisite aktiviteleri ve flavonid içeri i ara tırılmı tir. Mantar toplanıp kurutulduktan sonra etanol ve metanol ile ekstrakt edilmi tir. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi *Salmonella typhimurium* - BAST01, *Escherichia coli* - ATCC 35218, *Enterobacter aerogenes* BA-EA1 mikroorganizmalarına kar ı test edilmi tir. *P. arrhizus'un* etanol ekstraktları *S. typhimurium'a* kar ı metanol ekstraktın gösterdi i etkiden daha çok etki göstermi tir. *P. arrhizus'un* her iki ekstraktı *S. typhimurium* ve *E. aerogenes* üzerinde aynı etkiyi gösterirken *E. coli* üzerinde etanol ekstraktına kıyasla daha az etki göstermi tir. Önceki çalı mamız (TSA-1135 NO'LU BAP projesi), bu mantarın oksidatif enzimleri inhibe etme özellikleriyle ünlü olan fenolikler ve antioksidanların yüksek oranda bulundu unu göstermi tir. Kolorektal kanserler ya am kalitesini dü üren, i . kaybına yol açan önemli bir sa lık sorunu olup günümüzde en sık görülen kanser türlerindedir. Oksidatif hasar birçok kanser türünde oldu u gibi kolorektal kanser geli imine e lik etti inden, bu çalı ma *P. arrhizus'dan* elde edilen etanol ve metanol ekstraktlarının barsak kanseri hücreleri üzerinde ço almayı engelleyici etkisinin oldu unu göstermektedir. Ek olarak *P. arrhizus mantarına* ait her iki ekstreninde DNA üzerinde bir hasar göstermedi i tespit edilmi tir. Mantar örne inin her iki ekstraktındaki

flavonoit içeriindeki bileşikler kaempferol, Biochanin A, luteolin, rutin, quercetin, katein ve apigenin olarak bulunmuştur. HPLC analiz sonucuna göre etanol ekstraktında en yüksek kaempferol, metanol ekstraktında en yüksek rutin tespit edilmiştir.

Bu proje ile antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan özelliğe sahip, makrofungus kaynaklı biyoajanların terapötik ve farmasötik kullanımına yönelik bakıncalı malar için bir basamak olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Pisolithus arrhizus*, Antimikrobiyal aktivite, Sitotoksite, Flavonoidler, Genotoksite

ABSTRACT

Pisolithus arrhizus (Basidiomycetes) is an ectomycorrhizal fungus found in the roots and soil surrounding of many species of eucalyptus and pine trees. *P. arrhizus* intended to be used in this project, have high medicinal value and widely distribute in Turkey. In the literature it is reported that antimicrobial, antioxidant and anticancer agents are found in some mushrooms structure while species of *P. arrhizus*, commonly found in Turkey, are not studied as a source of biological agents. The present work verified the antimicrobial activity against on intestinal pathogens and comparing normal cells the cytotoxic potential on HT-29 (Human colon adenocarcinoma cancer cell line) of *P. arrhizus* collected in **110R019 TÜB TAK** project from Kütahya and additionally we determined flavonoid contents of this mushroom and establish antigenotoxicity on DNA. The antimicrobial efficiency of the mushroom was evaluated according to Minimum Inhibition concentration. Cytotoxic effects of the extracts were determined by WST assay. The flavonoid contents of *P. arrhizus* ethanolic and methanolic extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The antigenotoxicity of the mushroom was establish by Comet test. In this context antimicrobial, cytotoxicity and antigenotoxicity activities and flavonoid content of *Pisolithus arrhizus*, mushroom species was studied within the project. Mushroom samples were collected and subjected to ethanol and methanol extraction after air drying. Antimicrobial activities of the extracts were tested against *Salmonella typhimurium* - BAST01, *Escherichia coli* - ATCC 35218, *Enterobacter aerogenes* BA-EA1. As a result of the study, antimicrobial effects of ethanol extract against on *S. typhimurium* that is higher than the other studied pathogens. In addition, methanol extract showed inhibition that is lower than the ethanol extract, against *E.coli*. Our previous study (TSA-1135 No BAP project), demonstrated high contents of phenolics and antioxidants in its extracts many of those are famed for their inhibition of oxidative enzyme properties. Colorectal cancer is one of the most endemic cancers causing significant health problems which decreases life quality and causes job loss. Since oxidative damage frequently accompanies the progress of colorectal cancer as in several cancer types, in the present study, we showed that the ethanolic and methanolic extracts of *P. arrhizus* exerted strong anti-proliferative effects on colon cancer cells. Both of two extracts of *P.*

arrhizus did not show on DNA damage and flavonoid contents found as kaempferol, Biochanin A, luteolin, rutin, quercetin, catechin and apigenin. The result of HPLC analyses kaempferol (ethanol extract) and rutin (methanol extract) are the highest value.

At the end of this project, fungal agents which have antimicrobial anticancer and antioxidant properties, will be able to be used as many different cancer types preventive, therapeutic or pharmaceutical material. Thus, it will be possible to obtain the different bioactive agents.

Keywords: *Pisolithus arrhizus*, Antimicrobial activity, Cytotoxicity, Flavonoids, Genotoxicity

1.G R VE AMAÇ

Bitkiler alemi yüz milyonlarca yıl süren evrimle me süreci içerisinde inanılmaz sayıda ve çe itlilikte cins ve türlerin var olmasına ahit olmu tur. Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık kadar eskidir. Eski ça larda hastalıkların tedavisi konusunda di er canlıların davranı larının incelenmesi ve taklit edilmesi ilaçların olu umunda büyük önem ta ımaktadır. Hayvanların çe itli bitkileri kullanarak kendilerini tedavi etmeleri insanları da bitkilere yönlendirmi tir. Bitkilerin bu özelliklerinin kayna ı ara tırılmı ve içeri indeki çe itli materyallerin bazı fizyolojik aktivitelere sahip oldu u gözlenmi tir. Bunlara örnek olarak; anti-mikrobiyal, anti-viral, analjezik, anksiyolitik, anti-depresan, anti-inflamatuar, anti-kolinesteraz, anti-oksidan, amoebisidal, anti leishmanial, anti-platelet, antiproliferatif, pro-apoptotik, akıl hastalıkları, diyabet, karaci er koruyucu, HIV-1 integras inhibitörü aktiviteleri verilebilir (1).

Günümüzde bilim ve teknolojiye ilerlemelere ra men do al kaynakların bilinçsizce tüketimi ve kar ıla ılan ekonomik güçlükler, do al kaynakların birçok amaçta kullanımlarını zorunlu kılmı tır. Makromantarlar yüzyıllardır yiyecek olarak tüketilmektedir. Besinsel de erlerinin yüksek olmasının yanısıra bilinen do al antioksidan moleküller bakımından da zengin bir kaynak olması ve birçok literatürde belirtilen antibakteriyel etkinliklerinden dolayı bakterilerin direnç geli tirdi i antibiyotiklere alternatif olaca ı dü ünülmektedir.

Makromantarların insan sa lı na yönelik bir alternatif olarak kullanılabilen önemli bir do al kaynak olmasından dolayı bu çalı mada bir makromantar türü olan *Pisolithus arhizus*'a ait ekstraktların barsak patojeni mikroorganizmaların geli imlerini engelleyen do al ve yeni antimikrobiyallerin ara tırılması ve barsak kanseri üzerine sitotoksik etkisinin belirlenmesi hedeflenmi tir. Çalı mamızın bir di er önemli amacı ise, bu mantar türünün DNA hasarı olu turup olu turmadı nı veya H₂O₂ indüklenmesi ile olu turacak bir DNA hasarını ne derecede engelleyebildi ini, tek hücre DNA' larının elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz etmektir. Böylece ilaç sanayide kullanımları için bu mantarların toksik etkileri, güvenilirlikleri ve varsa antigenotoksik etkileri hakkında bilgi edinilecektir. Aynı zamanda do al antioksidanların ba ında gelen ve kanserin önlenmesinde önemli bile enlerden olan flavonoid bile iklerin bu mantar türü tarafından üretilme kapasitelerinin ara tırılması da amaçlanmı tır.

2. GENEL B LG LER

Mantarlar, besinsel açıdan fonksiyonel gıdalar ve fizyolojik yararlı ilaçların kayna ıdırlar (1). Hem gövde, hem miselleri antimikrobiyal ve antikanser aktiviteye sahip bile ikler içermektedir (1). Mantarların immünolojik ve antikanser özelliklerinin yanı sıra antioksidan, antihipertensif, kolesterol düşürücü, karaciğer koruyucu, antifibrotik, antiinflamasyon, antidiyabetik, antiviral ve antimikrobiyal etkileri olduğu saptanmıştır (2).

Ökaryotik hücre yapısına sahip heterotrof canlılar olan makrofunguslar hiflerden oluşan a sı bir yapıya sahiptirler (3). Birçok et ve süttten daha az ancak birçok sebzedden daha çok protein içeren, kolayca sindirilebilir bir protein kayna ıdır. Mantarlar esansiyel tüm aminoasitleri içerir ancak metiyonin, sistin ve sülfür aminoasitlerini az miktarda bulundurur. İçeriklerine bakıldığında büyük oranda fosfor ve potasyum, az miktarda demir ve kalsiyum olmak üzere tüm mineralleri gelişimlerinin tüm basamaklarında bulundururlar (4). Özellikle tiamin (B1), riboflavin (B2), niyasin (B3), biyotin (B7) ve askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminlerin kayna ı olan makrofungusların folik asit bakımından da zengin olan ve kansızlık tedavisinde kullanılan bazı türleri, fark edilebilir miktarda β -karoten ve ergosterol içerir. Yapılarındaki ham yağlar; yağ asitleri mono-, di- ve trigliserid'ler, steroller, sterol esterleri ve fosfolipidler dahil tüm ana lipid bileşenlerini içerir. Yağ asitleri genelde düşük olup kuru mantarın yaklaşık % 2-8'ini oluşturur. Karbonhidrat ve yağ içeriklerinin pek çok besine göre düşük olması sebebiyle sağlıklı bir beslenme rejimi için aranan özelliklere sahiptirler (5,6). Çok katlı ve fibriller özellikteki hücre duvarı, miktarı türe ve mevsimsel koşullara göre değişen polisakkarit (yaklaşık % 80), protein(% 5-15) ve lipid'(% 3-10) ihtiva eder. Polisakkaritler arasında kitin, kitosan, glukan, galaktoz, manan ve selüloz en fazla bulunanlarıdır (7). Yabani veya kültüre edilmiş olarak dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilmekte olan mantarlarda bulunan bu gıda bileşenleri, türe, insan kökenli faktörlere, toprak yapısı ve bölgesine bağlı olarak değişebilmektedir (8).

Bugüne kadar makrofunguslar ile yapılan biyolojik aktivite çalışmaları incelendiğinde iki durum ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birincisi çalışmaların büyük bir çoğunluğunun doğadan toplanan örneklerle yapıldığı olmasıdır (9-11). Bu çalışmalar sonucunda etkili türlerin bulunmasına rağmen apkanın yılın belirli bir döneminde ortaya çıkması veya bazı yıllar

ortam koşulları uygun olmadığı için hiç oluşması düzenli olarak etkin maddelerin elde edilmesini imkansız kılmaktadır. Bu bakımdan mantara ait miselde ya da miselin yetiştirildiği ortamda etkin madde aramak ve bulunması halinde yılın her döneminde üzerinde çalışılması ve yeterince üretme imkanı sağlaması açısından oldukça önemlidir (12,13). Diğer bir önemli husus da yapılan makrofungus çalışmalarının oldukça az sayıda tür ile sınırlı olmasıdır (14-16). Genellikle etken maddeye sahip olduğu düşünülen az sayıda tür üzerinde detaylı ve çok sayıda çalışmaları yapılmıştır ve bu durumun sonucunda geride bırakılması gereken çok sayıda makrofungus türü kalmıştır. Ülkemizde yaklaşık 2400 civarındaki makrofungus türleri içinde (7,17) yenilebilir türlerin kültüre alınması çalışmaları hızlı bir şekilde devam etmektedir.

Çalışmada kullanılacak olan mantar türü *Pisolithus arhizus*; tarçın kahvesi renginde, 7-12 µm büyüklüğünde küresel ve dikenli sporlara sahip mikorizal bir mantar türüdür (3). Mikoriza, mantar miselleri ile yüksek bitkilerin kökleri arasındaki karlılığı yararlanmaya dayanan bir ilişkidir. Bu ilişki kide mantar bitkiden karbon ve esansiyel organik maddeleri temin ederken, bunun karşılığında bitkiye su, mineral tuzlar ve metabolitlerin alımında yardımcı olmaktadır. Ektomikoriza ise mikorizanın tarım ve ormancılık açısından önemli bir tipidir. Ektomikorizal mantarlar ekonomik açıdan mantarların en önemli gruplarından biridir. Birçok ekosistemde ektomikorizal mantarlar topraktaki mikrobiyal kitlenin en önemli üyelerindedir. Ototrof olan konukçu bitki ile heterotrofik organizma arasında besin alıverişi ve ekolojik olarak dengelin korunmasını sağlayan mikoriza, bu yönü ile ekosistemdeki besin döngüsü ve bitki canlılığının devamında büyük bir öneme sahiptir (18). Ölü adamın ayağı (dead man's foot) olarak bilinen bu sıradaki mantar kırılıgandır ve kolayca toz haline dönüşebilir. Geleneksel Çin tıbbında haricen uygulandığında yara iyilemesi, iltihapları dindirme, kanamaları ve sulu mayasılı durdurmada ve irin tedavisinde kullanılır. Dahilen uygulandığında ise özofagus ve mide kanamalarını durdurmada kullanılır.



ekil 1. *Pisolithus* cinsine ait bir tür örneği

Japonya'da *kotsubutake* olarak bilinen bu mantar, akciğerlerde bir ısıtıcı gibi davranarak öksürük, boğaz ağrısı ve alerji ile burun kanamaları tedavilerinde de ilaç olarak kullanılır. Kimyasal içeriğinde bulunan ve bir triterpen olan pisosterolün yedi kanser hücrelerini özellikle lökoma ve melanoma hücrelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (19). Ülkemizde Antalya, Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Denizli, İzmir, Kahramanmaraş, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin Muğla bölgeleri olmak üzere geniş bir yayılı alanına sahiptir (20).

Makrofungusların aktif metabolit bakımından zengin olması, onun antibakteriyel etkisinin yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Makrofungusların bünyesinde barındırdığı kendine özgü ve çok çeşitli metabolit grupları onların antioksidan ve diğer terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik araştırmalar farklı makrofunguslarının sitotoksik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Makrofunguslarında antioksidan aktiviteyi sağlayan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları düşünülmektedir.

Günümüzde birçok üründe antimikrobiyal etkileri için nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), kükürt dioksit (SO_2), benzoik asit ve sorbik asit kullanılmaktadır. Ancak NO_3^- ve NO_2^- insan metabolizmasının atılım ürünleridir ve vücutta birikerek reaktif azot türlerine (RNS) dönüşebilmektedir. RNS de ROS gibi yüksek reaktiviteye sahip olduğundan, biyomoleküllerle reaksiyona girerek romatizmal hastalıklar, parkinson, kanser ve hücre harabiyetine sebep olmaktadır (21). Antimikrobiyal olarak kullanılan benzoik asit ve benzoik asit türevlerinin ise nörolojik hastalıklara neden olmasının yanı sıra kanserojen olduğu

bilinmektedir. Ayrıca gıda sanayiinde kullanılan kimyasal maddelerin büyük büyük bir kısmı toksik, nörodejeneratif ve kanserojen etki gibi istenilmeyen etkilere sahiptirler (20). Bu nedenle; son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antimikrobiyal maddelerin bulunması için do al ürünler üzerinde yaygın çalı malar yapılmaktadır. Ayrıca, antitümör etki gösteren -glukan grubu bile ikler; kalvasin, volvotoksin, flammotoksin, lentinan, ganoderik asit ve porisin yalnızca mantarlardan izole edilmi antioksidan maddelerdir (22). Bu bakımdan mantarlar, yeni antikanser bile iklerin bulunması ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilebilmesi bakımından umut verici bir kaynak olu turmaktadır.

Yapılan birçok bilimsel çalı ma sonucunda de i ik makrofungus türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antialerjik ve antitümör aktivitelerinin oldu u rapor edilmi tir (23-25). Mantarların antimikrobiyal etkileri, fungal yapıda sentezlenen ve genellikle organizmaya özgü bazı fenolik bile ikler, pürinler, pirimidinler, terpenoidler, kinonlar ve fenil proponoid türevi gibi antagonistik maddelerden dolaydır. Organizma ya adı ı ortamda varlı mını sürdürebilmek ve çevresindeki rekabetçi türlere üstünlük sa layabilmek için bu tür kimyasallara ihtiyaç duymaktadır (23). Farklı aminoasit sekanslarıyla antifungal proteinler farklı organizmalar tarafından üretilirler. Tıbbı mantarlar ve di er mantarlar da çe itli antifungal proteinler üretirler (26). Ganodermin tıbbı bir mantar olarak bilinen *G. lucidum*‘ dan izole edilmi antifungal proteindir. *Ganoderma japonicum* mantarının miselinden elde edilen esansiyal ya ın kimyasal bile enlerinin ve antimikrobiyal aktivitesinin incelendi i bir çalı mada *G.japonicum* tüm test mikroorganizmalarına kar ı antimikrobiyal etki gösterdi i bildirilmi tir (27).

Günümüzde kanserle serbest radikaller arasındaki ili ki yapılan deneylerle ispat edilmi tir. Bilindi i gibi süperoksit (O₂·-), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (HO·) gibi serbest radikaller; canlı organizmalara ait dokularda, di er madde ve gruplarla reaksiyon vererek hücrelerde istenmeyen toksik maddeler olu turabilirler. Açık a çıkan bu zararlı ürünler, çe itli mekanizmalarla hücre harabiyetini tetikler ve böylece hücre ölümüne neden olurlar (5).

Kawaratake (*C. versicolor*) mantar türü, polisakkarit-K (krestin) için kaynaktır. 1970’lerin sonlarında geli tirilen *C. versicolor* mantarının krestin etken maddesinden elde edilen ilaç Japonya’da en popüler kanser ilaçlarından biri olarak bilinmekte olup mide ve di er kanser

türlerinin tedavisi amacıyla oral yolla alınmaktadır. Mide kanseri tedavisinde kullanımı 1980'li yıllarda onaylanan lentinan maddesinin kaynağı Shiitake mantarıdır. Oral yolla alındığında emilimi zayıf olduğu için enjeksiyon yoluyla alınmalıdır. Suehirotake (*Schizophyllum commune*) mantarı bazı kanseri tedavilerinde enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır (28).

Genotoksisite genel anlamda, genetik materyal üzerinde olabilecek zararlı etkiler olarak bilinmektedir. Bu yüzden genotoksisite testlerinde DNA'daki değişiklikler belirlenir. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, UV ve irradyasyon etkisinde, endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır. Bu testler 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in-vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. Hücrelerde DNA ile etkileşime girerek olumsuz etki gösteren maddeler genotoksik maddeler olarak adlandırılır. Bu olumsuz etkiler; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA katımlarıdır (kansere neden olan bileşiklerin kovalent olarak DNA'ya bağlanması hali). Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişikliklerine yol açmakta ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser olabilmektedir (29). Sadece genotoksik ve mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, (3,6) Bu çalışma konuları içinde yer alan önemli bir bölümdür.

Tıbbi ve yenilebilir mantarlar genellikle, polisakkaritler ve polifenoller gibi geniş bir serbest radikal giderici molekül sınıfı içerirler. Flavonoid bileşikler, kanserin önlenmesi ile ilgili en önemli besin bileşenlerinden biridir. Mantarların enlatlama, lipooksijenaz ve serbest radikal giderme yeteneği hidroksil grupları içeren biyoaktif flavonoid bileşiklerle ilişkilidir.

Flavonoid bileşiklerin antioksidan aktiviteyle direkt ilişkili olduğu ve lipid peroksidasyonunun engellenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Flavonoidler antioksidatif aktivitelerini; ksantin oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi oksidatif enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile enlat oluturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek ve süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri, hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak

göstermektedirler (30). Ayrıca birçok mantar türünün, antioksidan etkili pirokateol ve kersetine e der miktarda toplam fenolik ve flavonoid grubu bile içerd i bulunmu tur. (4)

Yapılan çalı malarda, mantarların serbest radikal giderim kapasiteleri sentetik antioksidanlarla karşılaştırılmı ve anlamlı üstünlükler sağladı ı bildirilmi tir. Bu nedenle mantarlar antikanser olarak tıbbi amaçla kullanılabilir. Mantarlardan izole edilen bile enlerin kanser üzerinde yararlı etkileri oldu u deneylerde gösterilmi tir. Bu bile iklerin ço u polisakkaritler veya -1,6 dallı -1,3 ba lı glukanlardır. n vivo ve in vitro çalı maları - glukanların tümör gelişimini engelledi ini göstermi tir. *L.edodes* (lentinan), *S. commune* (sonifilan), *G. frondosa* (grifolan) anti-tümör aktiviteye sahip - glukanları ekstre edilmi tir (22). Çin, Kore, Rusya, Amerika Birle ik Devletleri ve Kanada'da *Polyporaceae* familyasına ait bazı mantarların mide, prostat, yemek borusu ve akci er kanserinin tedavisi amacıyla kullanıldı ı bildirilmi tir (31).

Antioksidanların ilaç ve gıda sanayiinde kullanımı yaygındır ve neredeyse tüketti imiz her ürüne antioksidan etkili bile ikler katılmaktadır. Bu yolla ilaçlar ve gıdaların bozulması engellenerek, bunların daha uzun süreyle korunması ve saklanması sağlanır (32). Günümüzde gıda sanayiinde özellikle yağ içeren ürünlerinin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu önlemek amacıyla kullanılan bütillenmi hidroksi toluen (BHT), bütillenmi hidroksi anisol (BHA), gallat türevleri ve tert-bütıl hidrokinon (TBHQ) gibi antioksidan maddelerin toksik etkilerinden üphelenilmektedir. Bu antioksidanların; toksik, kanserojen ve gastrit yapıcı etkilerinden dolayı bebek mamaları ve çocuk gıdalarında kullanılmasına izin verilmemektedir (33). Ayrıca birçok üründe antimikrobiyal etkileri için nitrit (NO₂-), nitrat (NO₃-), kükürt dioksit (SO₂), benzoik asit ve sorbik asit kullanılmaktadır. Ancak NO₃- ve NO₂- insan metabolizmasının atılım ürünleridir ve vücutta birikerek reaktif azot türlerine (RNS) dönü ebilmektedir. RNS de ROS gibi yüksek reaktiviteye sahip oldu undan, biyomoleküllerle reaksiyona girerek romatizmal hastalıklar, parkinson, kanser ve hücre harabiyetine sebep olmaktadır (34,35). Antibakteriyel olarak kullanılan benzoik asit ve benzoik asit türevlerinin ise nörolojik hastalıklara neden olmasının yanı sıra kanserojen oldu u bilinmektedir. Ayrıca gıda sanayiinde kullanılan kimyasal maddelerin büyük büyük bir kısmı toksik, nörodejeneratif ve kanserojen etki gibi istenilmeyen etkilere sahiptirler. Bu

nedenle; son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalımlar yapılmaktadır (36,37).

Ülkemizde makrofungus biyotasına yönelik çalımların son zamanlarda artmasına karşın makrofungusların medikal etkileri üzerine çok az çalıma bulunmaktadır. Özellikle çalımamızda kullandığımız *P.arhizus* türünün insan barsak patojenlerine karşı antimikrobiyal, dünyada ölüme neden olan en yaygın üçüncü kanser türü olduğu bildirilen kolon kanserine karşı antikanser ve antigenotoksik aktivitesine ve toplam flavonoid içeriğinin tespitine yönelik bir çalıma rastlanılmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Ara tırmada Kullanılan Makrofungus Örnekleri

Bu ara tırmada kullanılan mantar örne i Erciyes Üniversitesi BAP biriminden alınan destekle TSA- 11-3580 no'lu projemizde kullanılan türdür.

3.1.2. Makrofungus Örneklerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

Bu a amada kullanılan örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL. mg⁻¹) olacak ekilde ayarlanmı tır.

Bile enin adı	Miktarı
Etanol	100 rpm
Metanol	100 rpm

3.1.3. Mikroorganizmaların nokulasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Broth (Merck)

Bile enin adı	Miktarı
Nutrient Broth (Merck)	13,0 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 2. Nutrient Agar (Merck)

Bile enin adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	28,0 g
Distile Su	1000 mL

Ticari olarak alınan besiyerinin 28 g 1000 mL distile su içinde çözüldükten sonra 121⁰C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmi tır. Bakteriye organizmalar için kullanılmı tır.

3.2. METOT

3.2.1. MAKROFUNGUS ÖRNEKLERİNİN EKSTRAKSİYON YÖNÜ

Daha önce ezilip toz hâline getirilmi örnekler tartılarak balon jöjeye alındıktan sonra, üzerlerine ekstraksiyon çözücülerinden konularak, örneklerden ekstraktlar elde edilmiştir. Bu amaçla kullanılan örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL.mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirtilen oran tespit edilirken, önce 1:1 (mL.g⁻¹) oranı ile denemeler yapılmıştır, ancak bu oran kullanıldığında, ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstrakt miktarının yetersiz kaldığı görülmüştür. Deneyler için gerekli olan ekstrakt miktarını elde edebilmek amacıyla çözücü miktarı artırılmış ve sonuçta oran, 1:10 (mL.mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneme sırasında;

- 1) Kuru mantar örnekleri toz haline getirilip, eppendorf tüplere konulur.
- 2) 10 g'lık toz örnekler 100 mL çözücü içerisinde 25° C 'de 150 rpm' de 24 saat manyetik karıştırıcıda çalkalanır.
- 3) Karışım Whatman No: 4 kağıdından süzülür.
- 4) Sıvı kısma 100 mL metanol ilave edilerek işlem tekrarlanır.
- 5) Kombine edilmiş metanolik ekstraktlar (40 ° C) evaporatörde uçurulur, santrifüj sonucu oluşan süpernatant, antimikrobiyal aktivitenin tespitinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.2. ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTE NİBELERİNİN BELİRLENMESİ

3.2.2.1. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Çalışmada bağırsak patojeni olarak bilinen mikroorganizmalar kullanılmıştır (Tablo 1). Mikroorganizmalar Nutrient Broth sıvı ortamında 24 saat 37 °C'de inkübe edilerek geliştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin dozu test edilebilmesi için besiyerlerine yayılan mikroorganizma kültürlerinin standart miktarda mikroorganizma içermesi gerekmektedir. Bu amaçla mikroorganizma kültürleri serum fizyolojik (%0.9 NaCl çözeltisi) içine alınarak

bulanıklık açısından standardize edilmiştir. Mikroorganizma içeren serum fizyoloji in bulanıklık 1 Mc Farland No 0.5 standardı ile karşılaştırılarak standardize edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları

Kullanılan Test Mikroorganizmaları	
1	<i>Salmonella typhimurium</i> - BAST01
2	<i>Escherichia coli</i> - ATCC 35218
3	<i>Enterobacter aerogenes</i> - BA-EA1

3.2.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ile Antimikrobiyal Aktivite Tayini

- 1) Çalışmada kullanılacak olan test mikroorganizmaları 5 ml'lik Nutrient sıvı besiyerinde 2 kez aktifleştirildi.
- 2) 1, 2, 4, 8, 16, 32, 63, 125, 250, 500, 1000 µg/ml mantar ekstraktı içeren 0,2 ml nutrient sıvı besiyerine % 1 oranında bakteri ekilip, 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- 3) inkübasyon sonunda bulanıklığın optik yoğunluk değeri konsantrasyon bakteri canlılığının optik yoğunluk değeri olarak kabul edilerek MİK olarak belirlenmiştir.

Tüm analizler iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Sitotoksite Çalışmaları

Bu çalışmada WST kit (WST-1 Cell proliferation assay kit, cat. No : 10008883, marka :Cayman chemical company) kullanılmıştır. Mantarlar farklı konsantrasyonlarda (250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml) hazırlandıktan sonra 5 paralel olarak HT-29 kanser hücre hattında muamele edilmiştir. 72 saat inkübasyondan sonra 10µl WST, her kuyucuya eklenmiştir. Tekrar 2 saat inkübasyondan sonra 450 nm dalga boyunda EPOCH mikroyuvarlak okuyucuda (BIOTEK) analiz edilmiştir.

3.2.4. Genotoksisite Çalışmaları

Çalışmada *Pisolithus arhizus* etanol ve metanol ekstraktlarının genotoksisite ve antijenotoksisite etki komite yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada temel amaç, bu bitki

ekstrelerinin DNA hasarı olu turup olu turmadı mı veya H₂O₂ indüklenmesi ile olu turacak bir DNA hasarını ne derecede engelleyebildi ini tek hücre DNA' larının elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz etmektir.

3.2.4.1.Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi): Comet tekni i, Singh ve ark.'nın (1988) yaptı ı çalı malar dikkate alınarak ve bazı modifikasyonlarla kullanılmı tır (38). Bu test tekni inde de her bir bitki örne i için sa lıklı bir bireyden alınan periferal kan lenfositleri kullanılmı tır. Heparinli enjektörle alınmı taze periferal kana e it miktarda PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) eklenerek süspanse edilmi tır. Her bir tüpün dip kısmına 2 ml lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenmi ve 4 °C'de 2400 rpm de 20 dakika santrifüj edilmi tır. Santrifüj sonrası tüplerin içerisindeki eritrositlerin üzerinde olu an bulutsu kısmın 2 ml'si alınarak ayrı bir tüpe aktarılmı ve buz üzerine konulmu tur. Daha sonra lenfositler bitki ekstraktlarının çe itli konsantrasyonları (250-500 µg/ml) ile süspanse edilmi ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmı tır. inkübasyon sonrası ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmi , süpernatant atılmı tır. Dü ük erime ısılı agarın 75 µl'si, 100 µl lenfositlerle karı tırılıp, önceden normal erime ısılı agar ile kaplanan lamaların üzerine damlatılmı ve 24X60 mm'lik lamel ile kapatılmı tır. Bu halde preparatlar 15-20 dak. buzda bekletilmı tır. Lamalar içerisinde lizing solüsyonu bulunan aleler içerisinde konulup ve buzdolabında 1 saat bekletilmı tır. Liziz i leminden sonra lamalar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka yerle tirilip, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dak. bekletilmı tır. Daha sonra 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez yapılmı tır. Preparatlar, nötralizasyon tamponu (pH=7.5) ile 15'er dakika kez muamele edilmi tır ve nötralizasyon sonucunda lamaların üzerine 20 µg/ml'lik etidyum bromid'in 50 µl'si yayılıp ve 24X60 mm'lik lamel ile kapatılmı tır. Tüm bu i lemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmı tır.

3.2.4.2.Mantar ekstrelerinin Antigenotoksik Etkisinin Belirlenmesi: Amaç hücrelerde genotoksik etki yaratmadan, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek bitki ekstrelerinin konsantrasyonun belirlenmesidir. Noroozi ve arkadaşlarının (2009) yapmı oldu u çalı ma referans alınarak lenfosit hücrelerinde yüksek genetik hasar olu turan H₂O₂ (pozitif kontrol) deri imi 50µM olarak bulunmu tur (39). Lenfosit hücreleri önce 1 saat belirlenmi konsantrasyondaki bitki örnekleri ile inkübasyona bırakılmı tır. Bu a amadan sonra 10dk. H₂O₂ (50 µM)' e maruz bırakılmı tır. Bu a amadan sonraki i lemlere comet prosedüründeki gibi devam edilmi tır.

3.2.4.3. Görüntü Analizi ve Comet Sayımı:

Boyanan preparatlar Olympus marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) altında 40X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan her bir bitki örneği için 100 komet "Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK" kullanılarak incelenmiştir. Aksoy ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmaya esas alınarak sonuçlar kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir (40). Bitkilerin H₂O₂'in DNA'da yarattığı genetik hasarı inhibe edici yüzdesi Kaur ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada kullanılan formülde bazı modifikasyonlar yapılarak hesaplanmıştır (41).

$$= \text{Inhibisyon (\%)} = (T1 - TC) / (T1 - T0) \times 100$$

T1 = H₂O₂ ile indüklenen DNA'daki kuyruk yoğunluğu

TC = H₂O₂ varlığında lenfosit hücrelerine uygulanan bitki ekstraktlarının DNA'daki kuyruk yoğunluğu

T0 = Negatif kontroldeki DNA yoğunluğu

3.2.5. Flavonoid içeriğinin HPLC ile Belirlenmesi

Tüm çalışmalar Agilent 1200 seri HPLC sisteminde yapılmıştır. Manuel enjeksiyonlu sistemde, Quartz Pompa ve UV dedektör kullanılarak bazı flavonoidler tek başlarına bazıları ise beraber aynı anda analiz edilmiştir. Analizlerde ACE 5 C18 250×4,6 mm id ters faz kolon kullanılmıştır. Kullanılan tüm flavonoidler standartları ve kimyasal malzemeler analitik saflıktadır (Sigma Aldrich, St. Louis, ABD, Merck GmbH, Darmstadt, Almanya ve Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Almanya).

QUERCETIN—KAEMFEROL

Kolon: C18 kolon **UV dedektör:** 280 nm

Mobil Faz: Su : HAc : MeOH yuzdeler sirasiyla 42 : 8 : 50 **Akis Hizi:** 1ml/min

BIOCHANIN

Kolon: C18 **UV:**262 nm

Mobil Faz: Su:Metanol:Asetonitril:Orto-H₃PO₄ yuzdeler sirasiyla 60:30:38:1

Akis Hizi:1ml/min

LUTEOLIN

Mobil faz Asetonitril:su (%0.1 HAc) 1:1 **Akis Hizi** 1ml/min **UV dedektor** 254 nm

Kolon C18

RUTIN HIDRAT

Mobil faz Asetonitril:Su yuzdeler sirasiyla 60:40 **Akis hizi:**0.5 ml/min

UV 280 nm **Kolon** C18

APIGENIN CATECHIN

Mobil faz Asetonitril:Su:Metanol yuzdeler sirasiyla 15:40:45 **Akis hizi:** 1 ml/min

UV 280 nm **Kolon** C18

4. BULGULAR

1. Antimikrobiyal aktivite tayini

Bu çalımanın amacı, *Pisolithus arhizus* ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla minimum inhibisyon konsantrasyon testi uygulanmıştır. Bu testte, ekstraktların mikroorganizma kültürleri üzerindeki minimum inhibe edici konsantrasyonu belirlenmiştir ve sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarda farklı inhibisyon konsantrasyonu gözlenmiştir.

Buna göre, *P.arhizus*’un etanol ekstraktları *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* patojenlerine karşı *Enterobacter aerogenes*’a karşı gösterdiği etkiden daha çok etki göstermiştir. *P.arhizus*’un her iki ekstraktı *S. typhimurium* ve *E. aerogenes* üzerinde aynı etkiyi gösterirken *E.coli* üzerinde etanol ekstraktına kıyasla daha az etki göstermiştir.

Tablo 1. *P.arhizus* mantarının çalıtılan mikroorganizmalar üzerindeki Minimum inhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri (µg/ml)

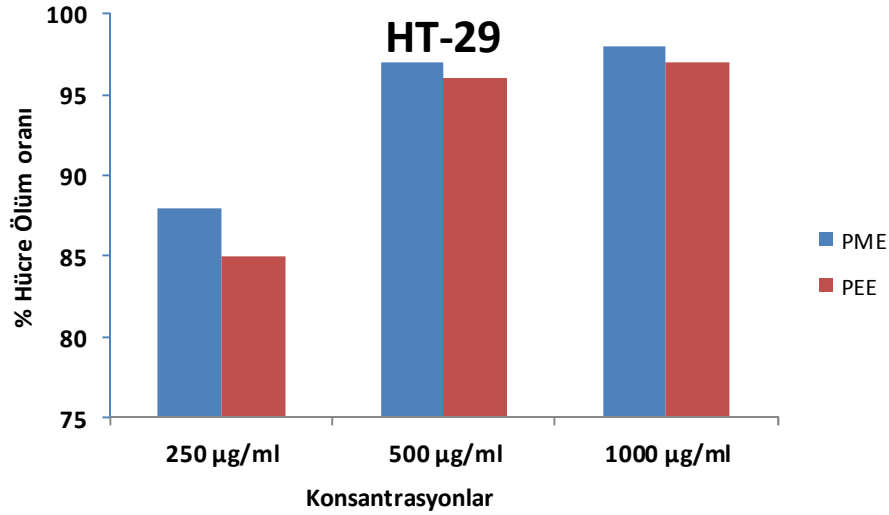
Minimum inhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (µg/ml)			
Mantar Ekstraktı	Test Mikroorganizmaları		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
PEE	250	250	500
PME	250	500	500

PEE: *P. arhizus* etanol ekstraktı

PME: *P. arhizus* metanol ekstraktı

2. Sitotoksite

Mantar ekstraktlarının HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi ekil 1’de verilmi tir.



ekil 1. *P.arhizus* mantarına ait ekstraktların HT-29 hücre hattında sitotoksite sonuçları

PEE: *P. arhizus* etanol ekstraktı

PME: *P. arhizus* metanol ekstraktı

Mantar örne inin her iki ekstraktınında HT-29 hücre hattında yüksek sitotoksiteye sahip oldu u tespit edilmi tir. 250 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %88 etanol ekstraktı %85, 500 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %97, etanol ekstraktı %96, 1000 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %98, etanol ekstraktı %97 oranında sitotoksik etki göstermi tir. Bu oran konsantrasyon miktarı arttıkça do ru orantılı olarak artmı tır.

4. Genotoksisite Sonuçları

Çalı mamızda in vitro insan lenfositlerinde tek hücre jel elektroforez “COMET” yöntemiyle H₂O₂ tarafından olu turulan oksidatif DNA hasarına etkileri incelenmi tir. Bu çalı malar sonucu elde edilen veriler Tablo 3’ de ve Tablo 4’ de verilmi tir.

Tablo 2. *P.arhizus* ekstrelerinin insan lenfositlerinde olu turdu u DNA hasarı

Test Maddesi	Konsantrasyonlar (µg/ml)	Kuyruk Uzunlu u (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk DNA Hasarı (%)
Negatif Kontrol	ND	28,8 ± 0,02	0	0
Pozitif Kontrol H ₂ O ₂ (50 µM)	ND	74 ± 1,95	18 ± 0,01	54
PEE	500	28,56 ± 0,39	0	0
	1000	30,03 ± 1,5	0,01 ± 0,01	0,39
PME	500	26,6 ± 1,4	0,1	0,1
	1000	31,4 ± 0,8	0,3 ± 0,0	0,2

ND: Tespit edilememi tir.

PEE: *P. arhizus* etanol ekstraktı

PME: *P. arhizus* metanol ekstraktı

Tablo 3. H₂O₂ ile indüklenen *P.arhizus* ekstrelerinin hasarlı DNA üzerine etkisi

Test Maddesi	Konsantrasyonlar (µg/ml)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk DNA Hasarı (%)	% inhibisyon
Negatif Kontrol	ND	28,8 ± 0,02	0	0	ND
Pozitif Kontrol H₂O₂ (50 µM)	ND	74 ± 1,95	18,00 ± 0,01	54	ND
PEE+ H₂O₂	500	39,06 ± 1,00	8,06 ± 0,3	24,00	56
	1000	30,00 ± 0,8	5,6 ± 0,5	17,39	68
PME+ H₂O₂	500	46,4 ± 1,4	9,6	29,1	49
	1000	32,3 ± 0,18	6,3	19,2	64

ND: Tespit edilememi tir.

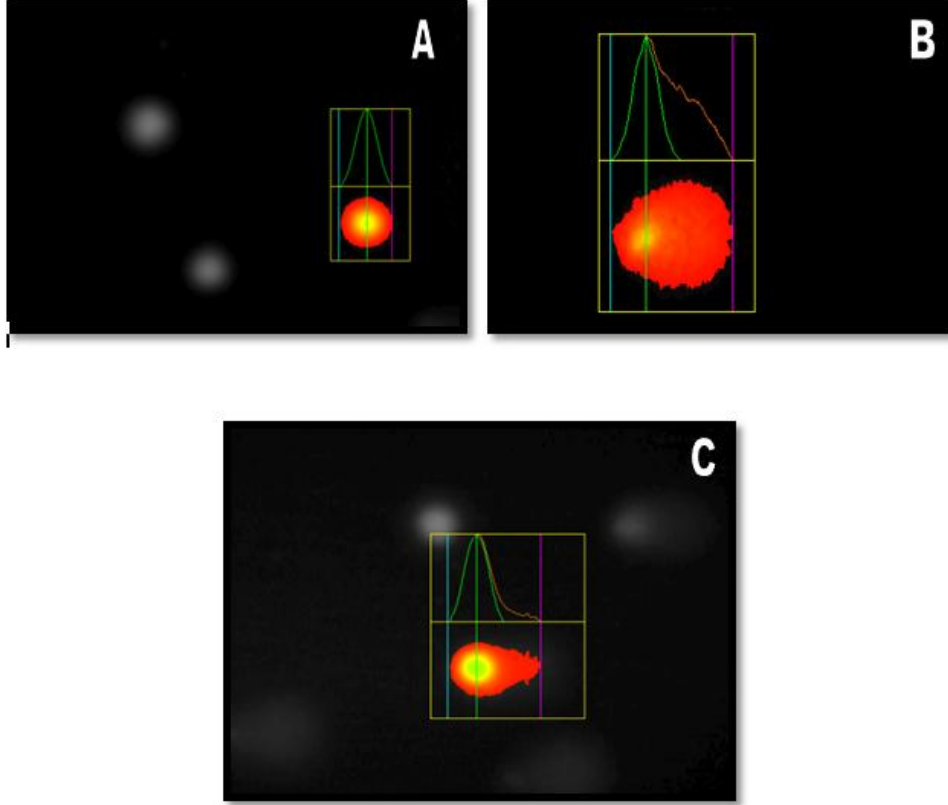
PEE: *P. arhizus* etanol ekstraktı

PME: *P. arhizus* metanol ekstraktı

P. arhizus etanol ve metanol ekstraktlarının genotoksik etkisi incelendi inde bu ekstraktların 500-1000 µg/ml konsantrasyonları arasında herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmi tir (Tablo 2). Mantar ekstraktlarının pozitif kontrole (H₂O₂) göre artan konsantrasyonlarda genetik hasarı koruyucu etki gösterdi i görülmü tür. Kuyruk DNA hasarındaki azalmaya göre en yüksek azalma *P.arhizus* etanol (% 17,39) ve metanol ekstraktı (% 19,2) ve genotoksik etki bakımından da *P. arhizus* etanol (% 68) ve metanol ekstraktı (% 64) oranında DNA hasarını koruyucu etki oldu u tespit edilmi tir.

P. arhizus etanol ve metanol ekstraktları insan lenfosit hücrelerine kar ı gösterdi i antigenotoksik etkisinin comet testi ile görünümü ekil 2’de verilmi tir. Kontrol grubunda hasarsız DNA’lar görünmekte iken, H₂O₂ uygulaması sonucu çok hasarlı DNA’ların olu tu u

görülmektedir. Ayrıca mantar ile muamele olan lenfosit hücreleri. DNA hasarının (+) kontrol gurubuna göre azaldı ı görülmektedir.



ekil 2. A. (-) Kontrol Grubu. Hiçbir ey muamele edilmemi lenfosit hücreleri. B. (+) Kontrol grubu. 50 µM H₂O₂ ile muamele edilmi lenfosit hücreleri. C. Mantar ile muamele olan lenfosit hücreleri. DNA hasarının (+) kontrol gurubuna göre azaldı ı görülmektedir.

5. HPLC Sonuçları

Mantar örneğinin etanol ekstraktında kaemferol (14,32 mg/g) ve Biochanin A (0,81 mg/g) metanol ekstraktına göre daha yüksek oranda tespit edilirken luteolin (4,90 mg/g), rutin (40,12 mg/g), quercetin (mg/g) ve catechin (2,57 mg/g) metanol ekstraktında daha yüksek

Ekstrakt	Luteolin mg/g	Rutin mg/g	Kersetin mg/g	Kemferol mg/g	Biyokanin A mg/g	Apigenin mg/g	Kateşin mg/g
PEE	3,56	34,05	1,95	14,32	0,81	3,34	1,28
PME	4,90	40,12	6,18	11,61	0,78	ND	2,57

miktarlarda tespit edilmiştir. Apigenin (3,34 mg/g) ise sadece etanol ekstraktında tespit edilmiştir.

Tablo 4. *P.arhizus* mantarına ait ekstraktlarda çeşitli flavonoidlerin HPLC ile analiz sonuçları

ND: Tespit edilememiştir.

PEE: *P. arhizus* etanol ekstraktı

PME: *P. arhizus* metanol ekstraktı

5. TARTI MA VE SONUÇ

Bu çalı manın amacı, *P. arhizus* mantarına ait ekstraktların antimikrobiyal, sitotoksisite ve genotoksisite ile flavonoit içeri i aktivitesinin incelenmesidir. Bu amaçla antimikrobiyal aktivite için ekstraktların mikroorganizma kültürleri üzerindeki minimum inhibe edici konsantrasyonu belirlenmi tir ve sonuçlar Tablo 1' de verilmi tir. Farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarda farklı inhibisyon konsantrasyonu gözlenmi tir. Buna göre, *P.arhizus*'un etanol ekstresi ba ırsak patojeni olarak bilinen *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* patojenlerine kar ı *Enterobacter aerogenes*'a kar ı gösterdi i etkiden daha çok etki göstermi tir. *P.arhizus*'un her iki ekstresi *S. typhimurium* ve *E. aerogenes* üzerinde aynı etkiyi gösterirken *E.coli* üzerinde etanol ekstresine kıyasla daha az etki göstermi tir.

Yapılan literatür ara tırmasında *P. arhizus* türüne ait antimikrobiyal etki çalı malarına rastlanılmamı tir. Fakat di er mantar türlerinin antimikrobiyal etkilerine ili kin çalı malar mevcuttur. *G. lucidum*'un metanol ve etanol ekstraktlarının bir gram (+), iki gram (-) ve iki maya üzerine antimikrobiyal etkisinin yapıldı ı bir çalı mada metanol ekstraktlarının *C. glabrata* üzerine referans antibiyotikten daha yüksek inhibe edici etkisinin oldu u, etanol ekstraktlarının ise *E. coli*, *B. subtilis* ve *S. enteritidis* patojenlerine kar ı antimikrobiyal aktivite gösterdi i bildirilmi tir (42).

Morchella elata, *Morchella conica*, *Terfezia claveryi* mantarlarının aseton ekstraktlarının bazı gram pozitif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*) ve maya kültürleri (*Candida glabrata*, *Candida albicans*) üzerine disk difüzyon metodu kullanılarak antimikrobiyal etkilerinin ara tırıldı ı bir çalı mada, en yüksek inhibisyon etkiye *E.coli* üzerine *M.conica* ekstraktının, en dü ük inhibisyon etkiye ise *C. glabrata* üzerine *M. elata* ekstraktının sahip oldu u tespit edilmi tir (43).

Gerasimenya ve arkadaşları (2003), Rusya'nın Moskova kenti yakınlarından topladıkları *P.ostreatus* 'a ait 14 suun antimikrobiyal aktivite denemelerinde makrofunguslara ait apka ve misel formlarını kullanımlar ve sonuç olarak her iki formun etanol ekstrelerinden apkada orta düzeyde antifungal etkinin miselde ise yüksek düzeyde antibakteriyal etkinin var olduğunu rapor etmişlerdir (44).

Efremenkova ve arkadaşları (2002), Rusya'nın farklı bölgelerinden topladıkları *Coprinus genusuna* dahil altı farklı türe ait 14 tür üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada *C. digitalis* tüm su lara ait misellerin etanol ekstreleri test mikroorganizmaları üzerinde denenmiş ve türüne ait misellerin geniş bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli *S. aureus* (MRSA) ve glikopeptid türü antibiyotiklere dirençli *Leuconostoc mesenteroides* üzerinde de etkili olduğunu rapor edilmiştir (45).

Kalyoncu ve arkadaşları (2010), bazı yabancı makrofungus miselleri üzerine yaptıkları çalışmada miselleri kullanılan 21 tane makrofungus türlerinin çoğunun antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını veya zayıf aktivite gösterdiğini saptamıştır. En yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip tür olarak *G.lucidum* (Curtis) P. Karst belirlenmiştir. Bu tür test mikroorganizmalarının çoğu üzerinde farklı düzeylerde inhibisyon etkisi göstermiştir. Inhibisyon gösterdiği mikroorganizmalar üzerindeki etkisi standart antibiyotiklerin bazılarından daha iyi, bazılarında ise yakın derecelerde olduğunu bildirmişlerdir (30).

Tricholoma terreum (Fr) Kummer' den elde edilen ekstrelerin bazı Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, fakat kullanılan maya kültürlerine karşı ise antagonistik bir aktiviteye sahip olmadıklarını tespit etmişlerdir (46).

G. japonicum mantarının miselinden elde edilen esansiyal yaın kimyasal bileşenlerinin ve antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği çalışmada *G. japonicum* tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Methicillin dirençli *S.aureus*, *K.pneumonia* ve *Enterobacter cloacae* 'ya karşı kontrol antibiyotik olan Levofloxasinden oldukça yüksek bakteriyostatik ve bakteriosidal etki gösterdiği rapor edilmiştir (47).

Macrolepiota procera makrofungusundan elde edilen çe itli ekstrelerin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere ve bazı mayalara karşı antagonistik etki gösterdi ini belirlemi lerdir. Özellikle *E. aerogenes*, *C. utilis* ve *Hansenula sp.* Üzerine oldukça etkili oldu unu tespit etmi lerdir (48).

Bu çalı mada mantar öne inin her iki ekstraktının kolon kanseri üzerine etkisi ara tırılmı tır. Mantar örne inin her iki ekstraktında HT-29 hücre hattında yüksek sitotoksiteye sahip oldu u tespit edilmi tir. 250 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %88 etanol ekstraktı %85 kanser hücrelerini öldürmü tür. Bu oran konsantrasyon miktarı arttıkça do ru orantılı olarak artmı tır. 500 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %97, etanol ekstraktı %96, 1000 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktı %98, etanol ekstraktı %97 oranında sitotoksik etki göstermi tir (ekil 1).

Günümüzde pek çok mantar türünün antikanser etkisinin oldu u bilinmektedir. Özellikle *Agaricus*, *Agrocybe*, *Boletus*, *Ganoderma*, *Geastrum*, *Lactarius*, *Phellinus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Russula*, *Termitomyces*, *Ascomycetes*, *Morchella*, *Agaricus*, *Ganoderma*, *Phellinus* cinslerine ait türlerin antitümör; *Agrocybe*, *Trametes* ve *Ganoderma* cinslerine ait türlerin ise antikanserojen etkinlikleri bulundu u rapor edilmi tir (49).

Kawaratake (*Trametes versicolor*) mantar türü, polisakkarit-K (PSK) için kaynaktır. 1970'lerin sonlarında geli tirilen *T. versicolor* mantarının krestin etken maddesinden elde edilen ilaç Japonya'da en popüler kanser ilaçlarından biri olarak bilinmekte olup mide ve di er kanser türlerinin tedavisi amacıyla oral yolla alınmaktadır. Mide kanseri tedavisinde kullanımı 1980'li yıllarda onaylanan lentinan maddesinin kayna ı Shiitake mantarıdır. Oral yolla alındı ında emilimi zayıf oldu u için enjeksiyon yoluyla alınmalıdır. Suehirotake (*S. commune*) mantarı bo az kanseri tedavilerinde enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır (50).

Mantarlardan izole edilen ve *G. lucidum*'da % 40,6 düzeyinde bulunan -glukan yardımcı T hücrelerinin ço almasına ve üremesine uyarıcı etki yaparak enfekte hücrelerin yok edilmesini sa lamaktadır. Farelerle yapılan testlerde akci er kanserinin üzerine çok ba arılı bir tedavi etkisi oldu u gösterilmi tir (51). Kemopreventif ajan olarak ve özellikle peroksit anyonlarının hasarını neredeyse tamamen ortadan kaldırarak kansere karşı koruyucu etki yaptı ı da gösterilmi tir. Mizushina ve arkadaş ları, bu mantarın meyvelerinden benzer iki – tipi DNA polimeraz inhibitörü izole etmi lerdir (52-54). *Ganoderma* meyvalarının alkol ekstraktları T- 4

lösemi hücrelerini belirgin şekilde azaltmaktadır (in vitro ko ulla rda) (55). Kısacası bu mantarın içerdiği bileşimlerin bir yandan kanser hücrelerinin gelişmesine karşı sitotoksik etki yaparken aynı anda konak organizmanın normal hücrelerini de immün davranış bakımından destekleyici ve aktive etmektedir. Yüksek dozlarda alınsa bile sağlıklı hücrelere asla toksik etki yapmadığı gösterilmiştir (56).

Dünyada, erkeklerde ilk üç sıra kanser türü, prostat, akciğer ve kolon iken kadınlarda ilk üç kanser türü meme, kolon ve akciğer kanseridir ve ülkemizde ölüm nedenleri sırasında 2.sırada yer alan kanser hastalığının, hem dünyada hem de ülkemizde 2015 yılından itibaren 1. Sıradaki ölüm nedeni olacaktır tahmin edilmektedir (49). Bu bağlamda kanser tedavilerine yönelik çalışmalarda etkili ve doğal bileşimlerin keşfinin önemi artmaktadır. Çalışmamızda doğal olarak yetişen bu mantarın her iki ekstraktında yüksek miktarda kolon kanser hücre hattında antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Genotoksisite genel anlamda, genetik materyal üzerinde olabilecek zararlı etkiler olarak bilinmektedir. Bu yüzden genotoksisite testlerinde DNA'da oluşan değişiklikler belirlenir. Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, evresel etkenlerin (UV, irradasyon), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır. Bu testler 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok in-vivo ve in-vitro genotoksisite testi geliştirilmiştir. Hücrelerde DNA ile etkileşime girerek olumsuz etki gösteren maddeler genotoksik maddeler olarak adlandırılır. Bu olumsuz etkiler; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductlarıdır. Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişikliklerine yol açmakta ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser olabilmektedir. Son yıllarda gelişen comet assay tekniği DNA hasarını ve tamirini belirlemek için hassas bir genotoksisite testidir (57,58). Bu teknik DNA tek zincir kırıklarını ve tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini gösteren hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul görmektedir (59-61).

Bu çalışmada *P. arhizus* etanol ve metanol ekstraktlarının genotoksisite ve antigenotoksisite etkisi comet yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada temel amaç, mantarın DNA hasarı

olu turup olu turmadı mı veya H₂O₂ indüklenmesi ile olu turacak bir DNA hasarını ne derecede engelleyebildi ini tek hücre DNA' larının elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz etmek olmu tur. Çünkü do al olan her maddenin her zaman güvenilir olmadı ı yapılan çalı malar sonucu anla ılmı tır. Bu yüzden yüksek etki gösterdi i belirlenen do al bir maddenin endüstride kullanılmadan önce güvenilirli inin test edilmesi gereklidir. *P. arhizus* etanol ve metanol ekstraktlarının genotoksik etkisi incelendi inde bu ekstraktların 500-1000 µg/ml konsantrasyonları arasında herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmi tir. Mantar ekstraktlarının pozitif kontrole (H₂O₂) göre artan konsantrasyonlarda genetik hasarı koruyucu etki gösterdi i görülmü tür. Kuyruk DNA hasarındaki azalmaya göre en yüksek azalma *Pisolithus arhizus* etanol (%17,39) ve metanol ekstraktı (% 19,2) ve genotoksik etki bakımından da *Pisolithus arhizus* etanol (% 68) ve metanol ekstraktı (% 64) oranında DNA hasarını koruyucu etkisi oldu u tespit edilmi tir.

Makrofunguslarda antioksidan aktiviteyi sa layan sekonder metabolitlerin fenolik bile ikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları bildirilmi tir (61).Çalı mamızda antioksidan ve antikanser özellikleri oldu u bilinen flavonoit bile iklerden luteoin, rutin, kemferol, kate in, apigenin, biyokanın, kersetinin miktarı analiz edilmi tir. Mantar örne inin etanol ekstraktında kemferol (14,32 mg/g) ve Biyoanin A (0,81 mg/g) metanol ekstraktına göre daha yüksek oranda tespit edilirken luteolin (4,90 mg/g), rutin (40,12 mg/g), kersetin (mg/g) ve kate in (2,57 mg/g) metanol ekstraktında daha yüksek miktarlarda tespit edilmi tir. Apigenin (3,34 mg/g) ise sadece etanol ekstraktında tespit edilmi tir (Tablo 4). Bu çalı manın sonucu literatürdeki mantarlara ait fenolik bile en analizleri ile uyum sa layarak yüksek miktarlarda flavonoit içeri e sahip oldu unu göstermi tir.

Yapılan birçok yeni ara tırmada makrofungusların antioksidan ve antikanser aktiviteye sahip oldu u bulunmu tur. Makrofunguslarının aktif metabolit bakımından zengin olması, onun antibakteriyel etkisinin yanı sıra antioksidan ve antikanser olarak da kullanılmasını sa lamı tır. Makrofunguslarının bünyesinde barındırdı ı kendine özgü ve çok çe itli metabolit grupları onların terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik ara tırmalar farklı makrofunguslarının sitotoksik, antifungal ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını göstermi tir (62).

P. arhizus'un etanol ve metanol ekstralarının yüksek miktarda toplam fenolik ve flavonoit içerdiği daha önceki BAP projemiz kapsamında bildirilmiştir. Buna göre, etanol ekstresinin toplam fenolik içeriği 130,96 mgGAE/g iken toplam flavonoit içeriği 109,33 mgRE/g, metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği 183,36 mgGAE/g iken toplam flavonoit içeriği 111,90 mgRE/g olarak tespit edilmiştir (63).

C. Rutilus mantar ekstralarında toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokateol ve kersetine ester olarak bildirilmiştir. Mantarın bir mg etil asetat ekstresinde 129,31 µg fenolik bileşik bulunurken, 30,03 µg flavonoit yapıları bileşiklerin olduğu hesaplanmıştır (64).

T. fracticum yenilebilir mantarının fenolik ve flavonoit yapıları bileşiklerin miktarlarının araştırıldı bir çalıma mada, toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokateol ve kersetine ester olarak belirlenmiştir (65).

Çeşitli yenilebilir mantarlarla yapılan bir çalıma mada, 14 fenolik bileşen analiz edilmiştir. Buna göre 14 bileşenden sadece rutin ve kersetin tespit edilememiştir diğer 12 tanesinin kromatografik özellikleri ve absorpsiyon spektraları standart maddelerle karşılaştırılarak miktar tayinleri yapılmıştır. *Pleurotus eryngii* ve *Auricularia auricula-judae* mantarlarının su ve metanol ekstraktlarından farklı tiplerde fenolik bileşikler tespit edilmiştir. P-hidroksibenzoik asit ve siringik asit her iki mantarda ve tüm ekstraktlarında tespit edilmiştir. Ferulik asit sadece *P. eryngii* mantarının metanol ekstraktında 6 µg/g olarak bulunmuştur. *A. auricula-judae* mantarının metanol ekstraktının HPLC analizleri gallik asit, katekin, p-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, siringik asit, vanilin, p-kumarik asit, sinapinik asit, rosmarinik asit, luteolin ve sinnamik asit olmak üzere 11 tip fenolik bileşen içerdiğini göstermektedir. Sulu ekstraktında metanol ekstraktından farklı olarak p-kumarik asit, rosmarinik asit ve sinnamik asit hariç diğer bileşenler tespit edilmiştir (66).

Bu çalıma göstermektedir ki, gelecekte makrofungus ekstraktlarındaki etkin maddeler tespit edildi takdirde, günümüzün büyük problemi olan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı dirençliliğine çözüm olarak, ayrıca doğal antioksidan ve antikanser bileşiklerinin saptanması ve saf olarak elde edilmesi ile bu bileşiklerin ilaç sektöründe kullanılması, makrofungusları

antimikrobiyal ve antikanser ilaç üretiminde iyi ve yeni kaynaklar olarak karımıza çıkarabilir. Sonuç olarak makrofunguslar birçok hastalığın oluşumu, ilerlemesi ve tedavisinde umut verici olabilir ve yaşlanma etkeni olan oksidatif stres baskılanarak yaşlanma süreci yavaşlatılarak daha uzun ve daha sağlıklı bir yaşam mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

1. Aydın E. Bazı *Salvia* Genusu Üyelerinin *Acanthamoeba Castellanii* Tedavisindeki Kullanım Potansiyelleri ve Sitotoksik Aktivitelerinin Ara tırılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2008
2. Çolak E., Bazı Pleurokarpik Makrofunguslarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin ncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ni de Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ni de 2010.
3. Demir M.S., Çesitli makrofunguslara ait fruktifikasyon, vejetatif misel ve eksopolisakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalı malar, (Yüksek Lisans Tezi), Eski ehir Osmangazi Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü (2007).
4. Breene W. Nutritional and Medicinal Value of Speciality Mushrooms. Journal of Food Production, 1990; 53: 883-894.
5. Kalyoncu F, Oskay M, Kalmı E. Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, 2010; 1 (1): 1-8.
6. Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D.L., Nair, M.G., Health-Beneficial Qualities of the Edible Mushroom, *Agrocybe aegerita*, Food Chemistry, 108, 97–102, (2008).
7. Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R. Medicinal Mushrooms: Their Therapeutic Properties and Current Usage with Special Emphasis on Cancer Treatments. Cancer Research, UK, 2002.
8. Szefer P., Mineral Components in Foods, In: Szefer P, Nriagu JO (eds) Chemometric techniques in analytical evaluation of food quality, CRC Press, Taylor & Francis, London, (2007).
9. Dulger B., Yılmaz F., Gucin F., Antimicrobial activity of some *Lactarius* species , Pharmaceutical Biology, 40, 304–306, (2002).
10. Duman R., Do an H.H., Ate A., *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray makrofunguslarının antimikrobiyal aktiviteleri, S.U. Fen Ed. Fak. Dergisi, 22, 19–24, (2003).

11. Solak M. H., Kalmis E., Saglam H., Kalyoncu F., Antimicrobial Activity of Two Wild Mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. And *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries Collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 20, 1085–1087, (2006).
12. Hatvani N., Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 71–74, (2001).
13. Sarangi I., Ghosh D., Bhutia S.K., Mallick S.K., Maiti T.K., Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* myceliaderived proteoglycans , *International Immunopharmacology*, 6, 1287–1297, (2006).
14. Dulger B., Arslan U., *Coriolus versicolor* (L. ex. Fr.) Quel makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi, , *Turkish Journal of Biology*, 23, 385–392, (1999).
15. Wang H., Ng T.B., Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* , *Peptides*, 25, 1-5, (2004).
16. Mau J.L., Tsai S.Y., Tseng Y.H., Huang S.J., Antioxidant properties of methanolic extracts of *Ganoderma tsugae*, *Food Chemistry*, 93, 641-649, (2005).
17. Solak M. H., Isiloglu M., Kalmis E., Allı H., *Macrofungi of Turkey*, Checklist, *Üniversiteliler Basımevi*, zmir, (2007).
18. Öztürk A ve Çopur ÖÜ. Mantar Bile enlerinin Terapötik Etkileri, *Bahçe Dergisi*, 2009; 38 (1): 19-24.
19. Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R. *Medicinal Mushrooms: Their Therapeutic Properties and Current Usage with Special Emphasis on Cancer Treatments*. Cancer Research, UK, 2002.
20. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in Edible Mushroom: an Inter-Species Comparative Study. *Food Chem*, 1999; 65: 477-482.
21. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed In Italy. *Food Chemistry*, 2001; 73: 321-325.
22. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.D., The pharmacological potential of mushrooms *eCAM*, 2, 285–299, (2005).
23. Solak M. H., Kalmis E., Saglam H., Kalyoncu F., Antimicrobial Activity of Two Wild Mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. And *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries Collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 20, 1085–1087, (2006).

24. Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L., Ganoderma lucidium and its Pharmaceutically Active Compounds, *Biotechnology Annual Review*, 13, 265–301, (2007).
25. White R.W., Hackman R.M., Soares S.E., Beckett L. A., Sun B., Effects of a Mushroom Mycelium Extract on the Treatment of Prostate Cancer. *Urology*, 60, 640–644, (2002).
26. Ng, T.B., 2004. Peptides and proteins from fungi. *Peptides* 25, 1055–1073.
27. Wang, H., Ng, T.B., 2006. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27, 27–30.
28. Wasser S. P, Weis AL. Medicinal Properties Of Substances Occurring In Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspective (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1999; 1: 31-62.
29. Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C., , Non-volatile components of several medicinal mushrooms, *Food Research International*, 34, 521–526, (2001).
30. Chang ST, Buswell JA. Mushroom Nutraceuticals. *World Journal of Microbial Biotechnology*, 1996; 12: 473-476.
31. Türko lu A, Kıvrak , Mercan N, Duru M. E, Gezer K, Türko lu H. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology*, 2006; 5 (11): 1146-1150.
32. Roberfroid M, Colderon PB. Free Radicals and Oxidation Phenomenain in Biological System. In: Roberfroid M, Colderon PB (eds), *University of Catholique De Louvain Brussels*, New York, 1995; p.11-32.
33. Türk Gıda Kodeksi Yonetmel i. Resmi Gazete, 1997. 23172.
34. Kotsonis FN, Burdock GA, Flamm WG. Food Toxicology. in "Casarett & Doull's Toxicology 6th Edition" Ed. C. D. Klaassen. . Mcgraw-Hill. New York, 2001; p.1049-1087.
35. Kahl R, Synthetic Antioxidants. Biochemical Actions and Interferece with Radiation, Toxic Compound, Chemical Mutagenes and Chemical Carcinogenes. *Toxicology*, 1984; 33: 185-228.
36. Wang, H., Ng, T.B., 2006. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27, 27–30
37. Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C., , Non-volatile components of several medicinal mushrooms, *Food Research International*, 34, 521–526, (2001).

38. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191, 1988
39. Noroozi, S., Mosaffa, F., Soltani, F., Iranshahi M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghigi, F., Behravan, J. Antigenotoxic effects of the disulfide compound persicasulfide A(PSA) on Rat Lymphocytes exposed to oxidative stress. *Planta Med*, 75:32-36 (2009).
40. Aksoy, H., Yılmaz S., Çelik M., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F.. Moniliformin mikotoksininin In Vitro genotoksik etkileri. *SAÜ Fen Edebiyat Dergisi*.(2008-II).
41. Kaur P., Walia, A., Kumar, S., Kaur S.. Antigenotoxic Activity of Polyphenolic Rich Extracts from *Aegle marmelos* (L.) Correa in Human Blood Lymphocytes and E.coli PQ 37. *Rec. Nat. Prod.* 3:1 68-75(2009).
42. Celik GY, Onbasli D, Altinsoy B, Allı H. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Ganoderma lucidum* Extracts Grown in Turkey. *Eur J Med Plants* 2014; 4(6): 709-722
43. Bekci H., Altinsoy B., Sarıkaya S., Onbaşıoğlu D., Yuvalı Çelik G., "Antimicrobial Activity of Some Macrofungi Collected From Kastamonu Province", *Kastamonu University J of Forestry Faculty* 2011;11(2):187-190.
44. Gerasimenya V.P., Efremenkova O.V., Kamzolkinina O.V., Bogush T.A., Tolstych I.V., Zenkova V.A., Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Extracts, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 127-132, (2002).
45. Efremenkova O.V., Ershova E.Y., Tolstych I.V., Zenkova V.A., Dudnik Y.V., Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the Genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (*Agaricomycetidae*), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5, 37-41, (2003).
46. Duman R., Doğan H.H., Ateş A., *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray makrofunguslarının antimikrobiyal aktiviteleri, *S.U. Fen Ed. Fak. Dergisi*, 22, 19–24, (2003).
47. Robison Tw, Murphy Jk, Beyer Ll, Richters A, Forman Hj. Depression Of Stimulated Arachidonate Metabolism And Superoxide Production in Rat Alveolar Macrophages

- Following *n Vivo* Exposure To 0.5 Ppm No2. *J. Toxicol. Environ. Health* 1993; 38: 273–92.
48. Dülger, B., Yılmaz, F., Gücin, F. (1998). *Macrolepiota procera* (Scop. ex.Fr.) Sing. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kükem Dergisi*, 21 (1), 7-12.
 49. Üstün O. Nutritional Value and Biological Effects of Macrofungi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68 (4): 223-40.
 50. Ooi, V. E. C. 2000. Medicinally important fungi. In *Proc 15th Int Congress Sci Cultivation of Edible Fungi*, vol. 1 & 2 (ed. L. J. L. D. Van Griensven), pp. 41-51. A. A. Balkema, Rotterdam, Maastricht. Ordinariat für Holzbiologie, Universität Hamburg, Hamburg, F.R. Germany
 51. Yun, T.K., S. H. Kim and Y.S. Lee, 1995. Trial of a New Medium-Term Model Using Benzo(a)pyrene induced *alaung* Tumor in Newborn Mice. *Anticancer Research* 15:839-846.
 52. Kim, K.C. and I.G. Kim, 1999. *Ganoderma lucidum* Extract Protects DNA from Sstrand Breakage Caused by Hydroxyl Radical and UV *r*radiation. *International Journal of Molecular Medicine* Sept;4(3): 273-277.
 53. Kim, H.S., S. Kacew and B.M. Lee, 1999. *n vitro* Chemopreventive Effects of Plant Ploysaccharides(*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* Aug. 20(8): 1637-1640.
 54. Mizushina, Y., L. Hanashima, T. Yamaguchi, M. Takemura, F. Sugawara, M. Saneyoshi, A. Matsukage, S. Yoshida and K. Sakaguchi, 1998. A Mushroom Fruiting Body-nducing Sultance *n*hibits Activities of Replicative DNA Polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Aug. 10; 249(1): 17-22.
 55. Lovy, A., B. Knowles, R. Labbe & L. Nolan, 1999. Activity of edible mushrooms against the growth of human T4 leukemia cancer cells, and *Plasmodium falciparum*. *Journal of Herbs, Species and Medicinal Plants*. 6(4):49-57.
 56. Kim, M.J. and Y.S. Kim, 1986. Studies on Safety of *Ganoderma lucidum*. *Korean Journal of Mycology* 14(1): 49-60
 57. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 60: 258-274
 58. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O' Neil, K.L.: The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59, 1995

59. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35:206-221, 2000
60. Tice, R.R., Andrews, P.W., Singh, N.P.: The single cell assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science*, 53: 291-301,1990
61. Achary, V. M.M., Jena, S., Panda, K.K. Panda, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310,2008.
62. Wang H., Ng T.B., Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* , *Peptides*, 25, 1-5, (2004).
63. Bazı Mantar Türlerinin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktivitelerinin ve Kitozan Üretimlerinin Belirlenmesi ", BAP Ara tırma Projesi, TSA-113580, 2014.
64. Çayan F. HPLC-DAD Analysis of Chemical Composition of Mushroom *Chroogomphus Rutilus* (Schaeff.) o.k. Mill and Investigation of Its Biological Activity. Mu la Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mu la, 2011.
65. Apaydın M. Determination of Antioxidant Activity and Chemical Compositions of *Tricholoma Fracticum* (Britzelm.) Kreisel Mushroom, Mu la Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Mu la, 2011.
66. Aslim B and Ozturk S. Phenolic Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Leucoagaricus leucothites* (Vittad.) Wasser. *J Med Food* 2011;14(11): 1419–24.