

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ MANTAR EKSTRAKTLARININ KOLOREKTAL
KANSER HÜCRE HATLARINDA GENOTOKSİK, APOPTOTİK,
SİTOTOKSİK ve GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Ahmet Yasin KELEŞ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2021

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2019-8184 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Ahmet Yasin KELEŞ tarafından hazırlanan “*Çeşitli Mantar Ekstraktlarının Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında Genotoksik, Apoptotik, Sitotoksik ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/2021

İmza

Prof. Dr. Yasin TÖLÜCE
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Halil ÖZKOL
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Doç. Dr. Mehmet GÖRBÜZEL
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Çeşitli Mantar Ekstraktlarının Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında Genotoksik, Apoptotik, Sitotoksik ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi*” başlıklı tezimin; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ahmet Yasin KELEŞ

Tarih:

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yardımını esirgemeyen her konuda sabrı, özverisiyle ve mesleki ahlakı ile bilgi yoluma ışık tutan çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE' ye

Tez çalışma serüvenimde bilgi birikimlerinden faydalandığım, her anlamda destek olan ve çalışmalarım için laboratuvar imkânlarını sonuna kadar kullanmama müsaade eden Anabilim Dalımızın değerli hocaları sayın Prof. Dr. Halil ÖZKOL ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN'e, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalından sayın Prof. Dr. Hasan YILMAZ hocama, Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Biyoloji Anabilim Dalından sayın Doç. Dr. Ali KELEŞ hocama ve Eczacılık Fakültesinden sayın Doç. Dr. Abdullah DALAR hocama,

Tez çalışmam ile ilgili resmi işlemlerimi yürüten Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tüm çalışanlarına

Çalışmam esnasında tez yazım ve laboratuvar çalışmalarında sürekli yanımda olan arkadaşım doktora öğrencisi Sedat KÖSTEKCİ' ye

Tez süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda öğrenim gören Selva Tufan, Uğur KARATAŞ, Hüda ELHAMMUD ve Merve TUNÇYÜREKLİ' ye

Hayatımın her anlamında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan canım anneme ve babama, abime ve kardeşlerime,

Bu araştırmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı ID:8184 tarafından verilen maddi destek için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

KELEŞ AY, Çeşitli Mantar Ekstraktlarının Kolorektal Kansere Hücre Hatlarında Genotoksik, Apoptotik, Sitotoksik ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji, Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. Kolorektal kanser, dünyada akciğer ve meme kanserinden sonra en fazla tanı konulan üçüncü kanser türüdür. Son yıllarda kanser tedavisi araştırmalarında doğal bileşikler ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* ve *Inonotus hispidus* mantar ekstraktlarının HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücre hatları üzerinde oluşturdukları sitotoksik ve apoptotik etkiyi ve bu ekstraktların sebep oldukları DNA hasarını ve oksidatif stresi araştırmaktır. Bu doğrultuda mantar ekstraktlarının farklı dozları *in vitro* ortamda kolorektal kanser hücre hatları üzerine uygulanmış ve MTT deneyi ile IC₅₀ sonucu elde edilmiştir. IC₅₀ sonucuna göre, *Ganoderma lucidum lucidum* ekstraktının kullanılan bütün mantar ekstraktları arasında en etkili sitotoksikite değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. *Ganoderma lucidum* ekstraktının oksidatif stres üzerindeki moleküler etkisinin araştırmak için TAS, TOS ve NRF-2 seviyeleri, DNA hasarı üzerindeki etkisini belirlemek için DNA ladder test sonucu, hücre göçü (migrasyon) analizi için Scratch assay yöntemi ve hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini belirlemek için koloni analiz yöntemi kullanıldı. Elde edilen Sonuçlar, *Ganoderma lucidum* mantar özütünün hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve NRF-2'yi azalttığını, DNA hasarını indüklediğini, hücre göçünü yavaşlattığını ve oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmada, *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının hücresel DNA'ya zarar vererek hücre çoğalmasını azalttığı ve kolorektal kanser hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, DNA Hasarı, *Ganoderma lucidum*, Kolorektal kanser, Sitotoksikite.

ABSTRACT

KELEŞ AY, The Effect of Various Mushroom Extracts on Genotoxic, Apoptotic, Cytotoxic and Gene Expression in Colorectal Cancer Cell Lines, Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Medical Biology, Master's Thesis, Van, 2021. Colorectal cancer is the third most diagnosed cancer type in the world after lung and breast cancer. In recent years, natural compounds have come to the fore in cancer treatment research. The aim of this study was to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* and *Inonotus hispidus* fungal extracts on HT-29 and HCT-116 colorectal cancer cell lines and to search the DNA damage and oxidative stress caused by these extracts. Accordingly, different doses of mushroom extracts were applied to colorectal cancer cell lines *in vitro* and IC₅₀ result was obtained with MTT test. According to the IC₅₀ result, *Ganoderma lucidum* extract was found to have the most effective cytotoxicity value among the all used mushroom extracts. TAS, TOS and NRF-2 tests were used to investigate the molecular effect of *Ganoderma lucidum* extract on oxidative stress, DNA ladder test result was performed for determining DNA damage, Scratch assay method was applied for cell migration analysis, and colony assay method was used to assign colony formation potential of cells. The obtained results showed that *Ganoderma lucidum* mushroom extract reduces cell proliferation, colony formation and NRF-2 as well as induces DNA damage, slows cell migration and increases oxidative stress. In this study, it has been shown that *Ganoderma lucidum* mushroom extract reduces cell proliferation through damaging cellular DNA and has a cytotoxic effect in colorectal cancer cell lines.

Keywords: Apoptosis, DNA Damage, *Ganoderma lucidum*, Colorectal cancer, Cytotoxicity

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN	III
TEŞEKKÜRLER	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kolorektal Kanser	3
2.3. Kemoterapi	4
2.4. <i>Ganoderma lucidum</i>	4
2.5. Apoptoz	5
2.6. Sitotoksisite	6
2.7. Oksidatif Stres	7
2.8. NRF-2 (Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2).....	8
2.8.1. NRF-2'nin Kanser ile İlişkisi	9
2.9. Koloni Oluşumu	10
2.10. Hücre Göçü (Migrasyon)	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	11
3.1. Hücre Kültürü	11

3.2. Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması	11
3.3. MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	12
3.4. IC ₅₀ Değeri	13
3.5. Total Antioksidan Statüs (TAS) Ölçümü	13
3.6. Total Oksidan Statüs (TOS) Ölçümü.....	13
3.7. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü	14
3.8. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi	14
3.9. NRF-2 Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi	15
3.10. Koloni Formasyon Testi	15
3.11. Hücre Göçü Testi (Scratch Assay)	15
4. BULGULAR	17
4.1. MTT ile Sitotoksik Etkinin Bulguları	17
4.2. IC ₅₀ Değeri	30
4.3. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi	30
4.4. Oksidatif Stres Bulguları	32
4.5. NRF-2 Bulguları	39
4.6. Koloni Oluşum Sonuçları	41
4.7. Hücre Göçü Bulguları	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKÇA	49
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	54
EK1, Tez Orjinallik Raporu	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
bZIP	: Temel Lösün Fermuar Proteini
CO₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serumı
GLC	: <i>Ganoderma Lucidum</i>
IC₅₀	: Maksimum İnhibitör Konsantrasyonun Yarısı
KRK	: Kolorektal Kanser
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
NRF-2	: Nükleer Faktör Eritroid 2-İle İlişkili Faktör 2
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PBS	: Fosfat Buffer Saline Solüsyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakikada Dönüş Sayısı
TAS	: Total Antioksidan Statüs
TOS	: Total Oksidan Statüs

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Apoptozis regülasyonu	6
Şekil 2. p53 proteinin pro- ve antioksidan fonksiyonlar	8
Şekil 3. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	18
Şekil 4. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	18
Şekil 5. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	19
Şekil 6. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	19
Şekil 7. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	20
Şekil 8. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	20
Şekil 9. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	21
Şekil 10. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	21
Şekil 11. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	22
Şekil 12. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	22
Şekil 13. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	23
Şekil 14. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	23

Şekil 15. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	24
Şekil 16. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	24
Şekil 17. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	25
Şekil 18. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	25
Şekil 19. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	26
Şekil 20. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	26
Şekil 21. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	27
Şekil 22. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	27
Şekil 23. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik <i>Ganoderma lucidum</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	28
Şekil 24. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik <i>Inonotus hispidus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	28
Şekil 25. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik <i>Pleurotus eryngii</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	29
Şekil 26. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik <i>Pleurotus ostreatus</i> uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi	29
Şekil 27. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerindeki DNA hasarı	31
Şekil 28. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerindeki DNA hasarı	32

Şekil 29. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik TOS değeri grafiği	33
Şekil 30. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik TAS değeri grafiği	33
Şekil 31. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik OSİ değeri grafiği	34
Şekil 32. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik TOS değeri grafiği	35
Şekil 33. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik TAS değeri grafiği	35
Şekil 34. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik OSİ değeri grafiği	36
Şekil 35. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik TOS değeri grafiği	37
Şekil 36. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik TAS değeri grafiği	37
Şekil 37. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik OSİ değeri grafiği.....	38
Şekil 38. NRF-2 kit standart konsantrasyon grafiği	39
Şekil 39. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik NRF-2 grafiği	39
Şekil 40. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik NRF-2 grafiği	40
Şekil 41. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik NRF-2 grafiği	40
Şekil 42. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 21 günlük koloni oluşum grafiği	41

Şekil 43. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücresindeki 21 günlük koloni oluşum resmi	41
Şekil 44. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki 21 günlük koloni oluşum resmi	42
Şekil 45. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücresindeki hücre göçü	43
Şekil 46. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki hücre göçü	43
Şekil 47. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücresindeki hücre göçü grafiği	44
Şekil 48. <i>Ganoderma lucidum</i> ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki hücre göçü grafiği	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> ve <i>Inonotus hispidus</i> mantar ekstraktları ile muamele edilen HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarına ait 24, 48 ve 72 saatlik IC ₅₀ değerleri	30
--	----



1.GİRİŞ

Günümüzde kanserin gerçekleşen ölüm vakalarının en önemli nedenlerinden birisi olduğu düşünülmektedir ve dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak tahmin edilmektedir (Stewart ve Wild, 2014). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre 2018 yılında yaklaşık olarak 9,6 milyon ölüm meydana gelmiştir. Kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlerin yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. DSÖ'ye göre dünya da en sık rastlanılan kanserlerin başında ilk olarak akciğer kanseri (2.9 milyon vaka) gelmektedir, ikinci sırada meme kanseri (2.9 milyon vaka) ve üçüncü sırada ise kolorektal kanser (1.8 milyon vaka) bulunmaktadır (WHO, 2018).

Kolorektal kanser (KRK), dünyada en fazla tanı alan üçüncü malignite ve ikinci önde gelen kanser ölüm nedenidir. 2018'de yaklaşık 1.8 milyon yeni vaka ve yaklaşık 862.000 ölüme neden olmuştur (WHO, 2018). KRK, kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla ikinci ve üçüncü en sık görülen kanserdir. 2012 yılında 614.000 kadın (tüm yeni kanser vakalarının% 9.2'si) ve 746.000 erkek (yeni kanser vakalarının% 10'u) dünya çapında KRK tanısı konulmuştur (Globocan, 2012). Kanser de kullanılan tedavi yöntemleri ve ilaçlar teknolojinin ilerlemesi ile hızla gelişmektedir.

Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi günümüzde kanser tedavisinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Daha az sıklıkla hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri (biyoaktif maddeler) ve hedefe yönelik tedaviler kullanılır. Kanseri tedavisinde kemoterapi, kolon kanseri için çok önemli ve temel tedavi yöntemidir fakat ileri evre KRK' da başarı oranı çok düşüktür. Tüm bu nedenlerden dolayı KRK hastalarının tedavisinde yeni modellere ihtiyaç vardır.

Kanser tedavisi için kemoterapik uygulamalar elli yıldan fazla bir süre önce kliniğe girmiştir. Bu tedavi şekli testis kanseri ve bazı lösemiler gibi bazı tümörlerin tedavisinde başarılı olmasına rağmen, meme, kolon ve akciğerin yaygın epitelyal tümörlerinin tedavisinde yeterli düzeyde etkili olmamıştır. İdeal olarak, kemoterapötik ilaçlar spesifik olarak sadece neoplastik hücreleri hedef almalı ve normal hücrelere minimum "kollateral hasar" ile sitotoksik veya sitostatik etkileri indükleyerek tümör yükünü azaltmalıdır (Johnstone, 2002).

Yüzyıllar boyunca, doğal bileşikler esas olarak Doğu tıbbında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, günümüzde kullanılan kemoterapötiklerin birçoğu doğal kökene sahiptir. Örneğin vinkristin, irinotekan, etoposid ve paklitaksel bitki kaynaklı bileşiklerdir (Demain ve Vaishnav, 2011). Doğal bileşikler hücre içerisinde apoptozis, hücre döngüsü yolakları gibi birden fazla sinyal yolunu hedefleyebilir. (Ranjan ve ark., 2015). Uzun ömürlü mantar olarak da bilinen *Ganoderma Lucidum* (GLC), geleneksel Çin tıbbında iki bin yıldan fazla bir süredir kullanılan doğal bir bileşiktir (Wachtel-Galor ve ark., 2011).

Apoptozis programlı hücre ölüm sürecidir. Bu süreç içerisinde organizmada kimyasal değişiklikler olur, böylelikle hücre ölüme sürüklenir. Bu değişiklikler içerisinde nükleer fragmantasyon, hücrenin büzülmesi, kromatinlerin kondensasyonu, mRNA parçalanması ve kromozomal DNA'nın fragmantasyonu yer alır (Chen ve Lai, 2009).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile antioksidan savunma aktivitesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Şiddetli oksidatif stres, osteoporoz, kanser, yaşlanma ve Alzheimer, Parkinson ve amiyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok kronik ve dejeneratif hastalıkta rol oynamıştır (Yan ve ark., 2014).

Bu çalışmada mantar ekstraktının KKK hücre hatları (HT-29 ve HCT-116) üzerinde *in vitro* ortamda sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve gen ekspresyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, akabinde metastaz ile bu hücrelerin diğer doku, organlara taşınması ve taşınan hücrelerin bu yeni lokalizasyonlarda poliferasyonlarını hızla sürdürmeleri sonucunda doku, organ bütünlüğünü ve işlevselliğinin bozulması olayıdır. Neoplazm ve habis tümör terimleri kanser için kullanılan diğer yaygın isimlerdir (WHO, 2018).

Kanser 2018 yılında yaklaşık olarak 9.6 milyon insanın ölümüne neden olmuştur, bu açıdan bakıldığında dünyada en çok ölüme neden olan 6 etmenin ikinci sırasında yer almaktadır. Akciğer, prostat, kolon, mide ve karaciğer kanserleri erkeklerde en sık görülen kanser türleridir. Kolon, akciğer, servikal ve tiroid kanserleri kadınlar arasında en yaygın olanlarıdır (WHO, 2018).

Tümör baskılayıcı ve proto-onkogenler, kanser gelişiminden sorumlu olan genlerdir. Tümör baskılayıcı genlerde veya proto-onkogenlerde meydana gelen herhangi bir mutasyon genellikle kanserin ilerlemesine yol açmaktadır (Zender ve ark., 2006).

Tümör, malign ve benign olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Benign iyi huylu bir tümör olup lokalizedir, yayılım göstermez. Bu nedenle kanserojenik değildir. Malign kötü huylu tümör olup invaziftir, yayılım gösterir. Bu nedenle kanserojeniktir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Malign tümörler gelişimleri sırasında daha agresif özelliklere sahiptir (Duesberg ve ark., 2000). Tümör oluşumunun kökenine göre kanser beş ana gruba ayrılır. *Karsinoma*; ciltte veya diğer organları tutan dokularda başlayan kanser türüdür. *Sarkoma*; kemikler, kaslar, kıkırdak ve kan damarları gibi bağ dokularında oluşan kanser türüdür. *Lösemi*; kan hücrelerinde oluşan kemik iliği kanseridir. *Lenfoma* ve *myeloma*; immün sistem, merkezi sinir sistemi, beyin ve spinal kortta oluşan kanserlerdir (Yin, 2011).

2.2. Kolorektal Kanser

KRK, kolon ya da bağırsak kanseri olarak bilinir. KRK, dünyada en yaygın kanser türlerinden biridir ve dünya çapında akciğer kanserinden sonra kansere bağlı hastalık ve ölümler KRK'dan kaynaklanmaktadır (Siegel ve ark., 2016). KRK' in

görölme sıklığı toplumdan topluma değişim göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde KKK prevalansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Batı Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika’ da KKK’ in görölme sıklığı ve neden olduğu ölüm oranları yüksek iken, Afrika ve Asya toplumlarında bu oranlar daha da düşüktür (Tülüce ve ark., 2018).

Kötü beslenme alışkanlıkları, sigara ve alkol kullanımı, genetik yatkınlık, diyabet ve sedanter yaşam tarzı gibi faktörler KKK oluşumu olasılığı artırmaktadır (Siegel ve ark., 2014).

Günümüzde KKK standart tedavisinde cerrahi ve kemoterapi yöntemleri öne çıkmaktadır (Siegel ve ark., 2014). KKK ileri evresindeki hastalar genellikle kemoterapik ilaçlar ile tedavi edilir. Örneğın, yalnız 5-fluorouracil ya da oxaliplatin ve avastin gibi adjuvan ile kombine şekilde uygulanır (Cutsem ve ark., 2015).

2.3. Kemoterapi

Kanser tedavisinde sıkça kullanılan yöntemler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bunlara ek olarak hormon terapisi ve biyolojik yöntemler mevcuttur. Her bir tedavi yöntemin kendi içerisinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Baykara, 2016). Kemoterapi uygulamasının hedefi kemoterapötik ajanlar vasıtası ile kanserli hücreleri öldürmektir. Kemoterapi tedavisinde sitotoksik anti-neoplastik uygulamalar ön plandadır (Mian ve ark., 2016).

Son yıllarda inflamasyon, kanser, immün rahatsızlıklar, diyabet, bakteriyel ve viral enfeksiyonları gibi durumlarda fonksiyonel besinler başta olmak üzere alternatif uygulamaları araştırmacıların odak noktası olmuştur (Saxena ve ark., 2016). Ayrıca biyoaktif bileşikler de klinik ve klinik öncesi çalışmalarda kullanılmıştır. Biyoaktif bileşikler hücre döngüsünü durdurulmasını, angiogenesisin engellenmesi, immün yanıtının artırılması, apoptozisin indüksiyonu ve DNA hasarının önlenmesi gibi tümör eliminasyonunu teşvik eden çeşitli sinyalleri etkinleştirme yeteneğine sahiptir (Sheikh ve ark., 2017). Biyoaktif bileşiklerin biri de mantarlardır.

2.4. *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum’un tıbbi etkileri bundan 2500 yıl önce Uzakdoęu’da fark edilmiş ve mantar şifalı bir bitki olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dünya’da

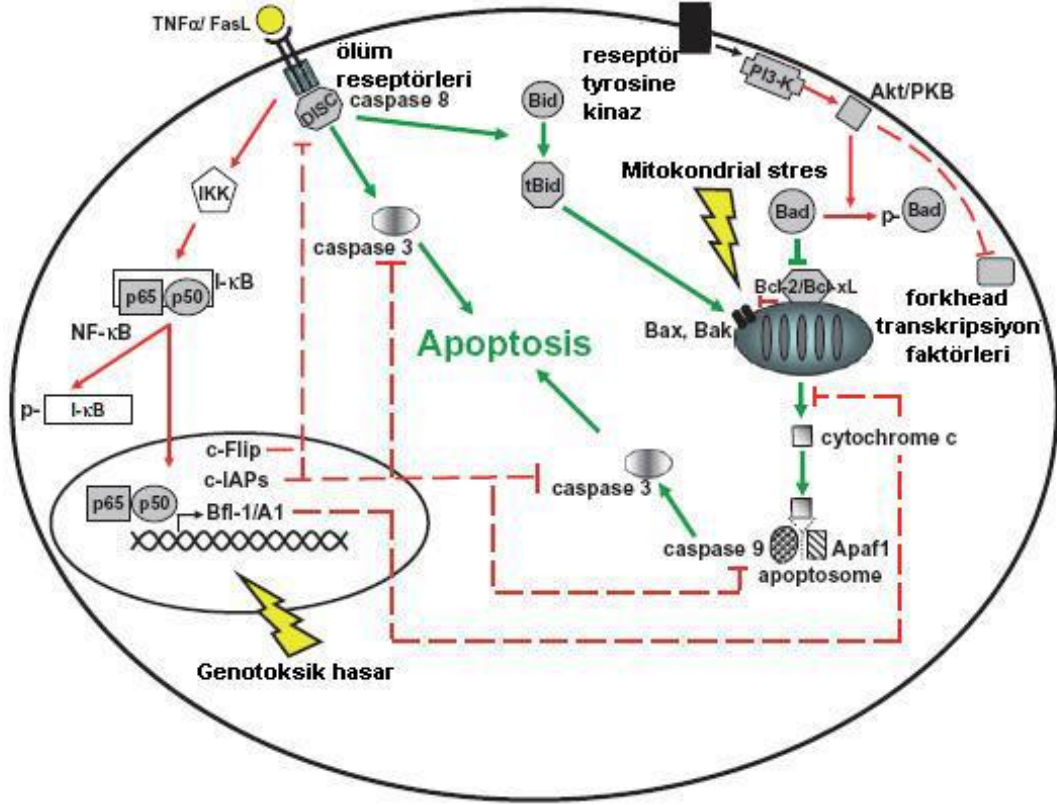
ölümsüzlük mantarı ülkemizde ise reishi ve ölümsüzlük mantarı olarak bilinmektedir. Ülkemizin Marmara, Karadeniz, Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde yayılım göstermektedir. Son yıllarda *Ganoderma lucidum*'un tıbbi etkisine yönelik olarak çok sayıda araştırma yapılmış ve bu çalışmaların ışığı altında *Ganoderma lucidum*'un antitümör, antibakteriyel, antiviral, antihiv, yaşlanmayı geciktirici ve bağışıklık sisteminini güçlendirmede etkili olduğu belirtilmektedir. *Ganoderma lucidum*'un içerisinde suda eriyen polisakkaritler, triterpenler, aminoasitler ve proteinler bulunur. Araştırmacılar en etkili maddesinin polisakkaritler ve triterpenler olduğunu ortaya koymuşlardır (Chen ve ark., 2004). *Ganoderma lucidum*'un sistematigi;

Alem	: Fungi
Filum	: Basidiomycota
Takım	: Polyporales
Familiya	: Ganodermataceae
Cins	: Ganoderma
Tür	: Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.

2.5. Apoptoz

Apoptoz çok hücreli canlılarda enerjiye bağımlı olarak düzenlenmiş programlı hücre ölümüdür. Apoptozis doku homeostasisının yanı sıra hastalıklı anormal hücrelerin yok edilmesinde kritik ve fizyolojik olarak rol oynar. Apoptozis hücresel stres ve hücre döngüsü bozukluğunda gelişmiş sinyalleri içeren bir uyarıcı tarafından başlatılabilir. Bilinen apoptoz araçları arasında kurulan etkileşimlere dayanarak memeli hücrelerinde iki klasik apoptotik sinyalleşme yolu ortaya çıkmıştır. İlki, apoptotik etkileşim yoluyla sinyal vermeyi içeren dışsal yoldur. Bu şekilde hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile ligandları uyarır, bu daha sonra kaspaz adaptör molekülleri aracılığıyla kaskede yapar. İkincisi içsel yoldur, büyüme faktörlerinin geri çekilmesiyle başlayan mitokondri tarafından yönetilir ve kemoterapi ilaçlarıyla tedavi edilir. Bu yolun aktivasyonu mitokondriden salınan sitokrom c'nin salınması, Apaf-1'in ve kaspazların aktivasyonunun tetiklenmesi ile başlatılır. Elde edilen verilere göre apoptozun birkaç sinyal yolu tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen dinamik bir süreçtir. Bu süreç kaspazların aktive edilmesi, Bcl-2 protein ailesinin seviyesinin artması ve lokasyonundaki

değişiklikleri içerir, içsel yolda apoptozis inhibitör ailesi (IAP) proteinlerinin seviyesi anahtar rol oynar. Her iki yolda apoptotik hücre ölümünü uyarır (Chen ve Lai, 2009).



Şekil 1. Apoptozis Regülasyonu (İnci ve ark., 2009)

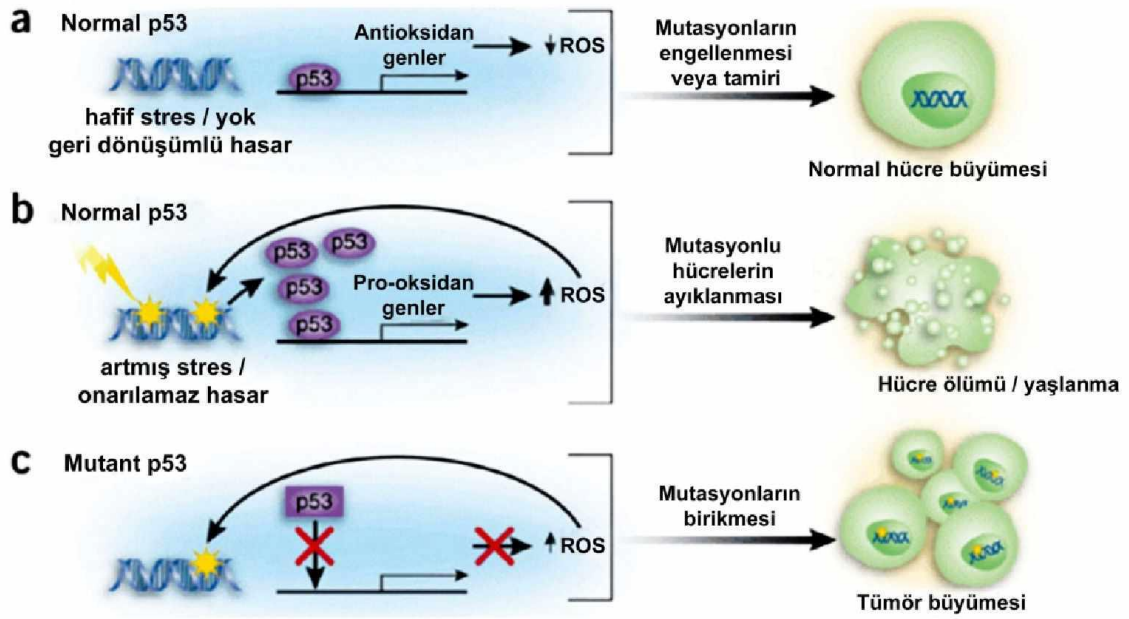
2.6. Sitotoksisite

Sitotoksisite deneyleri, hücre kültürü ve ilaç geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Sitotoksisite deneylerinin kullanılmasının amacı, uygulanacak olan maddenin sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını göstermektir. Hücre kültürü sitotoksisite çalışmalarının sıkça tercih edilmesinin sebebi deney hayvanları üzerinde yapılan deneylere alternatif olmasıdır. *in vivo* çalışmalarında alınan sonuçların hayvan deneylerindeki alınan sonuçlara uyum göstermesi ve deneylerin uygulanmasının kolay olmasıyla bu çalışmalar daha fazla tercih edilmektedir. Sitotoksisitede, uygulanan maddenin dozuna ve zamanına bağlı olarak hücrelerde değişik derecelerde zarar gerçekleşebilir. Sitotoksik maddeye maruz kalan hücreler, hücre ölüm mekanizmaları tarafından öldürülebilir ya da proliferasyon özelliğini kaybedebilir. Hücre canlılığının

tespit edilmesi için çok sayıda sitotoksosite testi vardır. Uygulanan sitotoksosite testlerinin çeşidi ne olursa olsun, temel olan çalışma sonundaki hücre/ölü hücre miktarının doğru bir şekilde belirlenmesidir. Sitotoksosite testlerinde genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Bilim insanları tarafından sıklıkla tercih edilen metot tetrazolyum testleridir (MTT, MTS, XTT, WST) (Tokur ve Aksoy, 2017).

2.7. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, doku veya hücrelerde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) konsantrasyonunun antioksidan kapasiteye aşması olayı olarak tanımlanır (Tez ve ark., 2005). Oksidatif stres, kanser gelişiminde rol oynar. Kanser de oksidatif stresi artırır. Kanser hücrelerinde oksidatif stres mitokondriyal disfonksiyon, artan ROS seviyeleri ve daha yüksek metabolik aktivite ile ilişkilidir. Dahası, kanser hücrelerindeki oksidatif stres, hücrel çoğalmayı uyarır, mutasyonları teşvik eder ve hücrenin antikanser maddelere karşı duyarlılığını değiştirir. Bazı kemoterapötik ajanlar tedavi sırasında hastaların hücrelerinde ROS oluşturabilir. ROS DNA hasarına neden olmakla birlikte kanser hücrelerinde apoptozun indüksiyonu için önemlidir. Antioksidanlar ROS oluşumunu engeller ve bu şekilde antioksidan kullanımının kanser hücrelerinde apoptozu önleyebileceğini söyleyebilir. Antioksidanların tedavi esnasında kemoterapik ajanların da kanserli hücrelerde oluşturacağı ROS'a karşı da etkili olabileceği, böylelikle kanser hücrelerinin apoptozunu önleyeceği öngörülmektedir. Bu nedenle kanser tedavisi sırasında aynı anda antioksidan kullanımından kaçınılması gerektiğine inanılmaktadır. Pek çok antikanser ilaç ROS'u indüklese de, bu ilaçların etkileri sadece serbest radikallere bağlı değildir. Kanser tedavisinde antioksidanların etkisi ile ilgili klinik çalışmalar sınırlı olmasına rağmen, deneysel çalışmalar antioksidan vitaminlerin kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini, anjiyogenezi ve metastatik yayılmayı önleyebileceğini göstermektedir. Bunun kanser tedavisinde adjuvanlar olarak antioksidanların potansiyel rolü üzerinde bir etkisi olabilir (Girek ve ark., 2019).



Şekil 2. p53 proteinin pro- ve antioksidan fonksiyonlar (Bensaad ve ark., 2005).

2.8. NRF-2 (Nükleer Faktör Eritroid 2 İle İlişkili Faktör 2)

İnsan Nükleer Faktör Eritroid 2-İle İlişkili Faktör 2 (NRF-2) geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. NRF-2, yaralanma ve enflamasyonun tetiklediği oksidatif hasara karşı koruma sağlayan ve antioksidan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen temel lösin fermuar proteinidir (bZIP). bZIP alanı, DNA bağlayıcı ökaryotik proteinde bulunur (Gold ve ark., 2012). Tüm hücrelerde inaktif halde bulunan ve NRF-2 aktivatörü tarafından serbest bırakılınca aktifleşen Nrf-2, apoptoziste rol alarak tümör önlenmesinde görevli olan önemli bir proteindir. Nükleer faktör 2 (NRF-2), Cap 'n' Collar transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir, ayrıca sitoprotektif (hücre koruyucu) genlerin indüklenebilen hücresel sisteminin ana regülatörüdür (Başak ve ark., 2017).

NRF-2 aktivitesinin kısmen Sitosolik protein Keap1 tarafından kontrol edildiği iyi bilinmektedir. Aktivatör (Keap1) ile serbest bırakılan Nrf-2 proteini hücre çekirdeğine geçerek insanlarda bulunan tüm antioksidan sistemin ana regülatörü olan insan antioksidan yanıt elemanını (hARE)'yi DNA'ya bağlar. Nrf-2 çekirdekte aktifleşerek katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin üretimini teşvik etmektedir. Üretilen bu antioksidanlar sayesinde de

yaşlanma ve hastalıklara karşı mücadele kolay hale gelebilmektedir. NRF-2 aktivasyonundan sorumlu olan genel olarak kabul edilen bir mekanizma, *Keap1*'de (İnsanlarda *Keap1* geni tarafından kodlanan bir proteindir) bulunan anahtar sensör sistein kalıntılarının ROS veya elektrofiller tarafından oksidatif veya kovalent modifikasyonunu içerir; bu, *Keap1*'in Nrf2 ve Cullin 3 (İnsanlarda *CUL3* geni tarafından kodlanan bir proteindir) ubikuitin ligaz kompleksi ile etkileşimini bozar (Kobayashi ve ark., 2004). *Keap1*'den serbest bırakıldığında, Nrf2 çekirdeğe göç eder, burada küçük bir Maf proteini ile etkileşime girer. Elde edilen kompleks, antioksidan cevap elementine (ARE) bağlanır, böylece antioksidan enzimleri ve diğer sitoprotektif proteinleri kodlayan bir genin ekspresyonunu harekete geçirir ve transkripsiyon başlar (Itoh ve ark., 1997).

2.8.1. NRF-2'nin Kanser ile İlişkisi

NRF-2, geleneksel olarak bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmiştir, çünkü, ksenobiyotikler ve oksidatif stres dahil olmak üzere, endojenik ve ekzojenik aktivitelere karşı ana hücrel savunma mekanizması olarak kabul edilir. Aslında, NRF-2, sadece normal hücrelerin değil, kanser hücrelerinin de sağ kalımını desteklemektedir. Bununla birlikte, bazı yeni çalışmalar NRF-2 yolunun hiperaktivasyonunun, normal ve malign hücrelerin hayatta kalmasını destekleyen, onları oksidatif strese, kemoterapötik ajanlara ve radyoterapiye karşı koruyan bir ortam oluşturduğunu göstermektedir. İnsan tümör numunelerinde ve hücre hatlarında, NRF-2 aktivasyonu, ilaç metabolizmasında yer alan genlerin ifadesini artırır. Böylece kemoterapötik ilaçlara ve radyoterapiye karşı direnci sürdürür. Bu nedenle, kanserde NRF-2 pozitif ve negatif etkiler arasındaki sınırları tanımlamaya yönelik büyüyen bir araştırma spektrumu vardır. Hücrel antioksidan savunmasının ana düzenleyicisi olan NRF-2'nin kanser gelişiminde iki ucu keskin bir kılıç gibi davranır. Örneğin; yapılan bir çalışmada, bir diyabet tedavi yaklaşımı ile ilişkili DPP4 inhibitörlerinin, ROS seviyelerini düşürmek için antioksidan transkripsiyon faktörü NRF-2'yi aktive ederek metastatik kapasiteyi arttırdığını göstermektedir (Başak ve ark., 2017).

2.9. Koloni Oluşumu

Koloni oluşturma veya klonojenik tahlil, tek bir hücrenin klonal genişleme yoluyla büyük bir koloni halinde büyüme kapasitesini incelemek için *in vitro* kantitatif bir tekniktir (Rajendran ve Jain, 2018).

2.10. Hücre Göçü (Migrasyon)

Göç deneyleri, *in vitro* olarak tümör hücrelerinin invazif ve metastatik potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak, yara veya çizilme deneyi, epitel tabakalarının hücrelerden temizlenmiş alanına göçünü değerlendirmek için kullanılır (Peplow ve Chatterjee, 2013).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılmış olan stok hücre hatları daha önce Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, Anabilim dalında mevcut olup ATCC (American Type Culture Collection)'den önceki yıllarda ticari olarak temin edilmiştir. Deneylerin gerçekleştirilmesi için kolorektal kanser hücre hatları olan HT-29 ve HCT 116 kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler ise %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80 °C'lik derin dondurucuda kısa süreli veya uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

Hücre sayımı için hematositometre lameli kullanıldı. Bunun için besiyeri uzaklaştırılan hücreler 1XPBS ile yıkandı. Üzerine tripsin ilave edilerek hücrelerin petri tabanından ayrılması sağlandı. Petri tabanından ayrılan bu hücreler içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik bir falkon tüpe aktarılıp karıştırıldı. Stoktan alınan hücreler 1/10 oranında besi yeriyle dilüe edildi. Buradan 100 µL alınarak thoma lamı üzerine bırakıldı. Inverted (ters) mikroskopta incelenen ve merkez alana düşen hücreler sayılarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle belirlendi.

$$\text{Hücreler / ml} = \text{her kare X ortalama seyreltme faktörü X 10}$$

Eşit hacimlerde hücre süspansiyonu uygun yoğunluklarda yeni plaklara aktarıldı.

3.2. Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada Doç. Dr. Ali keleş tarafından teşhis edilen ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü fungaryum laboratuvarında muhafaza edilen *Ganoderma lucidum* (Reishi, Ölümsüzlük mantarı), *Pleurotus eryngii* (Çaşır mantarı), *Pleurotus ostreatus* (Kavak, İstiridye mantarı) ve *Inonotus hispidus* (Kav mantarı) mantarları kullanılmıştır. Elde edilen mantarlar toprak üstü tüm kısımları

blender makinesinde toz haline getirildi. Toz haline getirilen mantarlardan 6 gram alınarak daha önceden hazırlanmış %80'lik etanolun içerisine konuldu, vorteks ile 5-10 dakika arasında çalkalandı. İyice karıştırılan örnekler 30 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulandı. Sonikasyon işleminden çıkarılan örnekler 10.000 rpm dönme hızında 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımda bulunan sıvı faz alındı ve filtrasyon yapıldı. Filtrasyon sonrasında elde edilen mantar sıvısı evaporatöre konularak içindeki etanol uçuruldu. Evaporatörden çıkan mantar ekstraktlarını liyofilizatör cihazına konularak içindeki su uçuruldu, böylece ham mantar ekstraktları elde edilmiş oldu. Kısa zaman içinde kullanılacak ise +4°C de eğer uzun zaman içerisinde kullanılacak ise -20°C de muhafaza edilmelidir.

3.3. MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) ile sitotoksik etkinin belirlenmesi için *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* ve *Inonotus hispidus* mantar ekstraktlarının etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturmaya prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan alınarak 25 cm³ flasklara ekilip, hemen hemen tüm yüzeyi kaplayınca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril petrilere eklendi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri atıldı ve mantar ekstraktları için farklı konsantrasyonları (5-200 µL) uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. Uygulanılan mantar ekstraktları her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklendi ve ardından 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri ortamdan uzaklaştırılarak önceden hazırlanmış 100 µl besi yerinde 0,05 µl MTT solüsyonu olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve ortalama 2-4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besi yeri uzaklaştırıldı, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi (Mosmann, 1983; Urgan, 2010).

3.4. IC₅₀ Değeri

Uygulanan mantar ekstraktlarının doza ve zamana bağımlı cevap eğrisi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad prism 8 Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak konsantrasyonlara karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek elde edildi. Doğrusal olmayan regresyon analizi yapıldı, bu çalışmada kullanılan HT-29 ve HCT-116 hücre türlerinde mantar ekstraktlarının IC₅₀ değerleri benzer işlemler yapılarak hesaplandı (Tülüce ve ark., 2019).

3.5. Total Antioksidan Statüs (TAS) Ölçümü

Total Antioksidan Statüs (TAS) ölçümleri ticari olarak satın alınan Rel Assay Total Antioksidan Statüs (TAS) kit ile ölçüldü. *Ganoderma lucidum* 5 µL'lik etkin dozunun kullanıldığı HT-29 ve HCT-116 KRC hücre hatlarında hazırlanan lizatlardan 18 µL kuyucuklara yüklendi. Numuneler hücrelere yüklendikten sonra üzerine R1 solüsyonu eklendi ve 660 nm'de ilk okuma yapıldı. İlk okumadan sonra numunelerin üzerine R2 solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir. Ardından 660 nm'de ikinci okuma yapılır. Sonuçlar, $\text{Sonuç} = [(\Delta \text{ AbsStd}) - (\Delta \text{ Ab örnek})] / [(\Delta \text{ Abs Std1}) - (\Delta \text{ Abs Std2})]$ formülü ile hesaplandı.

3.6. Total Oksidan Statüs (TOS) Düzeyi Ölçümü

Total Oksidan Statüs (TOS) ölçümleri ticari olarak satın alınan Real Assay Total Oksidan Statüs (TOS) kit ile ölçüldü. *Ganoderma lucidum* 5 µL'lik etkin dozunun kullanıldığı HT-29 ve HCT -116 CRC hücre hatlarında hazırlanan lizatlardan 45 µl kuyucuklara yüklendi. Numuneler hücrelere yüklendikten sonra üzerine R1 solüsyonu eklenir ve 530 nm'de ilk okuma yapıldı. İlk okumadan sonra numunelerin üzerine R2 solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Ardından 530 nm'de ikinci okuma yapıldı. Sonuçlar, $\text{Sonuç} = [(\Delta \text{ AbsStd}) - (\Delta \text{ Ab örnek})] / [(\Delta \text{ Abs Std1}) - (\Delta \text{ Abs Std2})]$ formülü ile hesaplandı.

3.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü

Oksidatif stresin bir göstergesi olarak gösterilen oksidatif stres indeksi (OSİ), total oksidan status düzeylerinin total antioksidan düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin OSİ hesaplanırken TAS düzeyleri 10 ile çarpılarak TOS düzeyleri ile birimler eşitlenir (Tülüce ve ark., 2017).

Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

OSİ değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / g}}{\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / g}} \times 10$$

3.8. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi

Apoptotik sürecin sonunda DNA'nın veya başka bir deyişle kromatinin parçalanması gerçekleşmektedir, bu olay birden fazla farklı aşamada meydana gelir (Suman ve ark., 2012). Apoptotik etki ve DNA hasarının tespiti için, DNA ladder kit protokolüne uygun olarak $5-10 \times 10^6$ hücre olacak şekilde, sitotoksosite testi ile *Ganoderma lucidum* ve cisplatin maddelerinin belirlenen etkin dozları kullanılarak 24, 48 ve 72 saatlik hücre ekimi yapıldı. Hücreler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktararak 2500 rpm dönüş hızıyla 5 dakika santrifüj edildi, akabinde süpernatant atıldı. Lizata 35 µL TE Lyzis Buffer tamponu eklendi ve vorteks yardımı ile homojen olana kadar karıştırıldı. 5µL Enzim A solüsyonundan eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. 37°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildi. 5 µL Enzim B solüsyonu eklendi ve 50°C'de 30 dakika yeniden inkübe edildi. 5 µL Amonium Asetat solüsyonundan eklendi, sonra üzerine -20°C'de soğutulmuş absolute etil alkolden 100 µl eklendi. Mikrosantrifüj tüpleri vortekslenerek -20°C'de 10-15 dakika bekletildi. 12.000 rpm dönüş hızıyla 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yavaşça atıldı. Karışım -20°C'de soğutulmuş %70'lik etil alkolden 500 µL eklenerek DNA pelleti yıkandı. 12.000 rpm dönüş hızıyla 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant yavaşça atıldı. DNA pelletinin kuruması için tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 30 µL DNA Süspansiyon

eklendi ve çözölme işlemleri yapıldı. Her bir örnekten alınan 15-30 µL'lik DNA 0.5 µg/ml etidium bromid içeren % 1-2'lik agaroz jeli yüklendi. Agaroz jeli 5 Volt'da 1-2 saat DNA fragmentleri koşturuldu. Sonuçlar UV görüntölleme cihazında UV ışığında görüntölene yapıldı.

3.9. NRF-2 Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

Stoktan alınan hücreler çoğalması için steril flasklara ekim yapıldı, hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra hücreler tripsin yardımıyla petri tabanından kaldırılarak thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Altı kuyucuklu petrilere 500.000 hücre ekildi. Tüplere 24 saat sonra mantar ekstraktı ve cisplatin eklendikten sonra 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petri kaplarına hücre parçalama tamponu eklendi ve hücre sıyrıcı ile hücrelerin lizatları toplandı. Elde edilen lizatlar -80°C'de saklandı. NRF-2 gen ekspresyonu NRF-2 ELİZA kit protokolü ile Tıbbi Parazitoloji laboratuvarında tespit edilmiştir.

3.10. Koloni Formasyon Testi

Stoktan alınan hücreler çoğalması için steril flasklara ekim yapıldı, hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra hücreler tripsin yardımıyla petri tabanından kaldırılarak thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücreler altı kuyucuklu petrilere her bir kuyusuna 500 adet hücre ekildi. Her iki hücre hattı için de aynı işlem yapıldı. Mantar ve cisplatin maddeleri gruplara verilerek 21 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreci sonrasında petrilere besiyerleri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Oluşan kolonilerin petri tabanına yapışması için 20 dakika boyunca %100'lük metanol ile muamele edildi. Kolonilerin net bir şekilde görünmesi için kristal viyole boyası ile boyandı. Ortaya çıkan koloniler sayılarak grafiğe döküldü.

3.11. Hücre Göçü Testi (Scratch Assay)

Stoktan alınan hücreler çoğalması için steril flasklara ekim yapıldı, hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra altı kuyucuklu petrilere pasajlanması yapıldı. Altı kuyucuklu petrilere hücreler yüzey

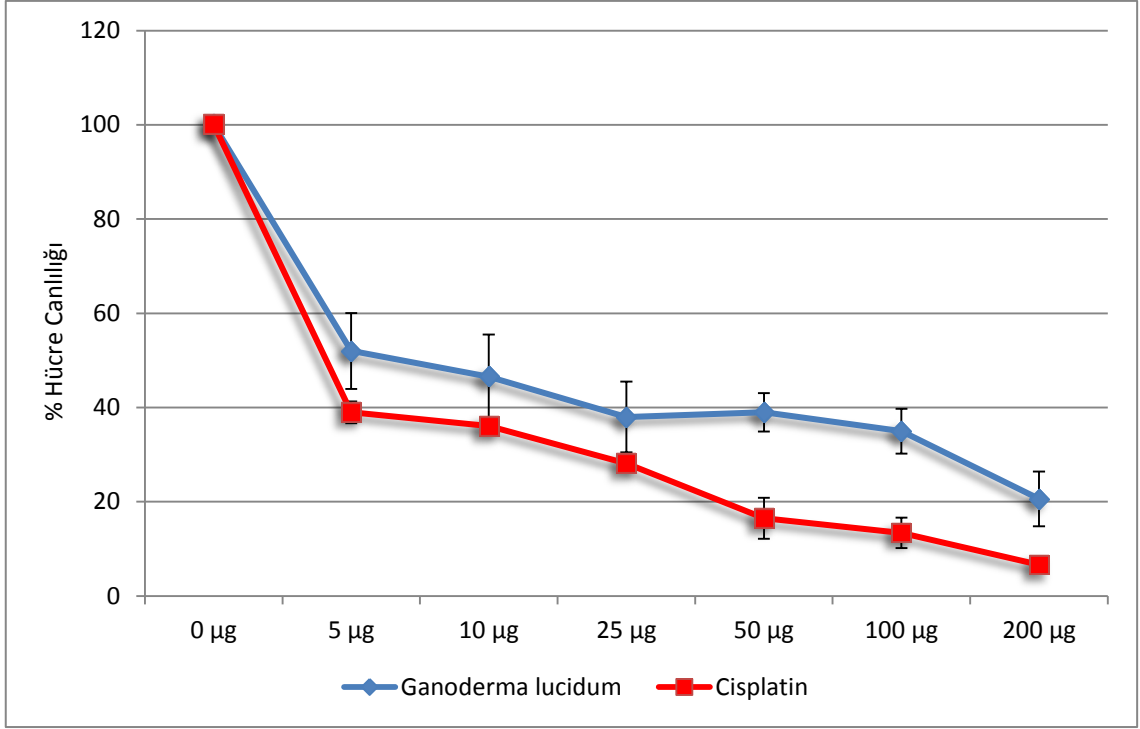
alanının %80-90'nını kaplayıncaya kadar beklendi. Yüzey alanının 80-90'nını kapladıktan sonra altı kuyucuklu petrilerin her bir kuyucuğuna 200 µl mikropipet ucu ile bir hat çizildi. Her iki hücre hattı için de aynı işlem yapıldı. Her bir kuyucuğa *Ganoderma lucidum* ve cisplatin maddeleri verildikten sonra 24, 48 ve 72 saat de migrasyonu incelendi ve hücre migrasyonlarının fotoğrafları çekildi. İmage J programı ile hesaplamalar yapıldı.



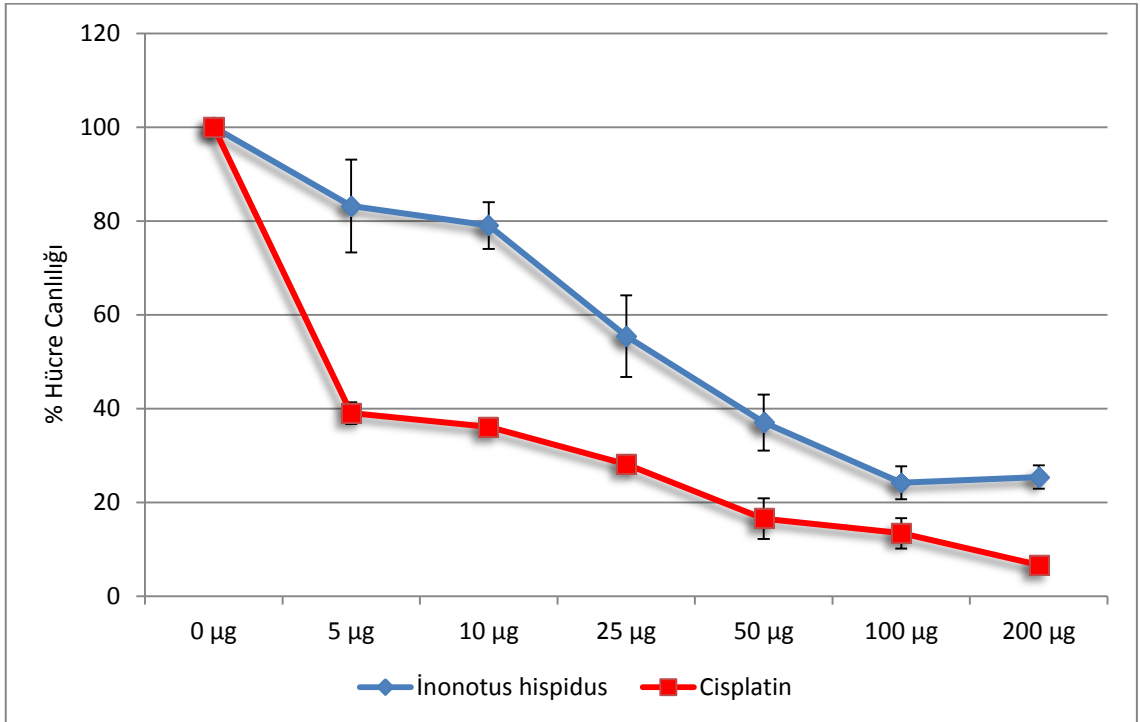
4. BULGULAR

4.1. MTT İle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

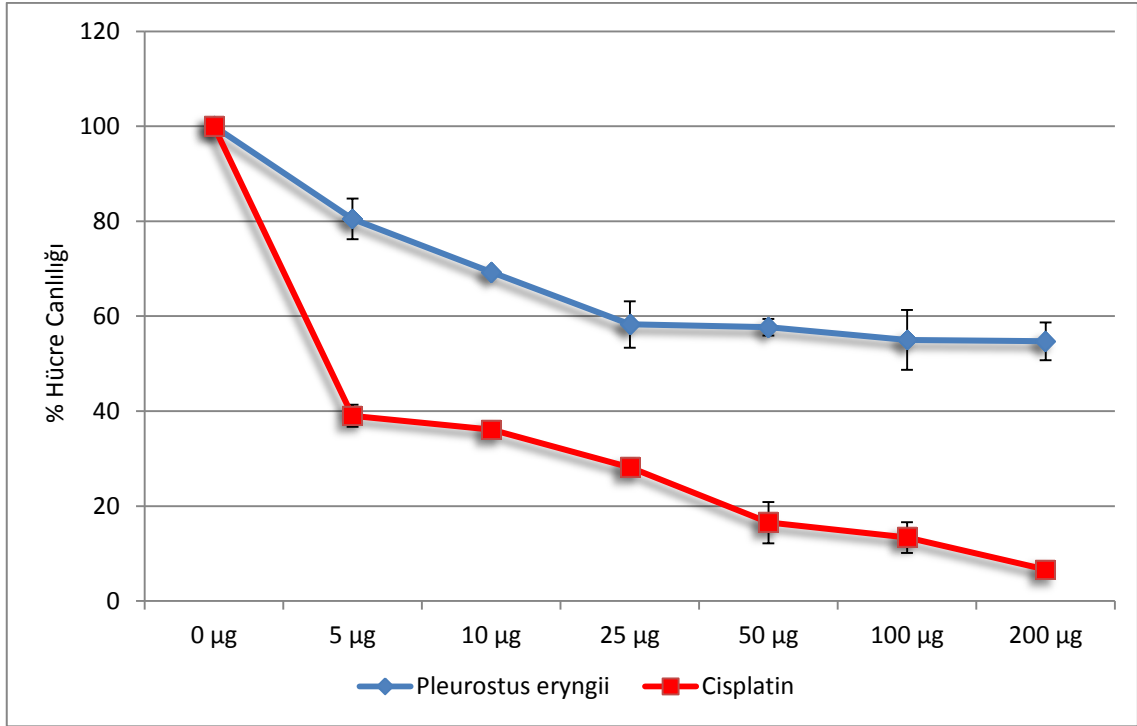
Ganoderma lucidum, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* ve *Inonotus hispidus* mantar ekstraktı KRK hücre hatları üzerindeki (HT-29 ve HCT-116) sitotoksisite etkisi MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yöntemiyle belirlendi. Öncelikle her bir mantara ait ekstraktların farklı konsantrasyonları (5,10,25,50,100 ve 200 µg) 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreçleri ile hücre hatlarına uygulanarak her bir mantar için sitotoksik doz belirlenmeye çalışıldı. MTT analizlerine göre *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* ve *Inonotus hispidus* ekstraktları hem HT-29 hem de HCT-116 hücre hatlarında zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Bu mantar ekstraktlarının içinde *Ganoderma lucidum* sitotoksik anlamda en etkili mantar ekstraktı olmuştur.



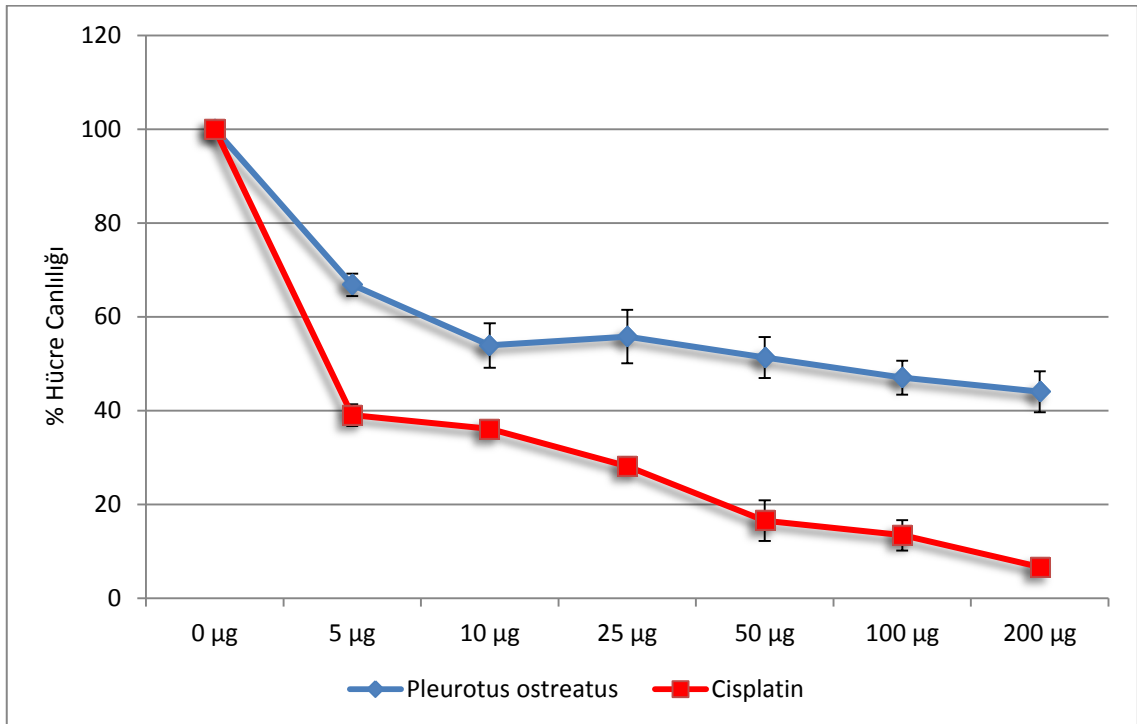
Şekil 3. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



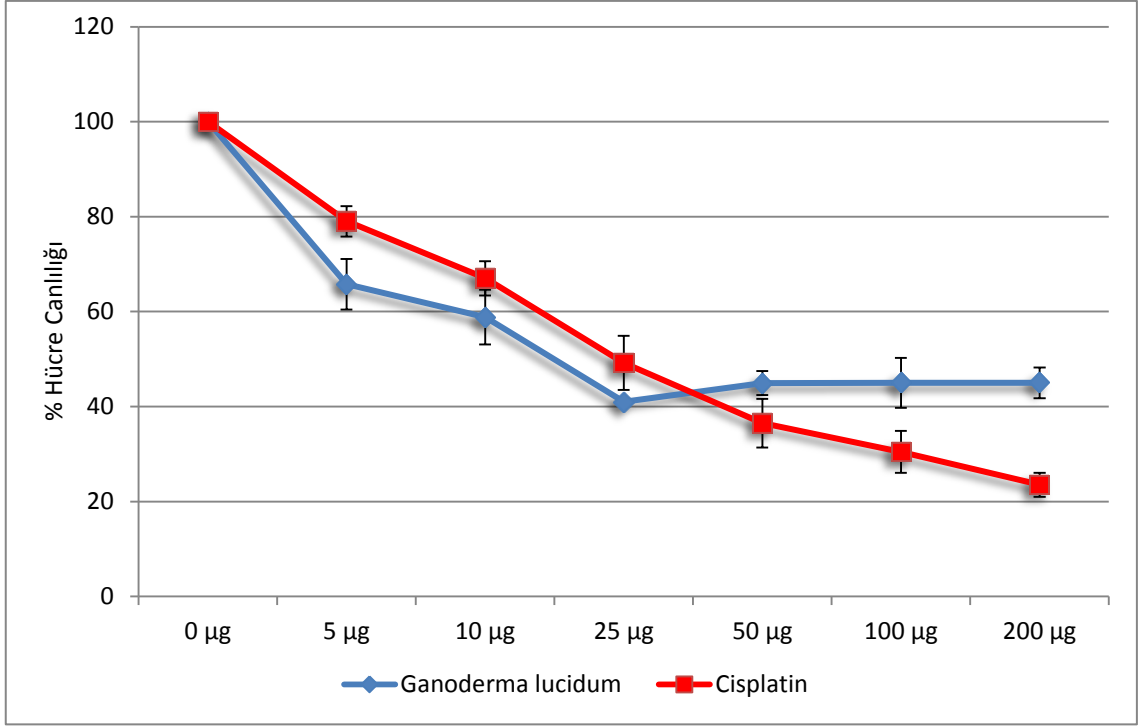
Şekil 4. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



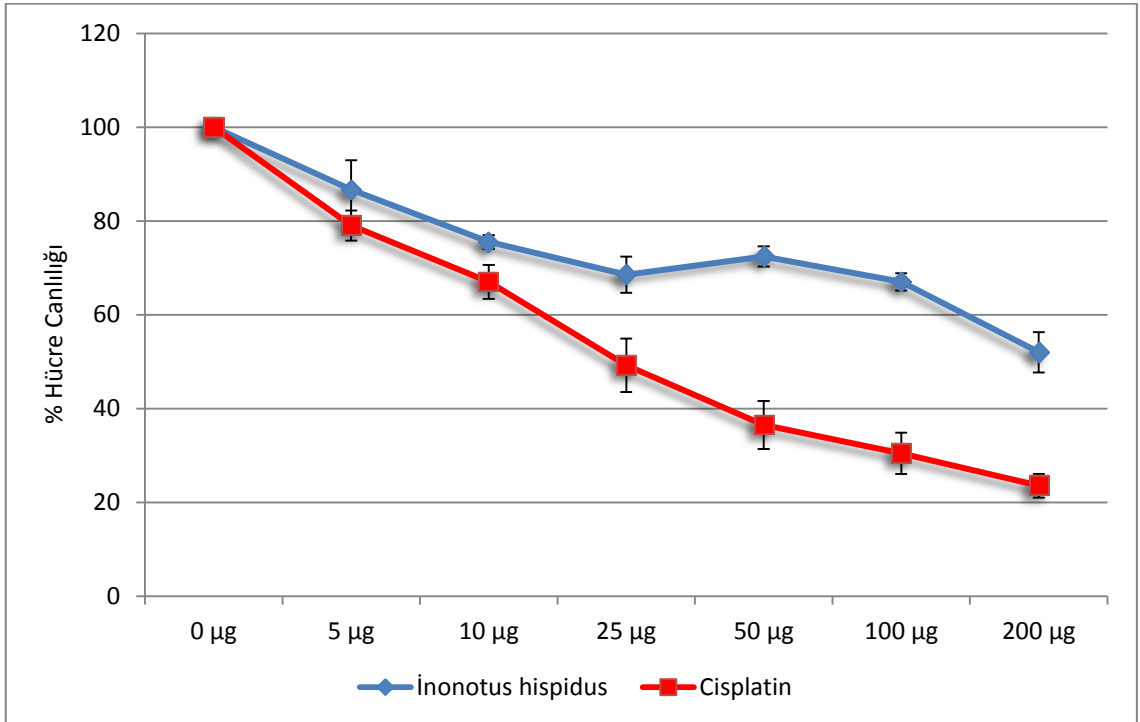
Şekil 5. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



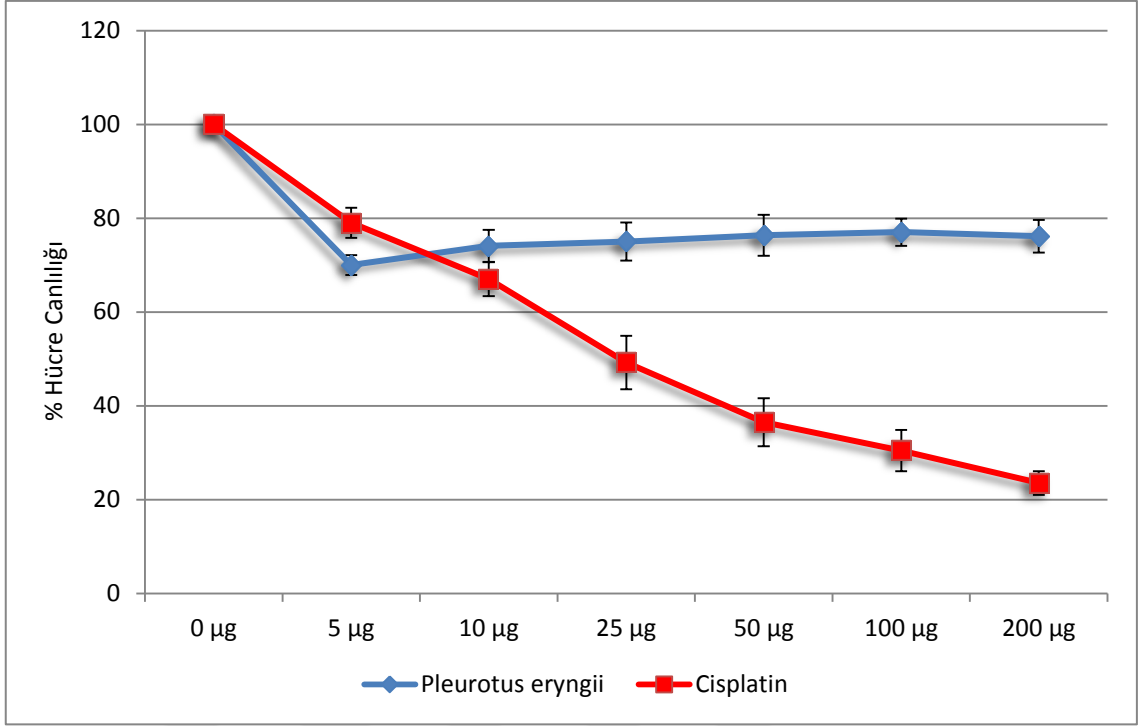
Şekil 6. HCT-116 hücrelerinde 24 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



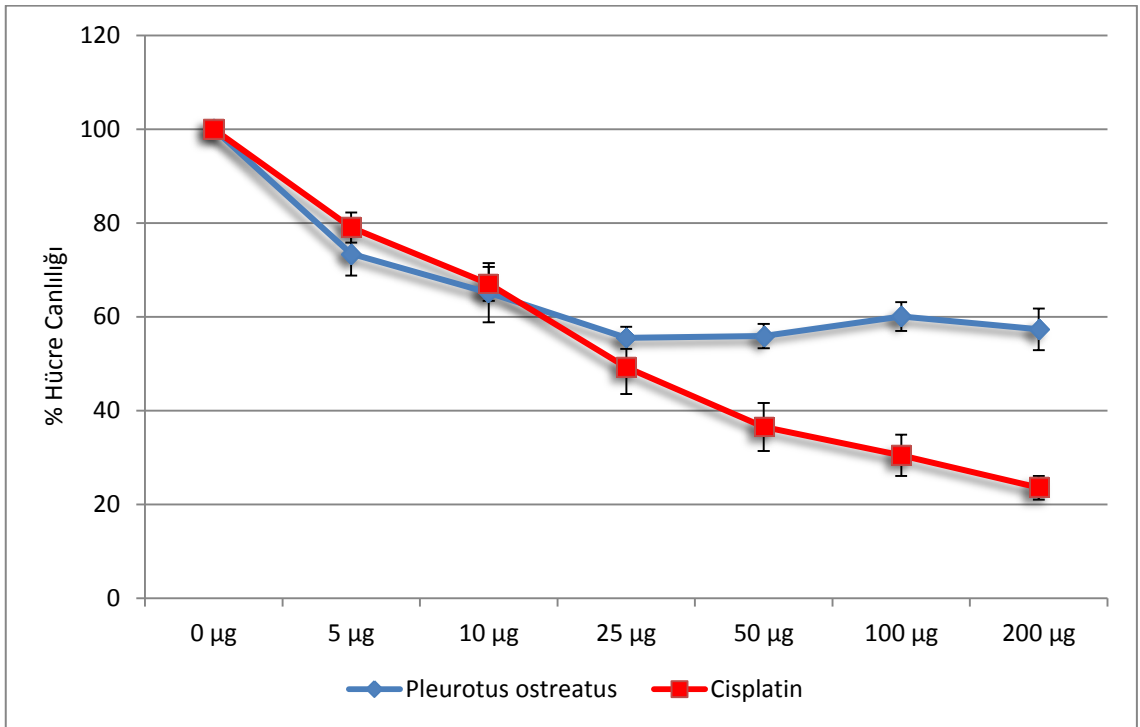
Şekil 7. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



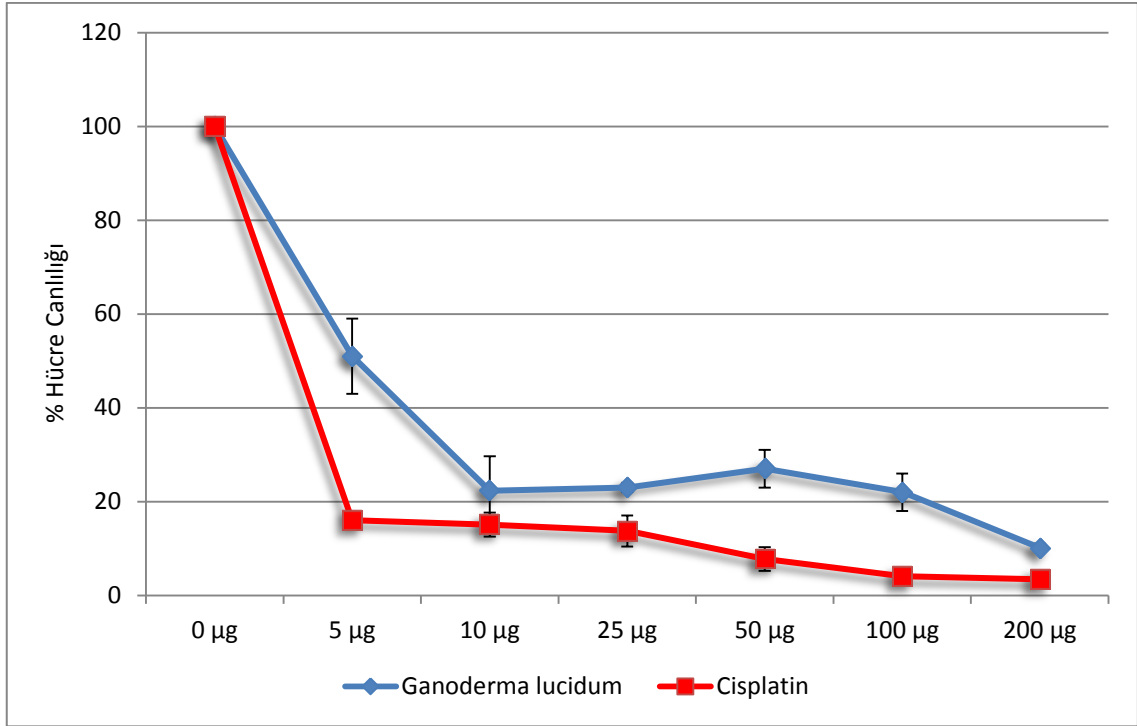
Şekil 8. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



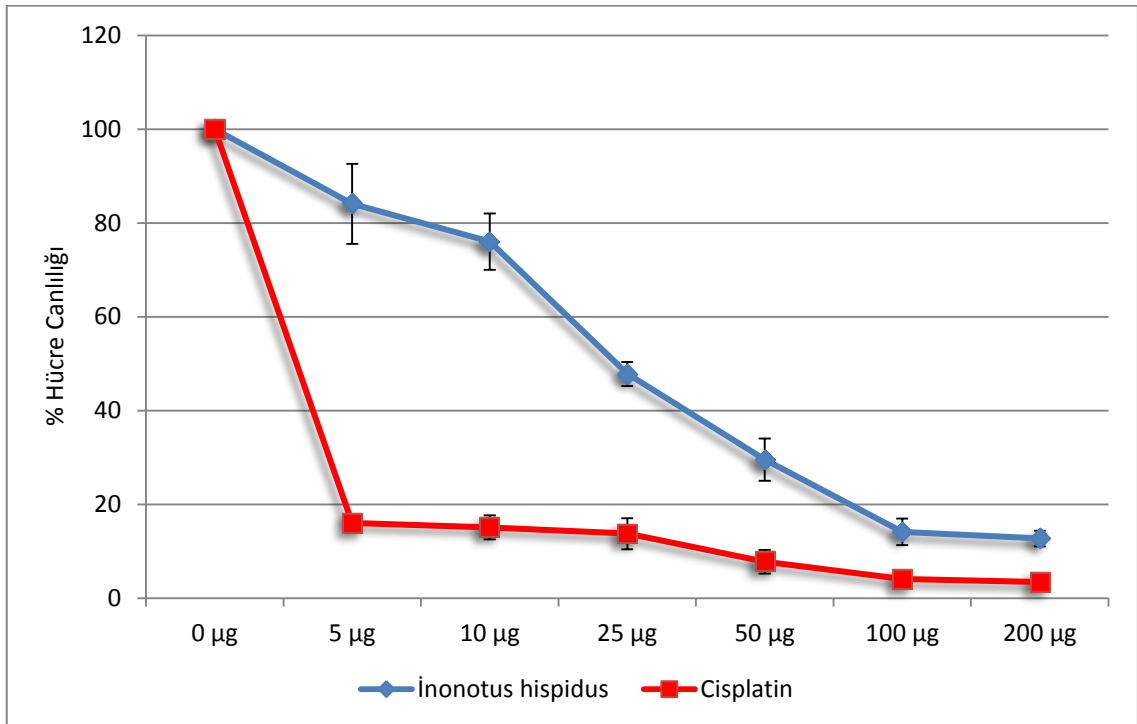
Şekil 9. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



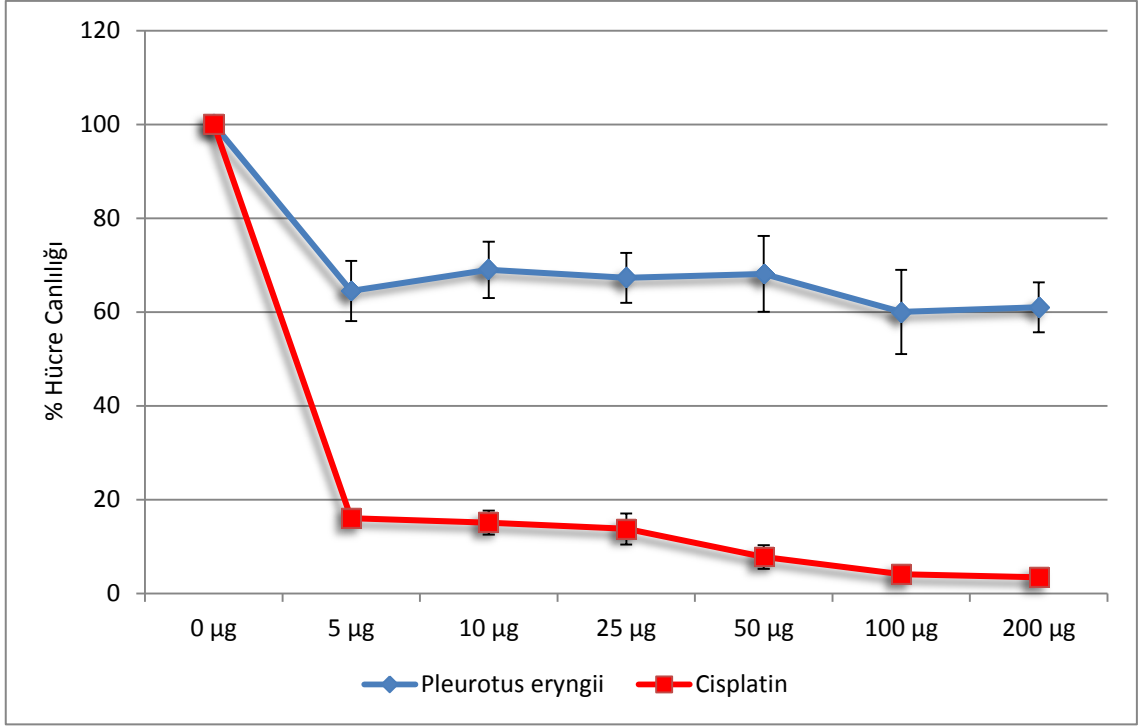
Şekil 10. HT-29 hücrelerinde 24 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



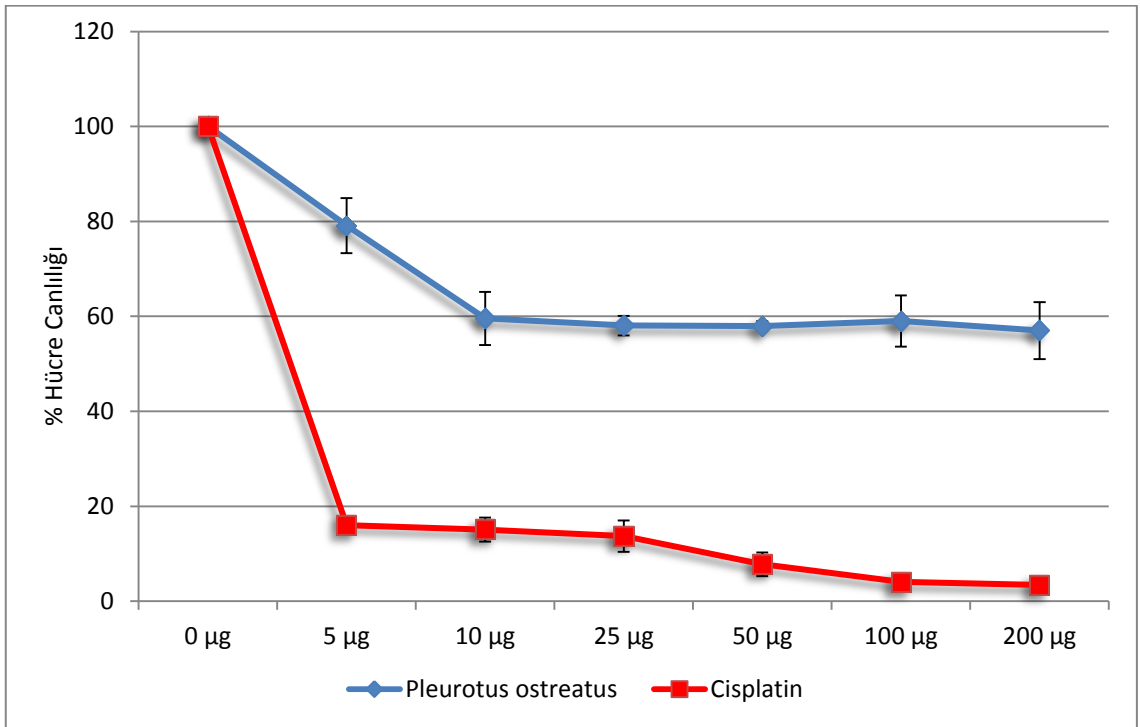
Şekil 11. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



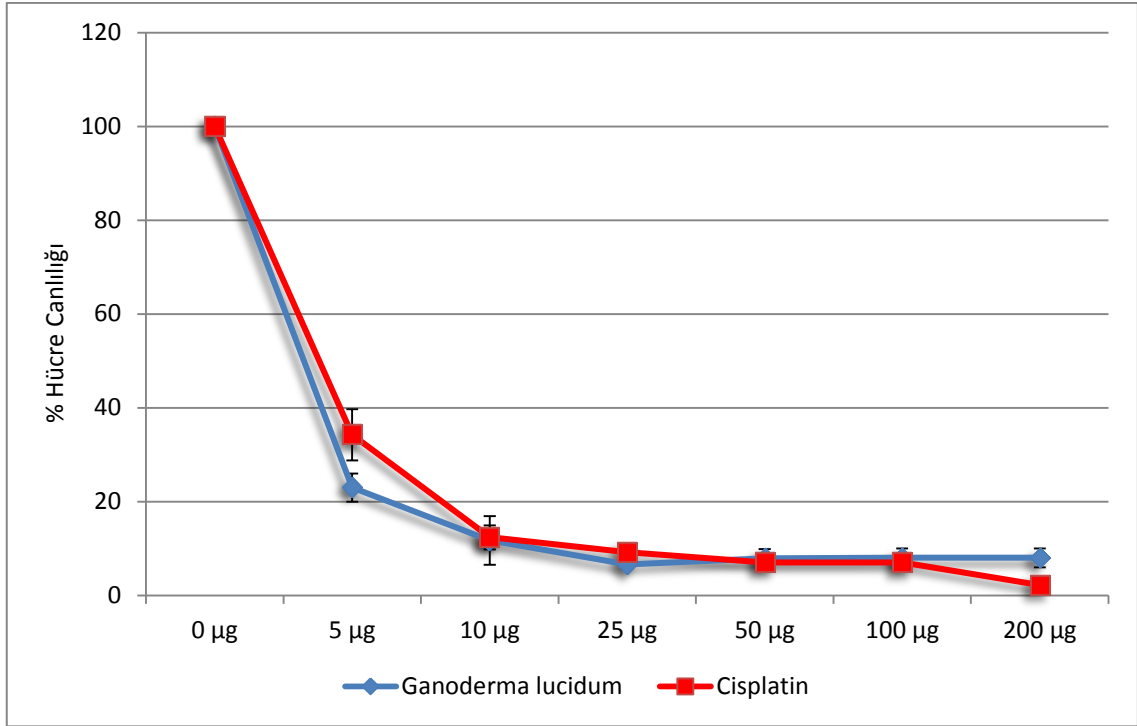
Şekil 12. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



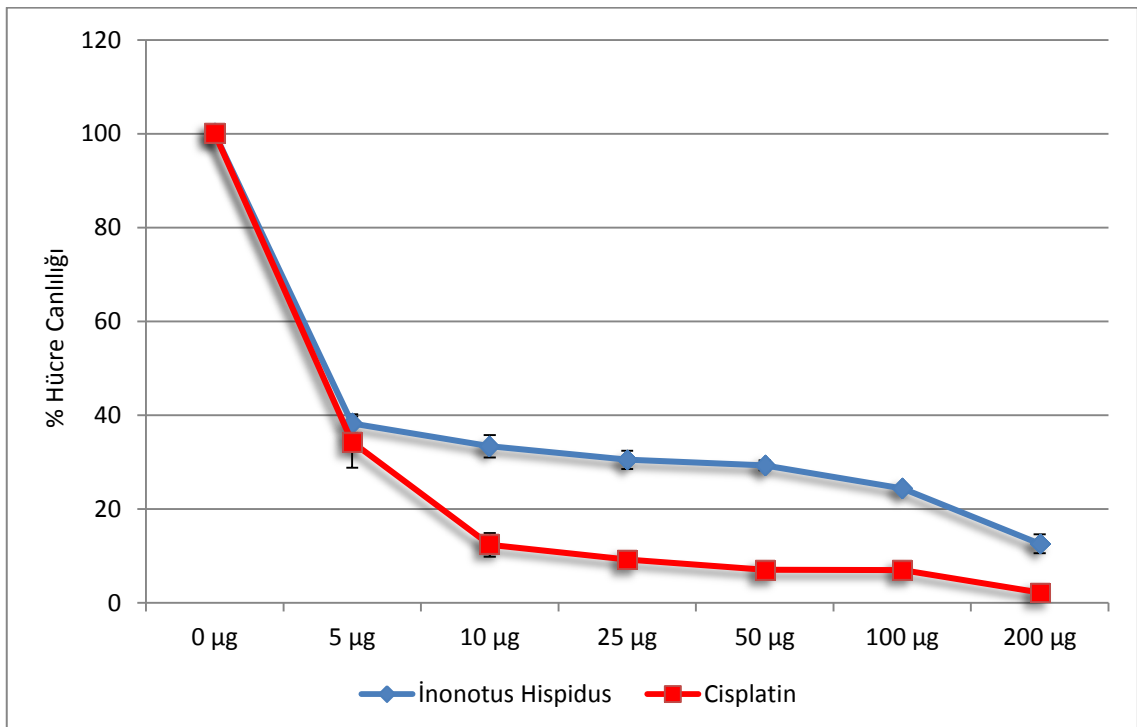
Şekil 13. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



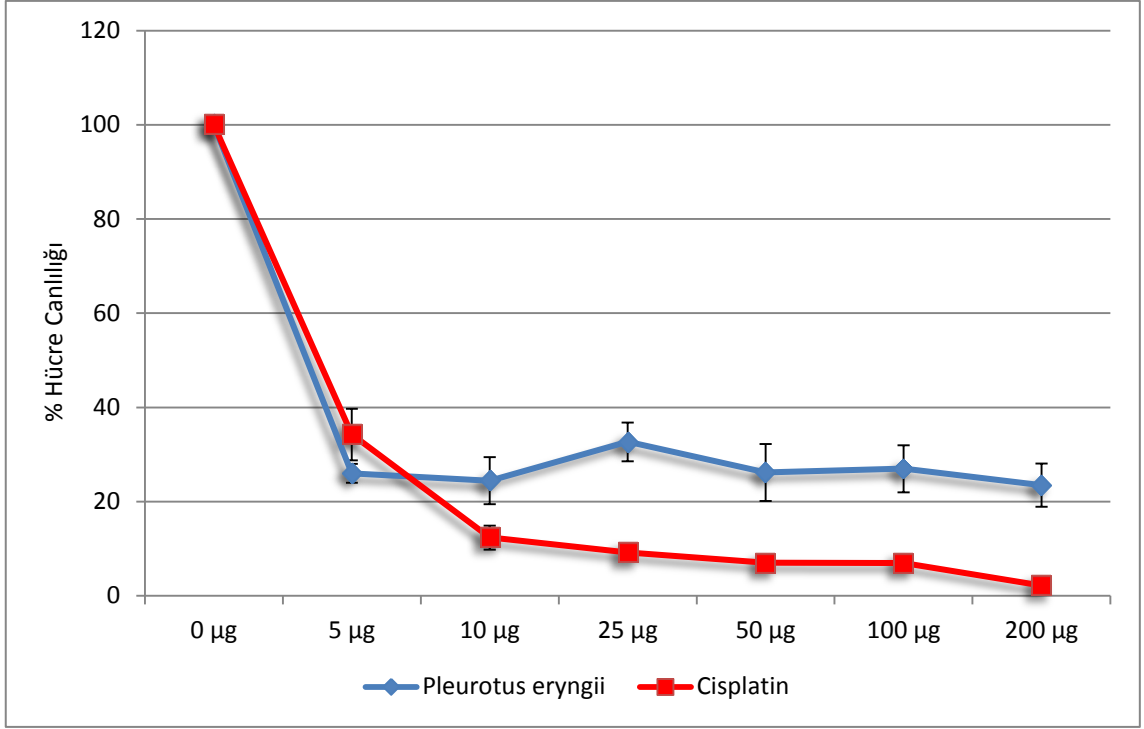
Şekil 14. HCT-116 hücrelerinde 48 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



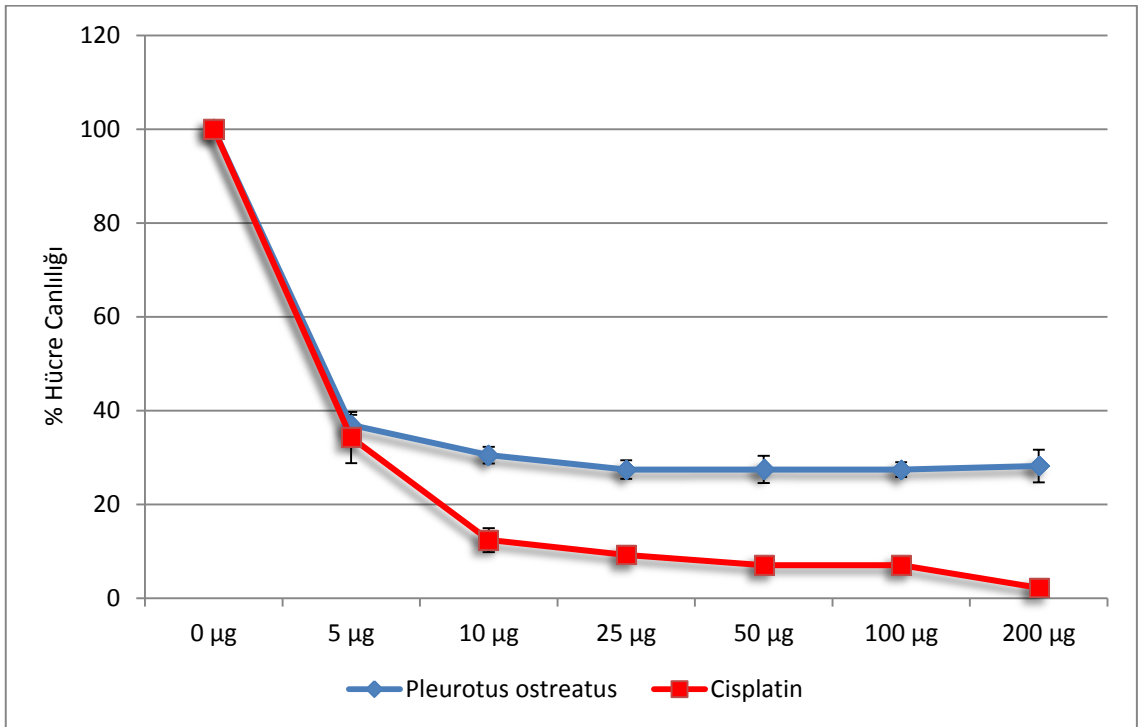
Şekil 15. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



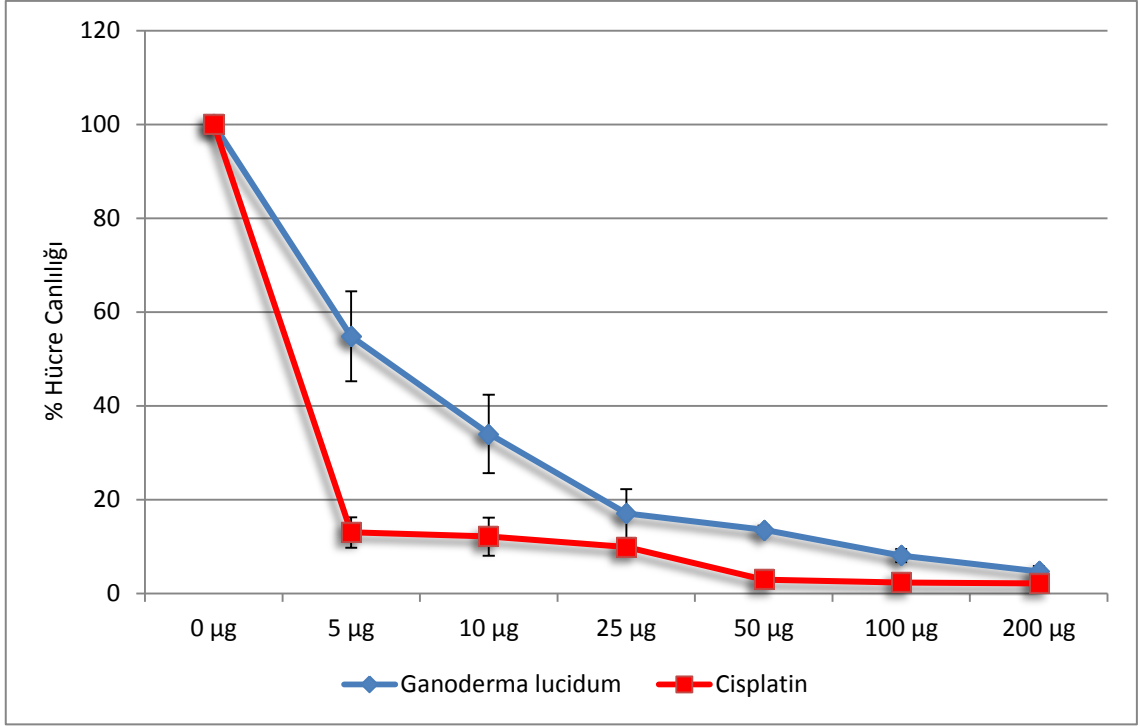
Şekil 16. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



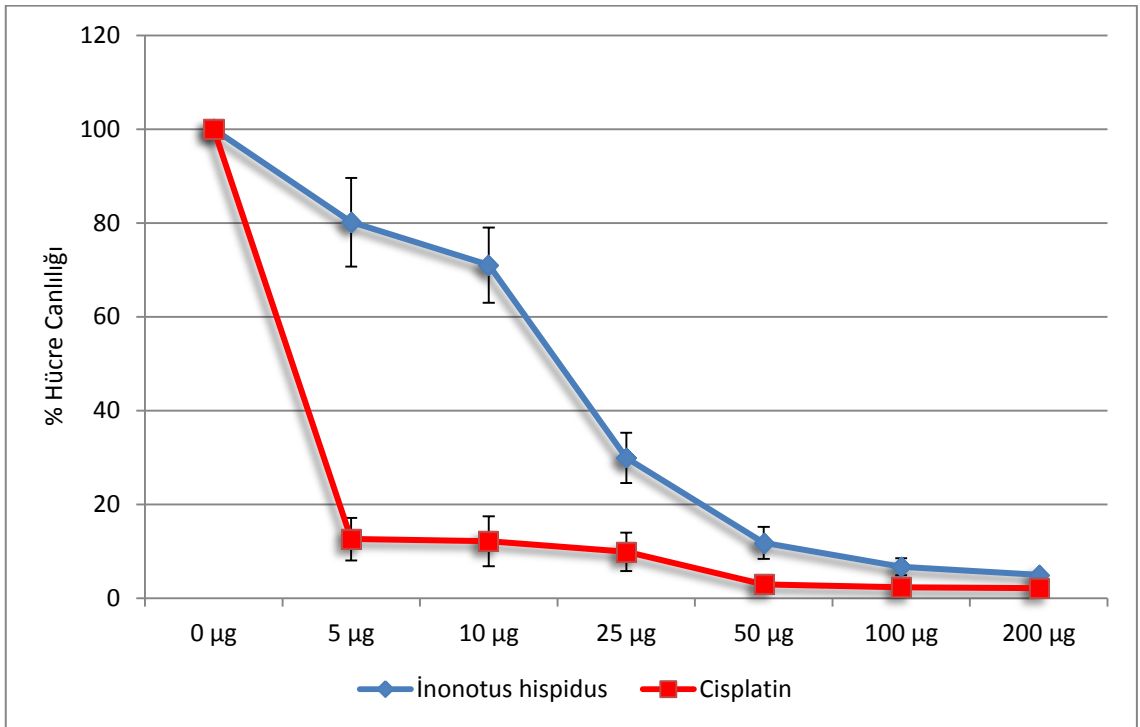
Şekil 17. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



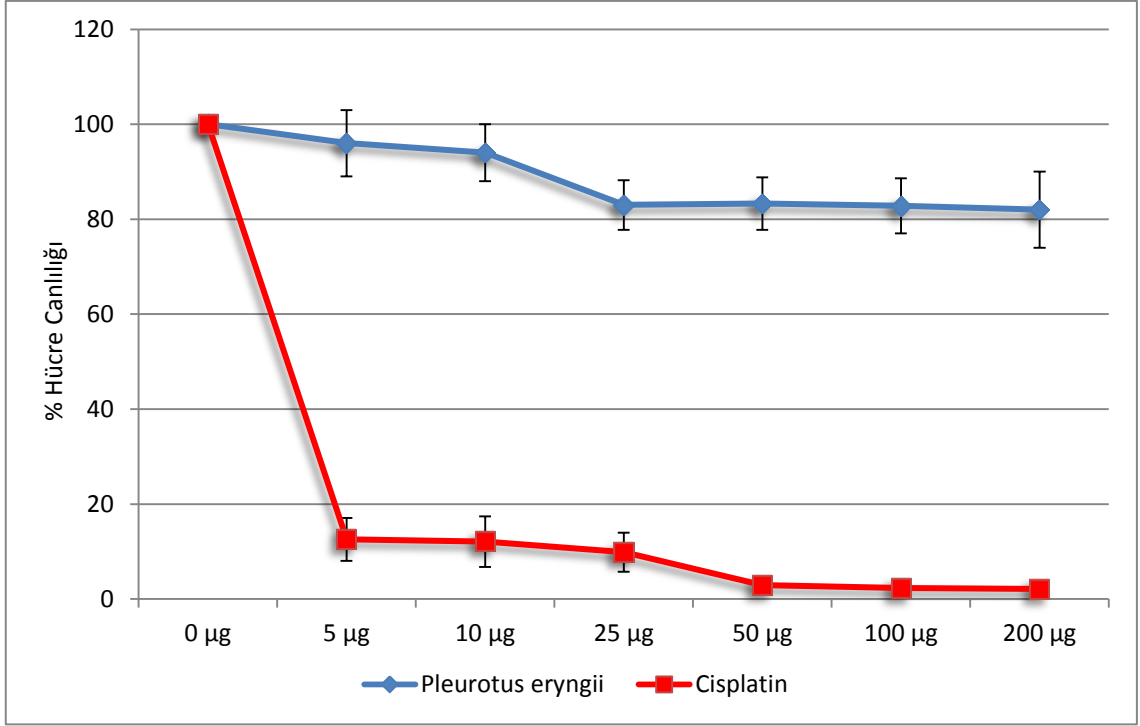
Şekil 18. HT-29 hücrelerinde 48 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



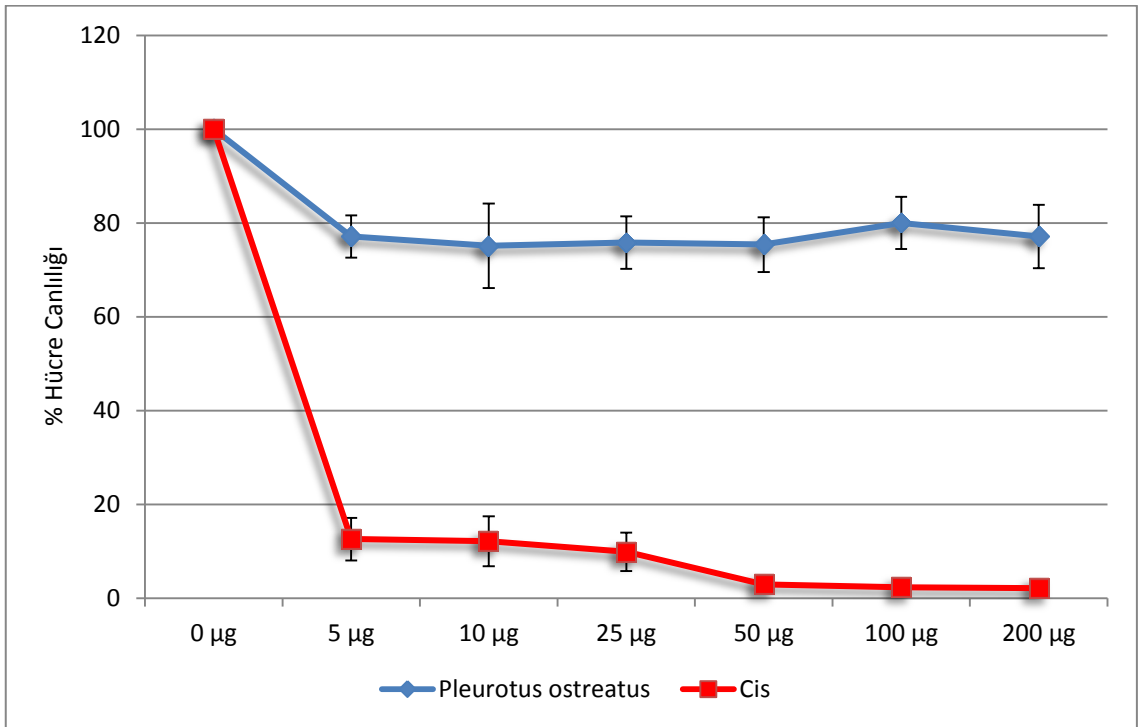
Şekil 19. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



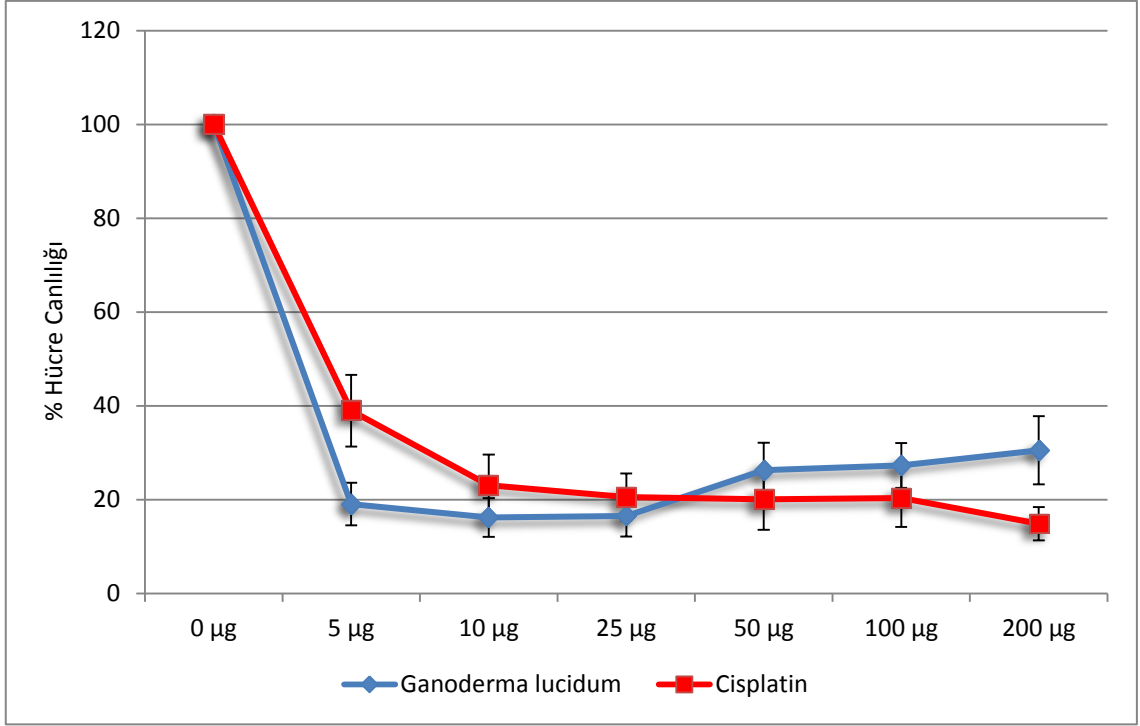
Şekil 20. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



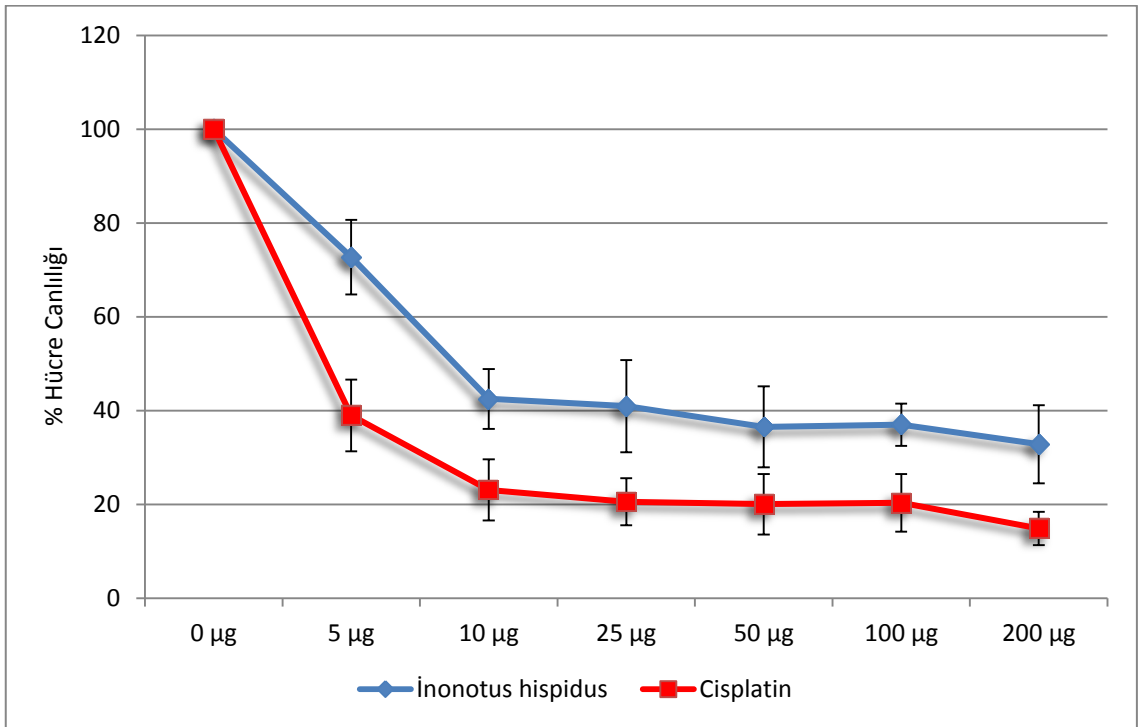
Şekil 21. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



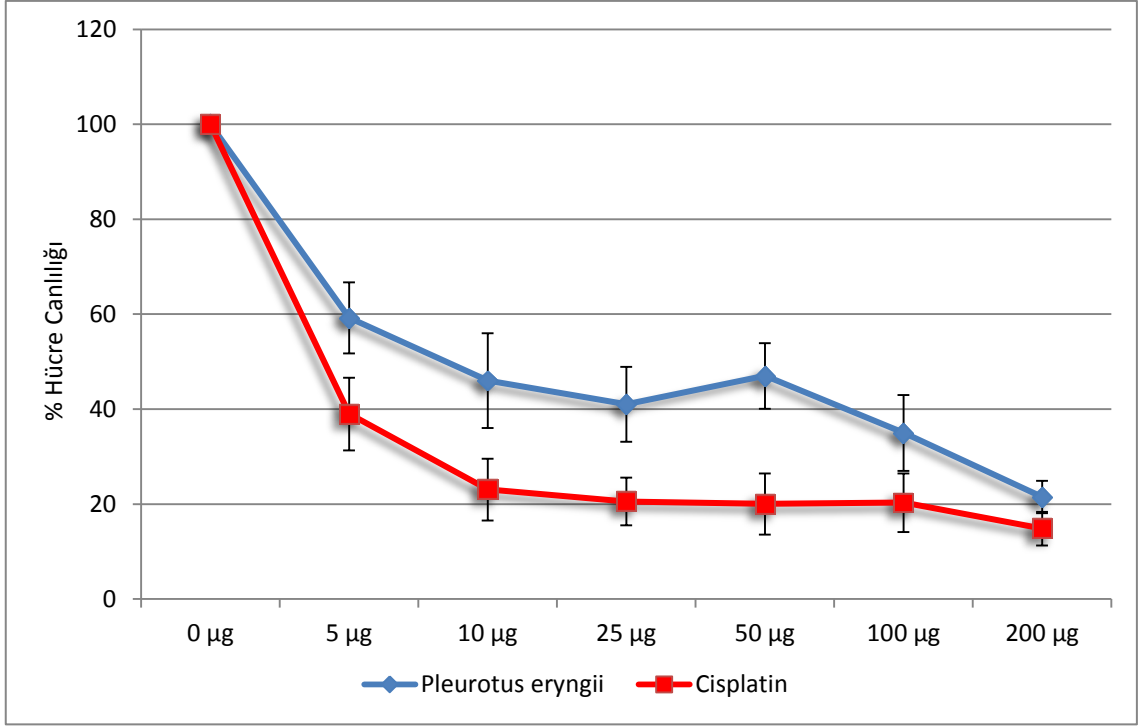
Şekil 22. HCT-116 hücrelerinde 72 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



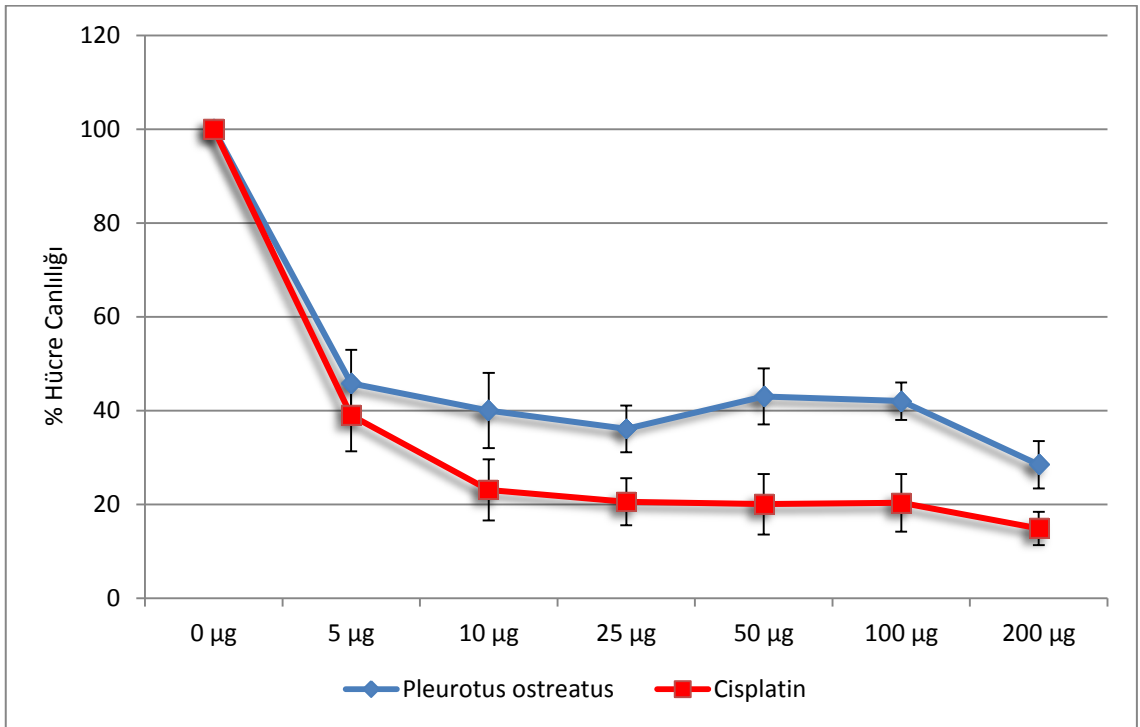
Şekil 23. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik *Ganoderma lucidum* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



Şekil 24. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik *Inonotus hispidus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



Şekil 25. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik *Pleurotus eryngii* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



Şekil 26. HT-29 hücrelerinde 72 saatlik *Pleurotus ostreatus* uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.

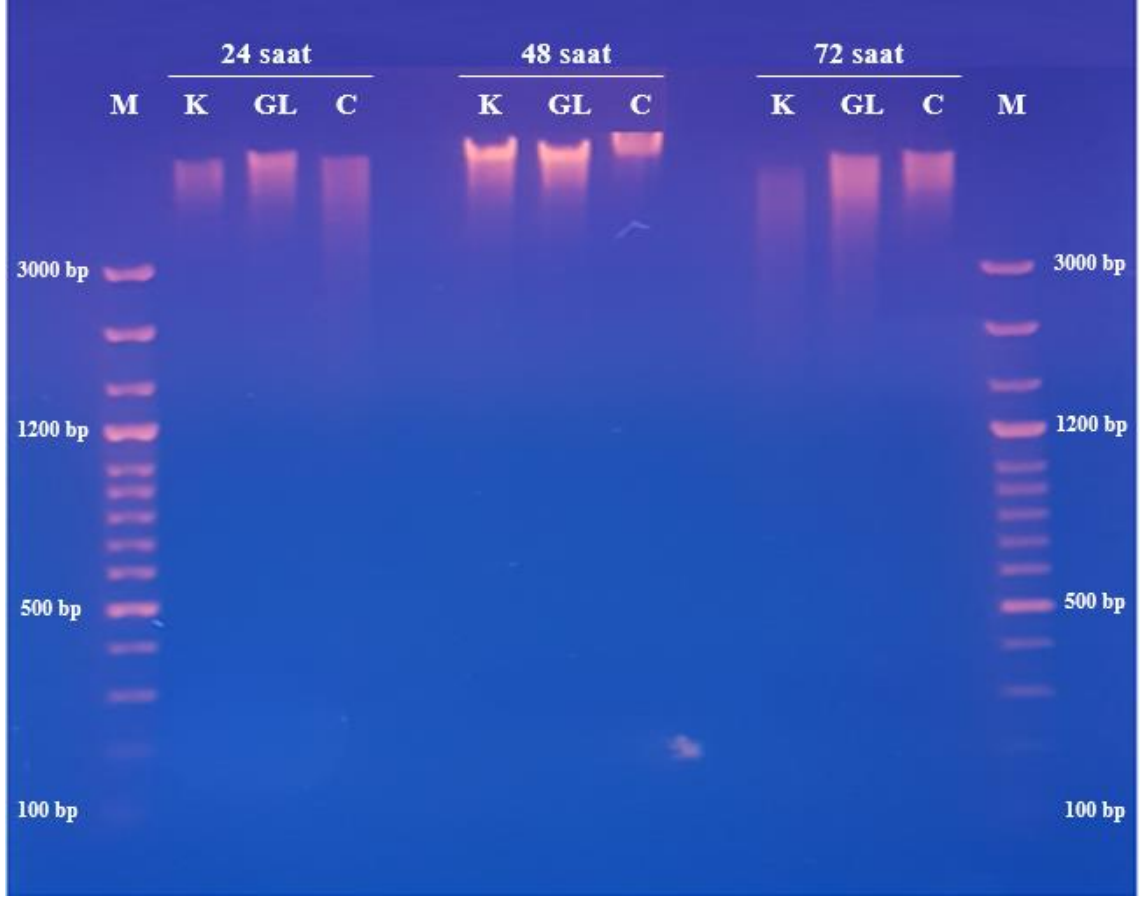
4.2.IC₅₀ Değeri

Tablo 1. *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* ve *Inonotus hispidus* mantar ekstraktları ile muamele edilen HT-29 ve HCT-116 hücre hatlarına ait 24, 48 ve 72 saatlik IC₅₀ değerleri.

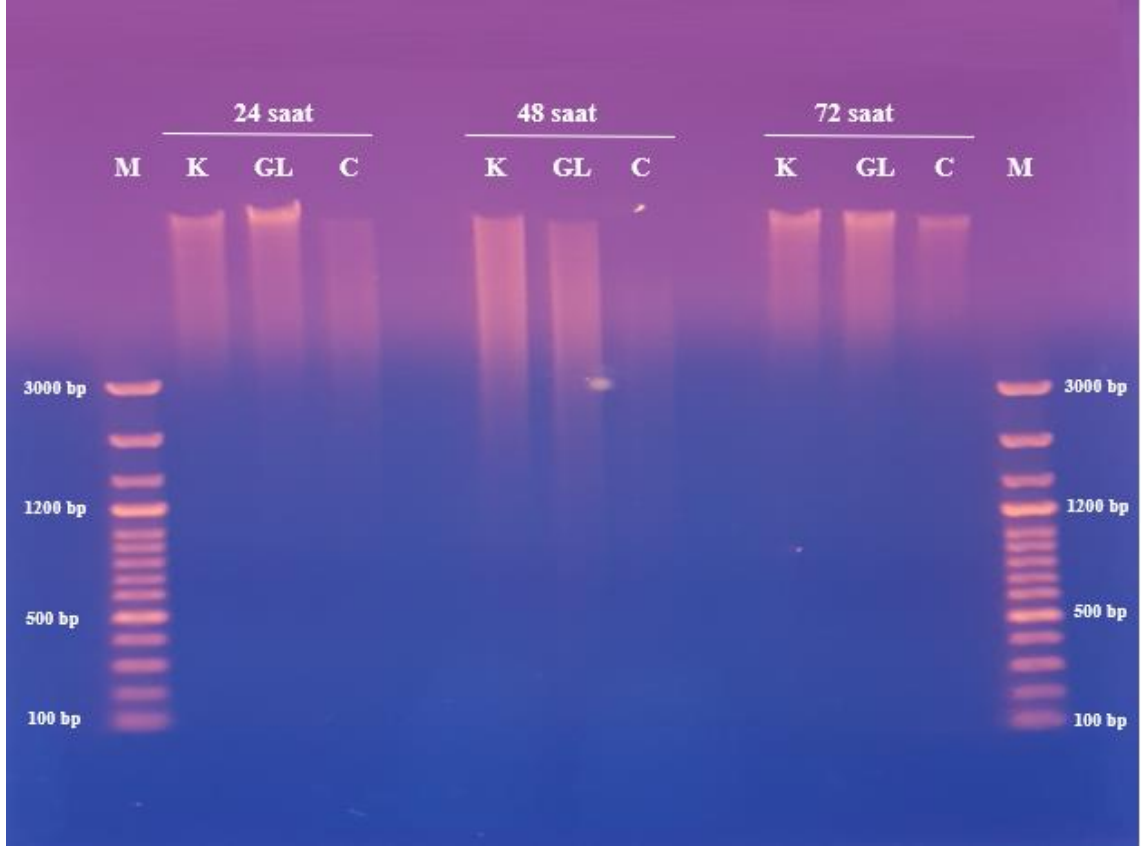
	IC ₅₀ µg					
	HCT-116			HT-29		
Mantar Ekstraktı	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Ganoderma lucidum</i>	5,632	4,552	5,878	4,91	3,213	2,904
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,484	5,374	3,812	4,657	3,099	3,325
<i>Pleurotus eryngii</i>	6,615	3,07	18,17	2,289	2,851	6,451
<i>Inonotus hispidus</i>	17,59	18,31	13,93	15,51	4,071	5,833
Cisplatin	2,587	1,175	1,175	6,037	1,843	1,828

4.3. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi

Kullanılan mantar ekstraktlarının IC₅₀ değerleri incelendiğinde en etkili sitotoksisite değerine sahip olan *Ganoderma lucidum* mantarı öne çıkmıştır. *Ganoderma lucidum* mantarının etkin dozu kullanılarak ortaya çıkan sitotoksik etkinin apoptotik **olup olmadığı**, DNA hasarına yol açıp açmadığı apoptotik DNA ladder yöntemi ile belirlendi. HT-29 ve HCT-116 KRK hücrelerinde *Ganoderma lucidum* mantarının etkin dozunun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonucunda DNA parçalanmasının göstergesi olan uzamaya başlayan merdiven oluşumu gözlenmemiştir.



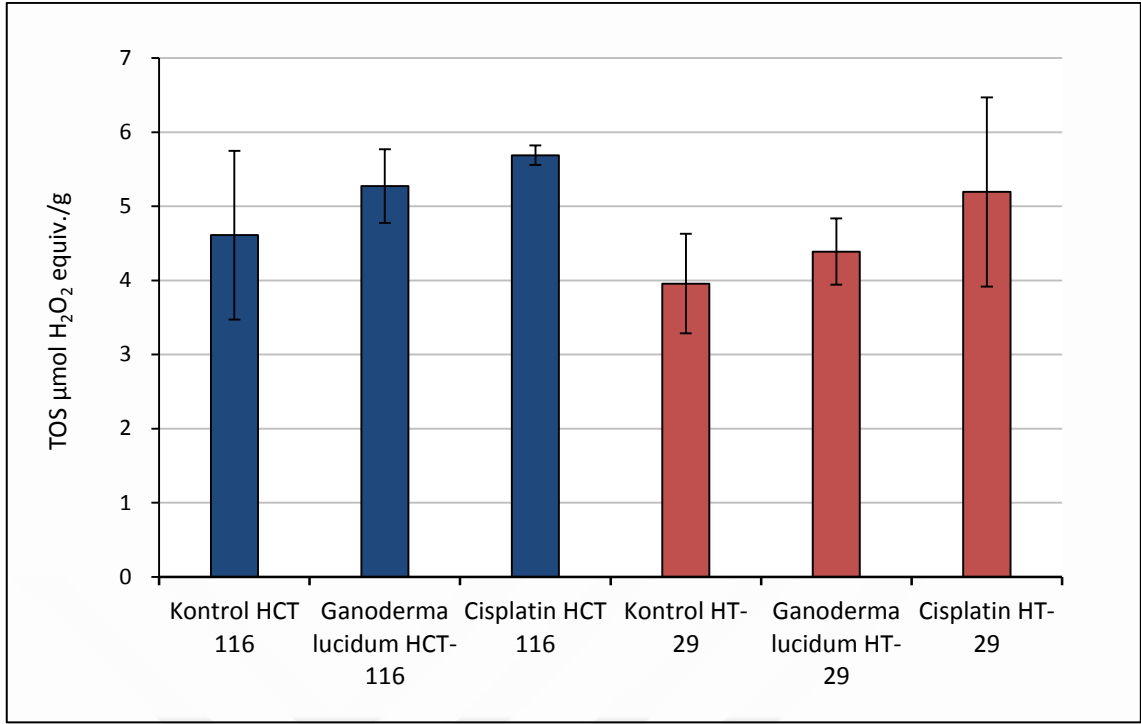
Şekil 27. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerindeki DNA hasarı.



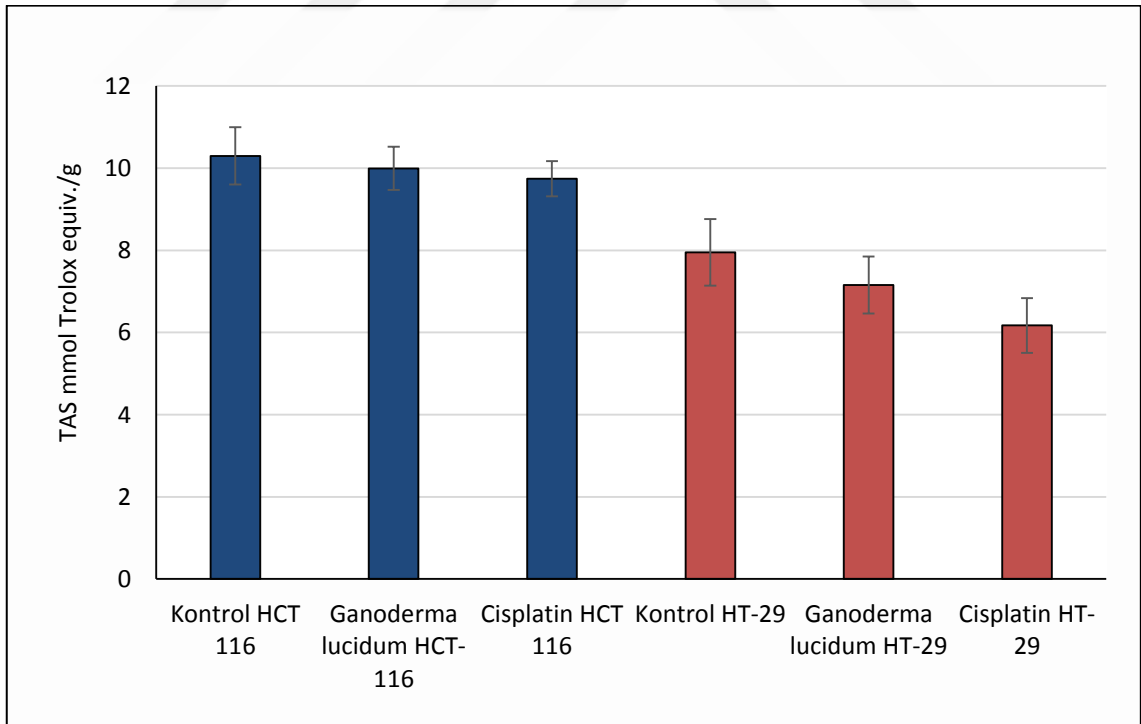
Şekil 28. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerindeki DNA hasarı.

4.4. Oksidatif Stres Bulguları

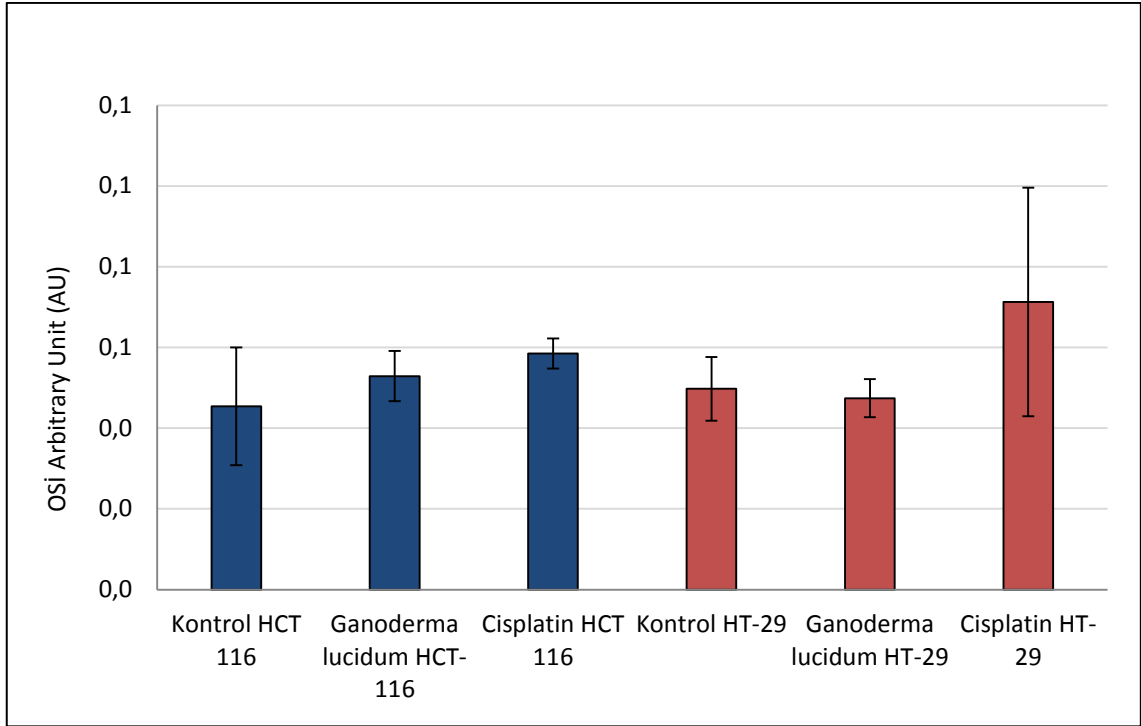
Çalışmada ayrıca *Ganoderma lucidum* ve kontrol grubu olarak kullanılan cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde TAS ve TOS parametreleri çalışıldı.



Şekil 29. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik TOS değeri grafiği.



Şekil 30. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik TAS değeri grafiği.

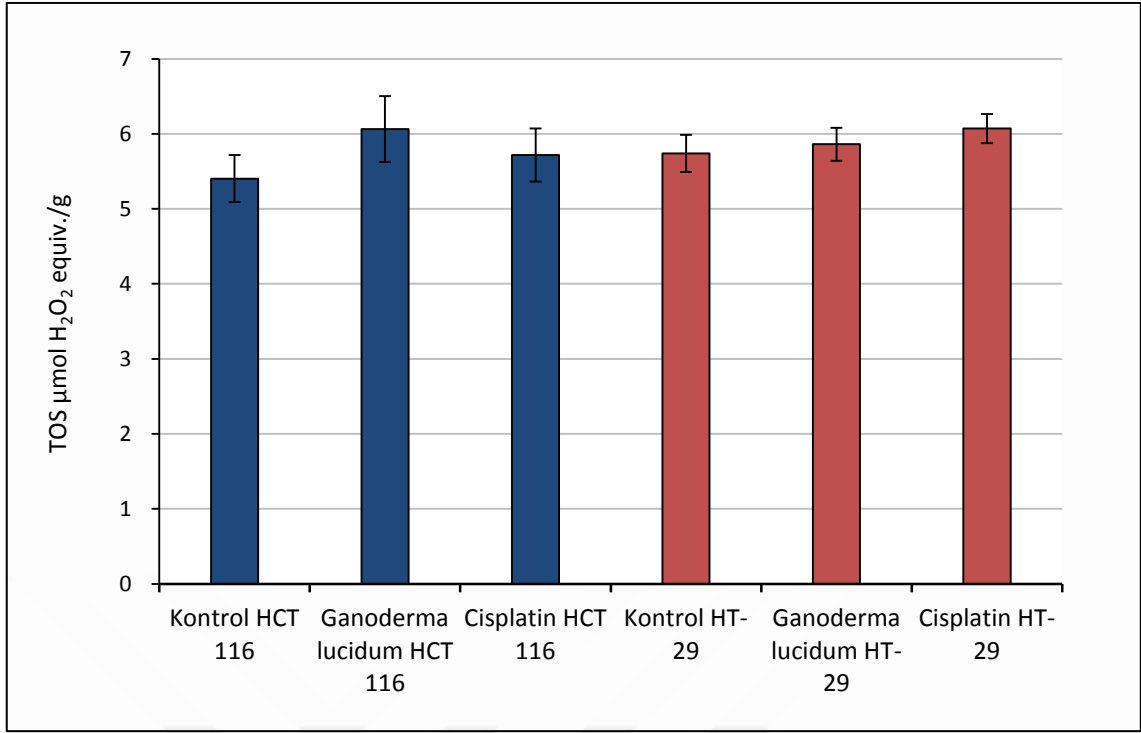


Şekil 31. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik OSİ değeri grafiği.

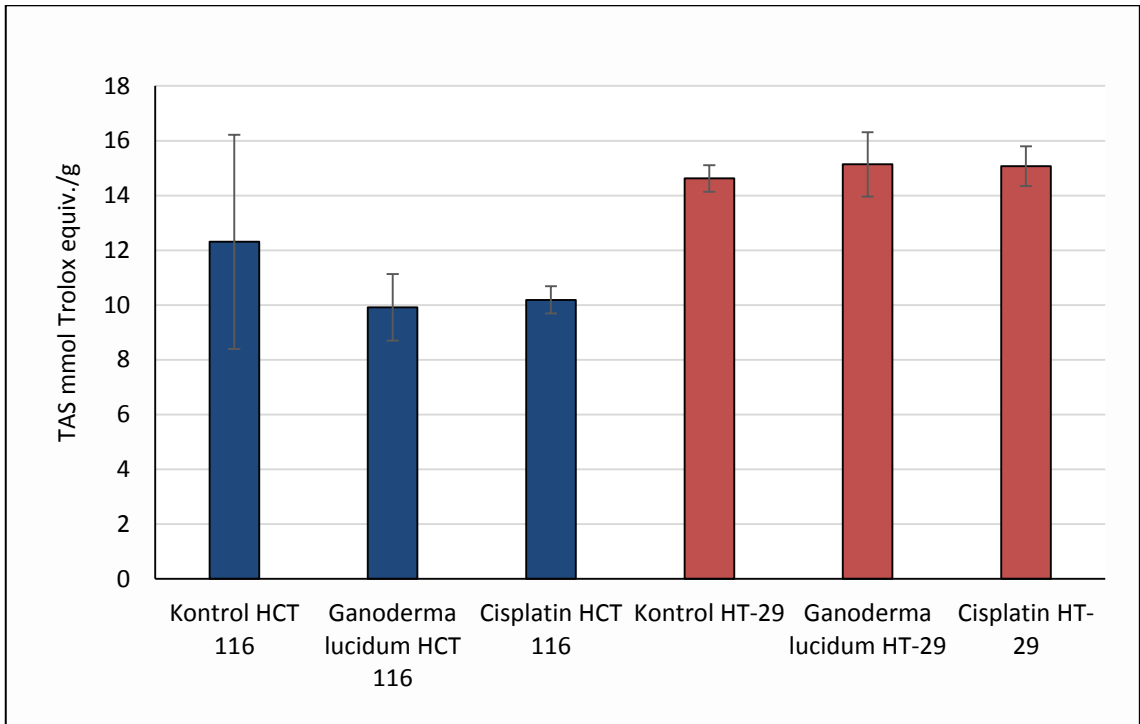
Şekil 26’da görüldüğü gibi HCT-116 hücrelerinde *Ganoderma lucidum* mantarı ve cisplatin grubunun 24 saatlik TOS değerleri kontrole göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla *Ganoderma lucidum* mantarı uygulanan grupta TOS değeri düşük seyrederken, cisplatin uygulanan grubun TOS değeri beklenildiği gibi kontrolden yüksek olduğu kaydedilmiştir.

HCT-116 hücrelerinde *Ganoderma lucidum* mantarı ve cisplatin gruplarının 24 saatlik TAS değerleri kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamsızdır. Bunun aksine HT-29 hücrelerinde kontrole göre *Ganoderma lucidum* ekstraktı uygulanan grup da 24 saatlik TAS değerinde düşüş gözlemlenmiştir, ancak yine de en çok düşüş cisplatin uygulanan grupta kaydedilmiştir (şekil 27).

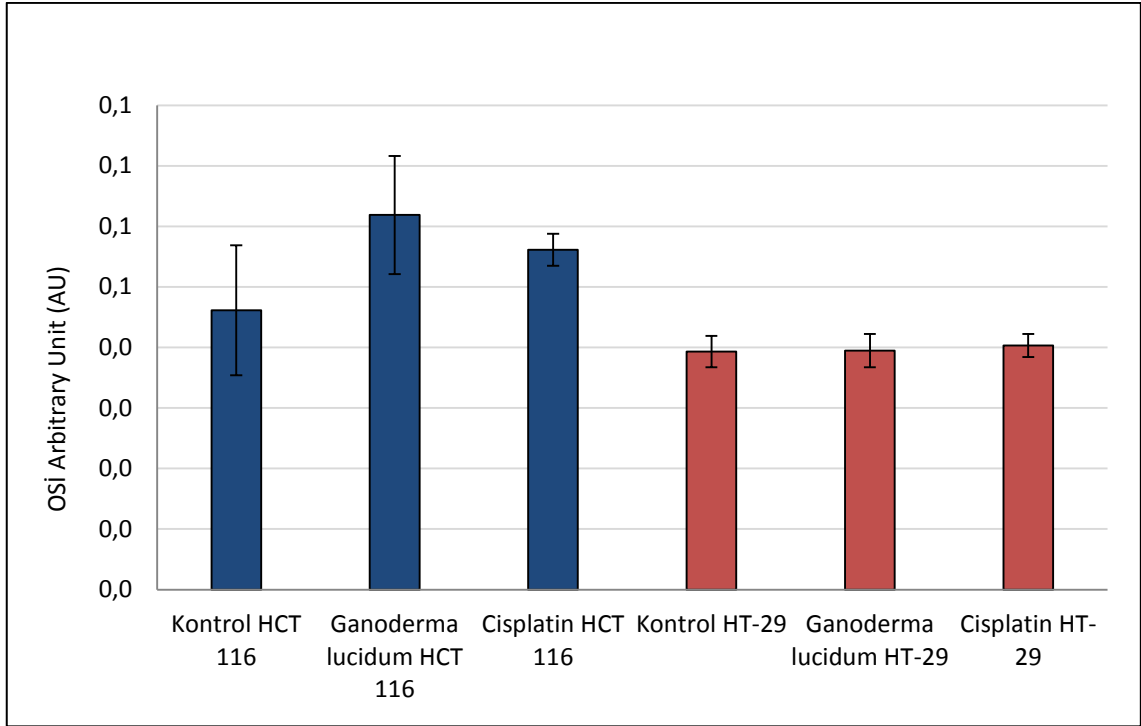
HT-116 hücrelerinde *Ganoderma lucidum* mantarı ve cisplatin gruplarının 24 saatlik OSİ değerleri kontrole göre nispeten daha yüksek bulunmuştur. Ancak HT-29 hücrelerinde OSİ değeri açısından *Ganoderma lucidum* ile kontrol grubu aynı seviyede iken, cisplatin grubunda önemli ölçüde artış gözükmemektedir (şekil 28).



Şekil 32. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik TOS değeri grafiği.



Şekil 33. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik TAS değeri grafiği.

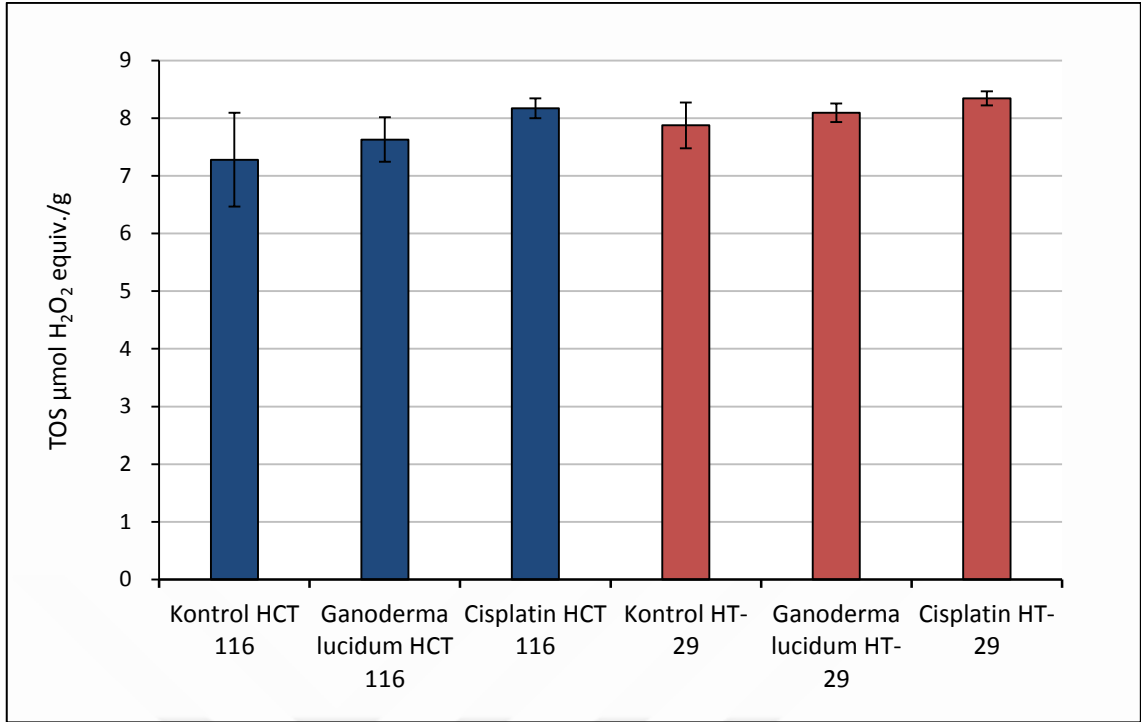


Şekil 34. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik OSİ değeri grafiği.

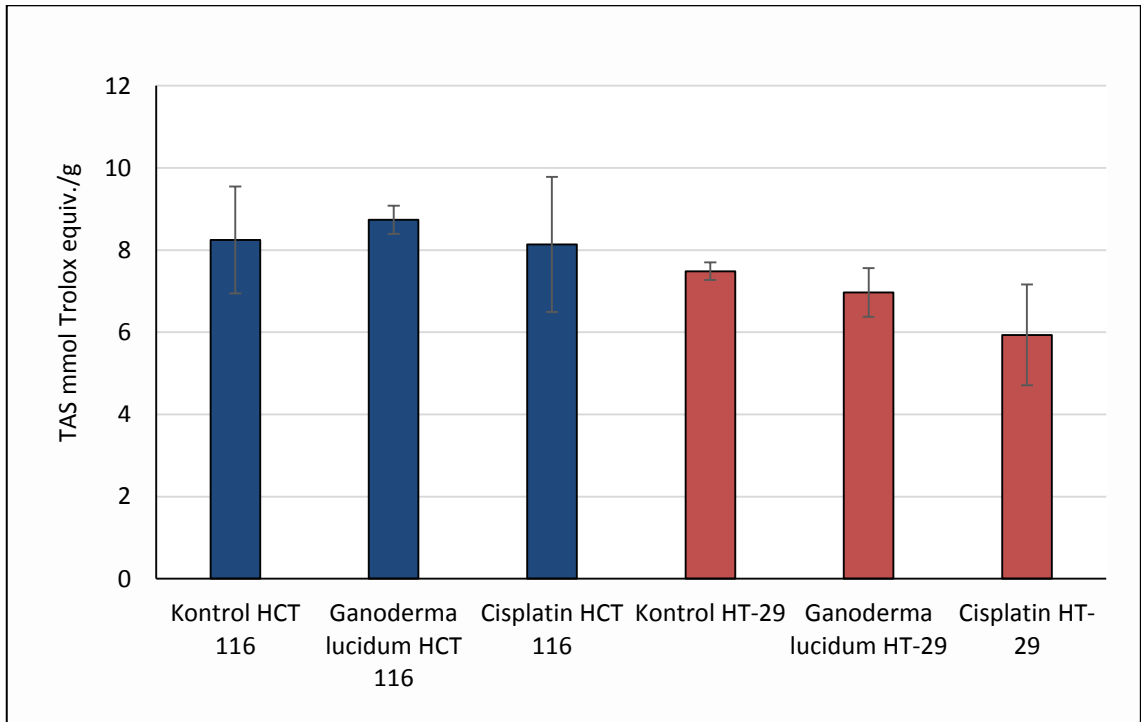
HCT-166 ve HT-29 hücrelerinde 48 saatlik uygulamalar sonucunda TOS seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgulara hem cisplatin hem de *Ganoderma lucidum*'a ait TOS seviyeleri kontrole nazaran minimal düzeyde artış göstermiştir (Şekil 29).

HCT-166 hücrelerinde kontrole göre hem cisplatine hem de *Ganoderma lucidum* gruplarında 48 saatlik TAS seviyelerinde düşüşün olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte HT-29 hücrelerinde 48 saatlik TAS ölçümleri sonucunda kontrol grubuna kıyasla *Ganoderma lucidum* grubunda TAS seviyesinde düşüş gözlenmiş, cisplatin grubunda ise TAS seviyesinde bir fark görülmemiştir (şekil 30)

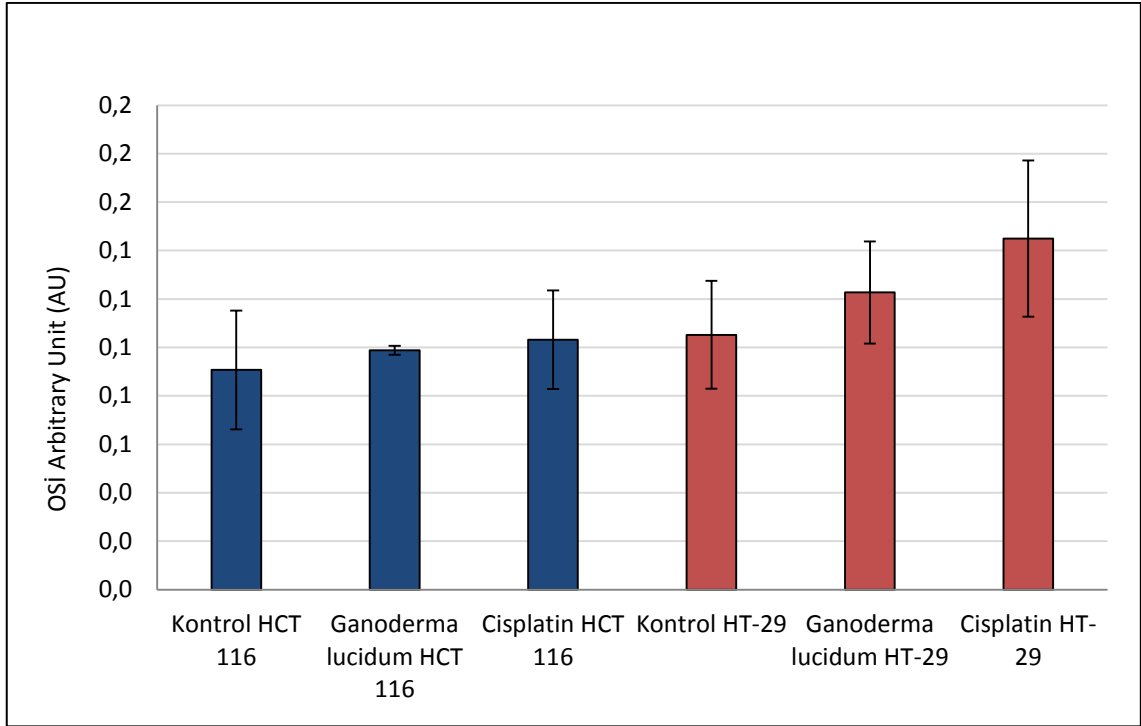
HCT-166 ve HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna oranla hem cisplatin hem de *Ganoderma lucidum* mantar grubunda 48 saat OSİ seviyelerinde artış gözlenmektedir. Fakat *Ganoderma lucidum* mantar grubu, cisplatin grubuna oranla daha fazla artış gerçekleştirmiştir (şekil 31).



Şekil 35. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik TOS değeri grafiği.



Şekil 36. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik TAS değeri grafiği.



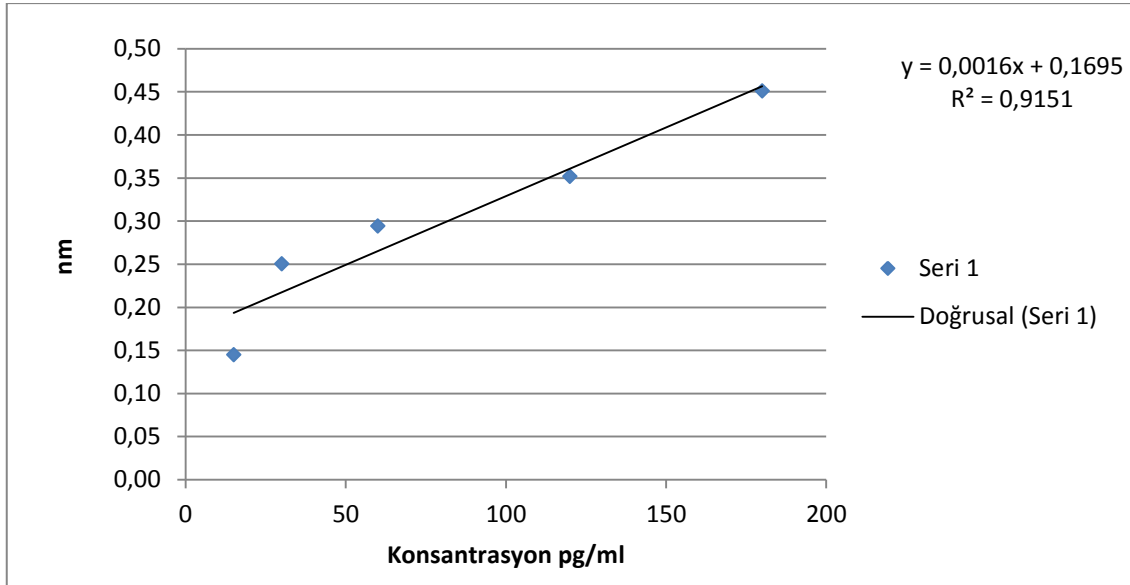
Şekil 37. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik OSİ değeri grafiği.

HTC-116 ve HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna oranla *Ganoderma lucidum* ve cisplatin gruplarında 72 saatlik TOS seviyesinde yükselme görülmüştür (şekil 32).

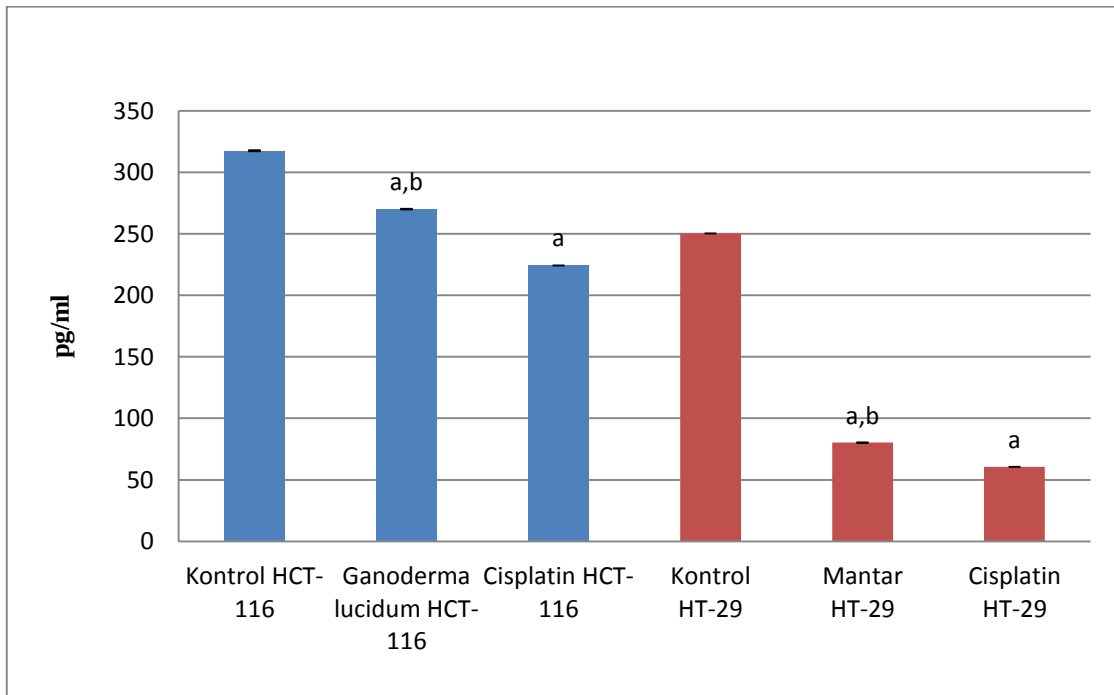
HCT-116 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla *Ganoderma lucidum* ve cisplatin gruplarında 72 saatlik TAS seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bunun aksine HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna oranla *Ganoderma lucidum* ve cisplatin gruplarında 72 saatlik TAS seviyesinde azalma gözlenmiştir (şekil 33).

HCT-116 hücrelerinde kontrol grubuna oranla *Ganoderma lucidum* ve cisplatin gruplarında 72 saatlik OSİ seviyesinde az miktarda artış olmuştur. Bununla birlikte HT-29 hücrelerinde kontrol grubuna oranla *Ganoderma lucidum* ve cisplatin gruplarında 72 saatlik OSİ seviyesinde yükselme gözlemlenmiştir (şekil 34).

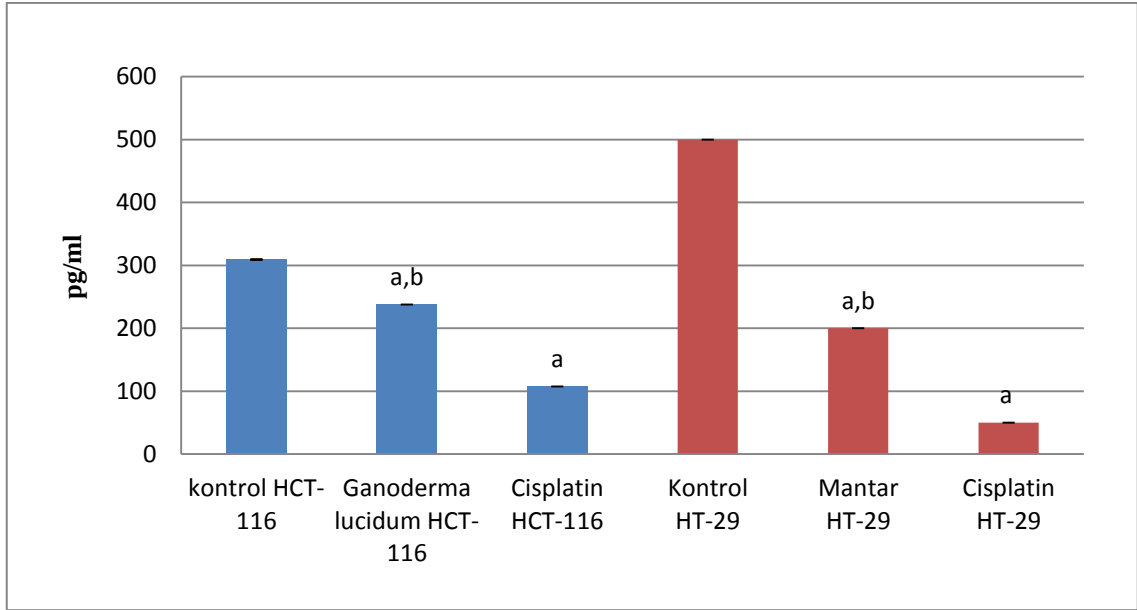
4.5. NRF-2 Bulguları



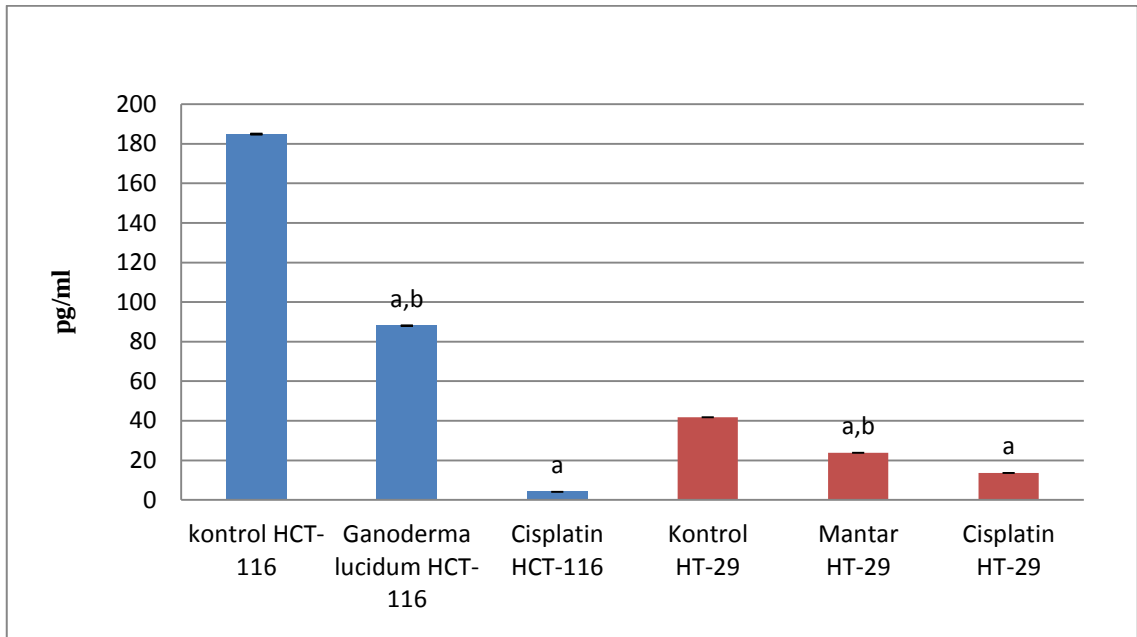
Şekil 38. NRF-2 kit standart konsantrasyon grafiği.



Şekil 39. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 24 saatlik NRF-2 grafiği. *(HT-29 değerleri seyreltme faktörü 10x'dir).



Şekil 40. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik NRF-2 grafiği. *(HT-29 değerleri seyreltme faktörü 10x'dir).



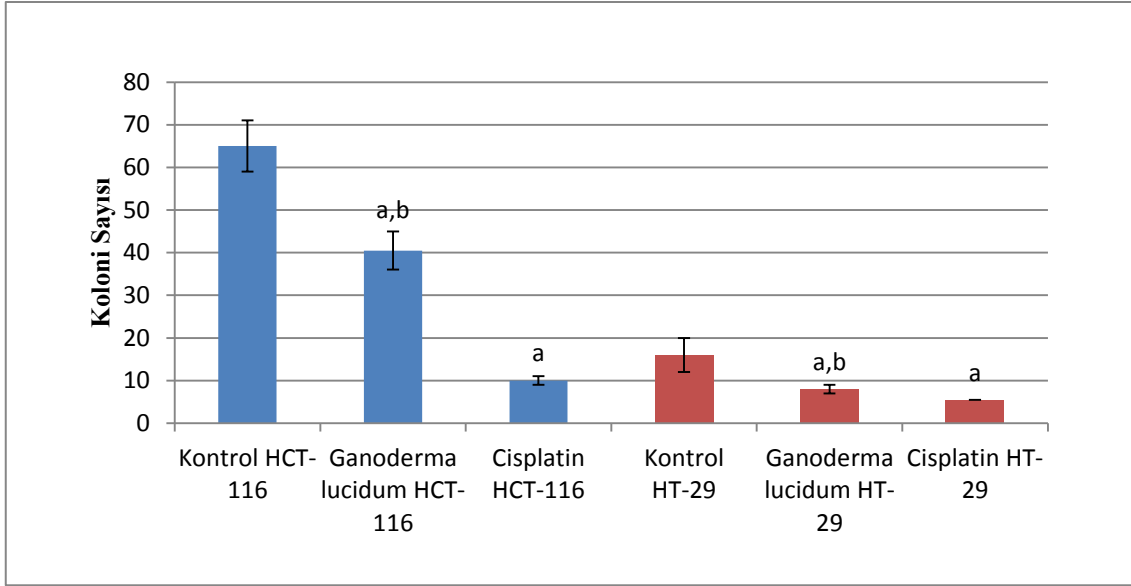
Şekil 41. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 72 saatlik NRF-2 grafiği.

Elde edilen bulgulara göre *Ganoderma lucidum* uygulanmış HT-29 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlik, HCT-116 hücre hattında ise 48 ve 72 saatlik NRF-2 değerleri kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Fakat HCT-116 hücre hattının 24

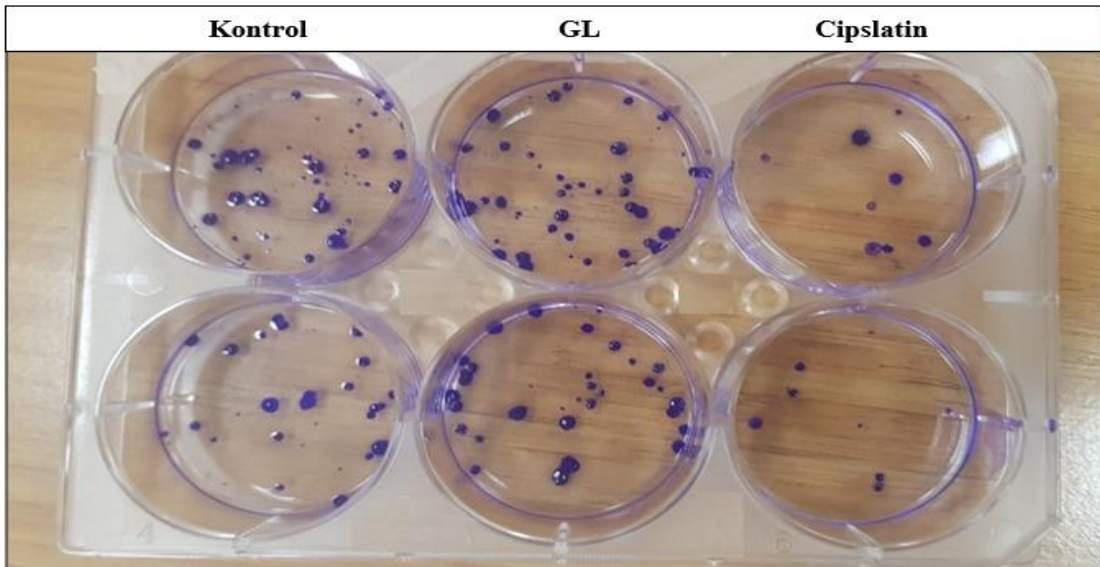
saatlik NRF-2 ölçümleri incelendiğinde *Ganoderma lucidum*'a ait değerlerin kontrole göre artış gösterdiği görülmüştür.

4.6. Koloni Oluşturma Bulguları

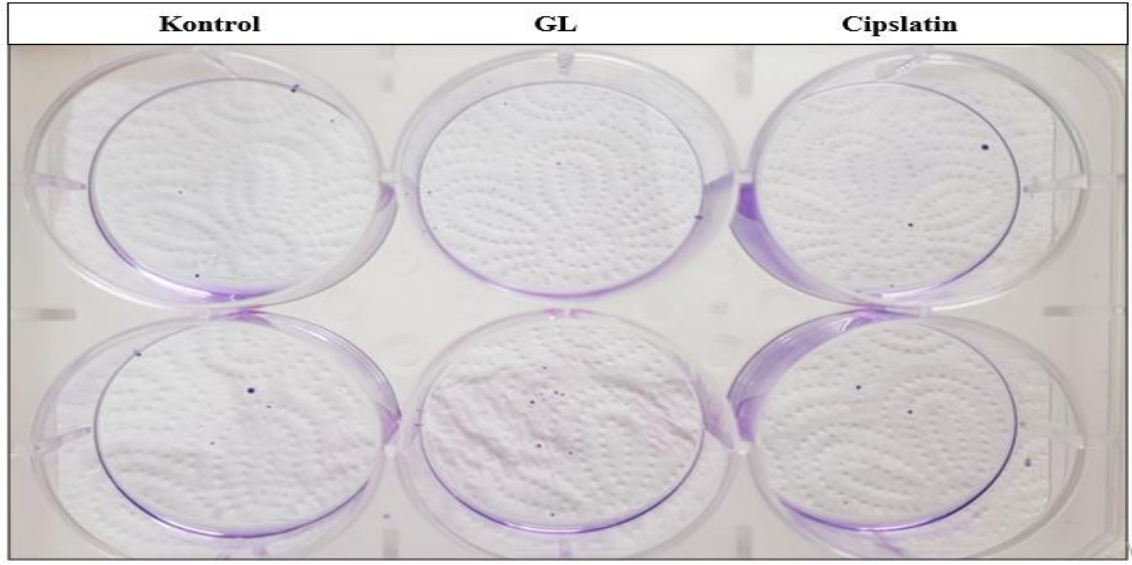
Ganoderma lucidum ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde koloni oluşumu gözlemlendi.



Şekil 42. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 ve HT-29 hücrelerindeki 21 günlük koloni oluşum grafiği.



Şekil 43. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücrelerindeki 21 günlük koloni oluşum resmi.



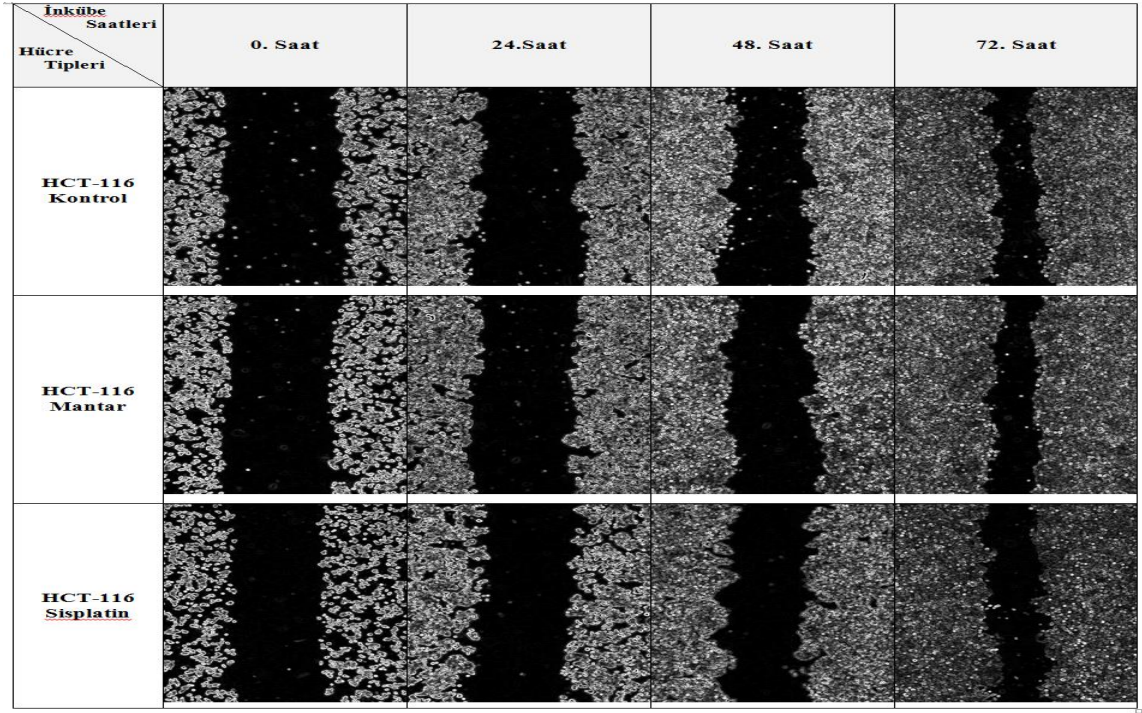
Şekil 44. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki 21 günlük koloni oluşum resmi.

Elde edilen bulgulara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktı HCT-116 ve HT-29 hücre hattında koloni oluşumunu önlemiştir. Cisplatin grubu ise hem kontrole hem de *Ganoderma lucidum*’a göre koloni oluşumunu istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşürmüştür.

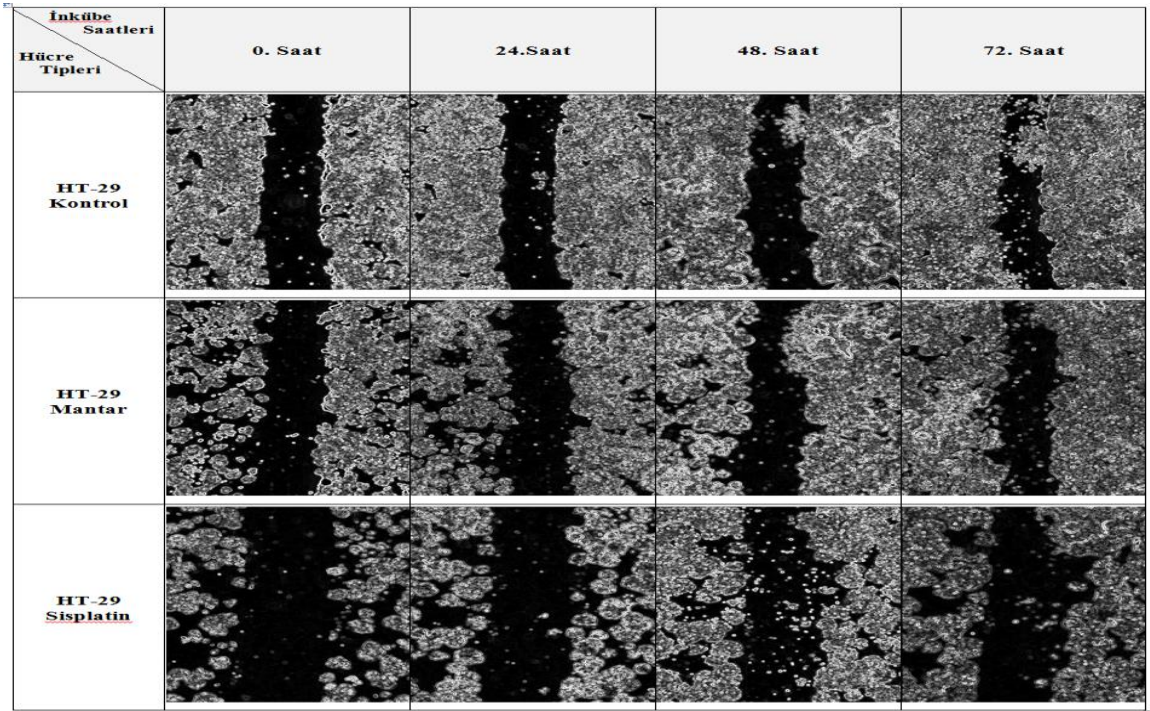
4.7. Hücre Göçü Bulguları

Ganoderma lucidum ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 ve HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinde hücre göçü oluşumu gözlemlendi.

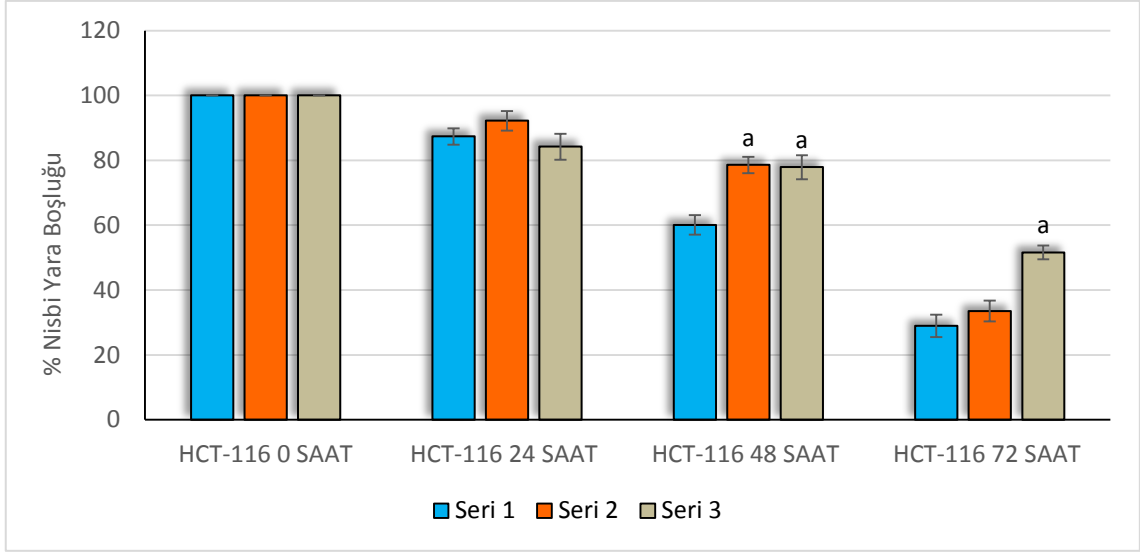
Elde edilen sonuçlara göre, hem HT-29 hem de HCT-116 hücre hatlarına uygulanan cisplatin kontrol grubuna göre 24, 48 ve 72 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre göçünü azaltmıştır. *Ganoderma lucidum* ise hem HT-29 hem de HCT-116 hücre hatlarında uygulanan *Ganoderma lucidum* ekstraktı kontrol grubuna göre 48 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre göçünü azaltmıştır. Ancak 24 ve 72 saatte *Ganoderma lucidum* ekstraktı kontrol grubuna göre hücre göçü istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.



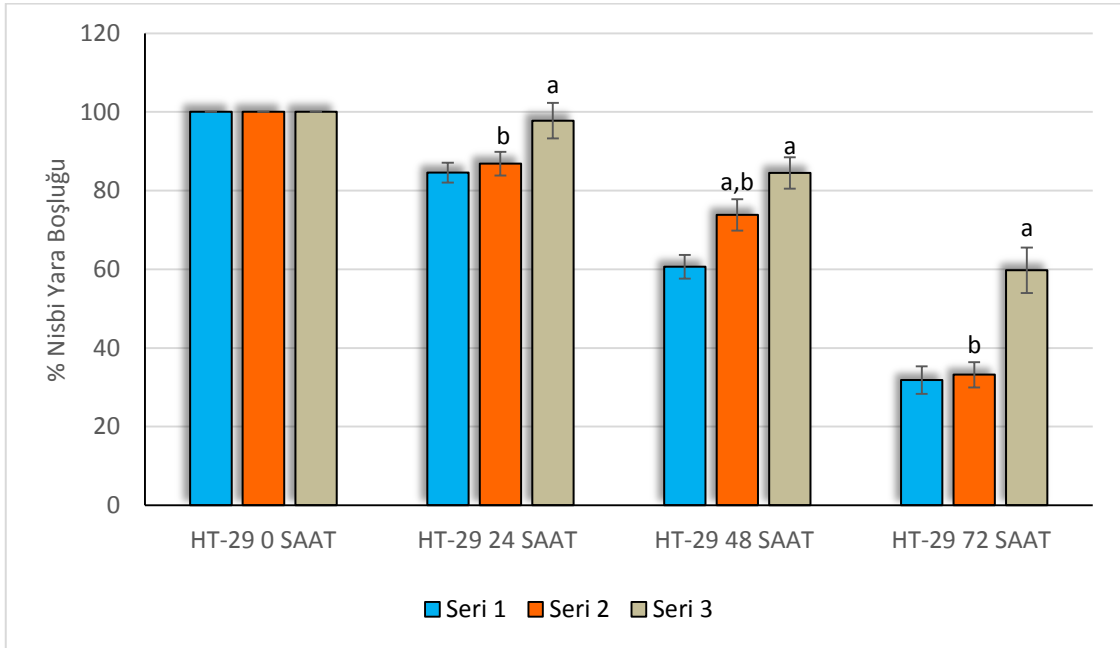
Şekil 45. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücresindeki hücre göçü.



Şekil 46. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki hücre göçü.



Şekil 47. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HCT-116 hücresindeki hücre göçü grafiği (Seri 1: Kontrol, Seri 2: *Ganoderma lucidum*, Seri 3: Cisplatin).



Şekil 48. *Ganoderma lucidum* ve cisplatin ile muamele edilmiş HT-29 hücresindeki hücre göçü grafiği (Seri 1: Kontrol, Seri 2: *Ganoderma lucidum*, Seri 3: Cisplatin).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mantarlar genel olarak sağlıklı bir gıda kaynağı olarak bilinir ve dünyada çoğu ülkelerde yaygın olarak tüketilir. Mantarlar, riboflavin, niasin, D vitamini, lif, selenyum, potasyum ve biyoaktif bileşikler dahil olmak üzere birçok önemli besin içerir (Chatterjee ve Patel, 2006). Laboratuvar çalışmaları, mantar ve mantar özlerinin antikarsinojenik ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğuna dair bazı kanıtlar göstermiştir (Roupas ve ark., 2012). Ancak, mantar alımı ile kanser riski arasındaki ilişkiyi değerlendiren insan çalışmaları azdır (Li ve ark., 2014). Modern tıbbi çalışmalar, *Ganoderma lucidum* mantarın antiinflamatuvar, antioksidan, anti-glisemik, anti-ülser, anti-kanser ve immün sistemi uyarıcı etkiler dahil olmak üzere geniş bir biyoaktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Yuen, 2008). Özellikle kanser ve diyabet için alternatif bir adjuvan tedavi olarak kabul edilmiştir (Ma, 2015). *Ganoderma lucidum* mantarının farklı konsantrasyona bağlı bir şekilde insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve SW 480) hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Liang ve ark., 2014). *Ganoderma lucidum*, glikoproteinler, polisakkaritler, triterpenoidler, meroterpenoidler, seskiterpenoidler, steroidler, alkaloidler, benzopiran türevleri ve benzoik asit türevleri gibi çok çeşitli bileşenler içerir (Baby ve ark., 2015).

Kötü huylu tümörlerin özelliklerinden biri olan kanser metastazı, çoğu kanser hastasında birincil ölüm nedenidir. Tümör hücre göçü metastaz için bir ön koşuldur (Mehlen ve Puisieux, 2006). Bu nedenle, tümör hücresi hareketliliğinin hedeflenmesi, kanser tedavisinde büyük ilgi görmüştür.

Bu çalışmada *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının anti kanser özelliğe sahip olup olmadığı HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatları üzerinde MTT yöntemiyle test edildi. MTT deney uygulamasında elde edilen sonuçlara göre *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının zamana ve doza bağlı olarak HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun ile birlikte kemoterapik bir ilaç olarak kullanılan cisplatin maddesinin de KRK hücre hatları üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak MTT yöntemi ile sitotoksikite testi yapıldı. Yapılan sitotoksikite testleri sonucunda hem *Ganoderma lucidum* hem de cisplatinin

IC₅₀ değeri hesaplanmıştır ve elde edilen IC₅₀ sonuçları Tablo 1' de gösterilmiştir. Sitotoksite testlerinde elde edilen IC₅₀ değeri baz alınarak çalışmalara devam edildi.

Daha önceki çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu çalışmadaki sonuçları destekler niteliktedir. HCT-116 hücre hattında *Ganoderma lucidum* ekstraktının *in vitro* tümör hücresi hareketliliğini, invazyonunu ve *in vivo* tümör metastazını inhibe edebileceğini göstermiştir (Liang ve ark., 2014). Hem HCT-116 hem de HT-29 hücrelerinin canlılığı zamana ve doza bağımlı olarak *Ganoderma lucidum* ile muamele sonucunda %80 oranında bastırılmıştır. *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının KRK hücre hatlarında siklin D1 ekspresyonunu aşağı yöne doğru, p53 ekspresyonunu yukarı yöne doğru regüle ederek G1 fazında hücre döngüsünü tutuklanmasını indükleyebileceği tespit edilmiştir (Xiuli ve ark., 2016).

Bu çalışmada DNA Ladder Kit kullanılarak *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının ve cisplatin maddesinin IC₅₀ dozu HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatlarına uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik DNA hasarı incelendi. Elde edilen sonuçlara göre 24, 48 ve 72 saatlik HCT-116 hücre hattında cisplatin kontrol grubuna göre etkili bir şekilde aşağıya doğru bantlanma gözlemlenmiştir. Fakat *Ganoderma lucidum* kontrol grubuna göre belirgin bir fark gözlenememiştir. HT-29 hücre hattında ise 24 ve 72 saatlik *Ganoderma lucidum* ve cisplatin uygulaması sonucunda, cisplatin kontrol grubuna göre aşağı yönde belirgin bir şekilde bantlanma gözükürken *Ganoderma lucidum* kontrol grubuna göre belirli bir fark oluşturmamıştır.

Çeşitli metabolik işlemlerin yan ürünleri olarak üretilen serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, oksidasyon süreçleri ile hücrelere ciddi şekilde zarar verebilir. Serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin uzun süreli varlığı yaşlanmayı ve yaşla ilişkili sayısız hastalığı hızlandırır (Bishop KS ve ark., 2015). Oksidatif stres, kanser gelişiminde önemli bir rol oynar. Kanser başlanması, nokta mutasyonları veya kromozomal anormallikler gibi DNA'daki değişikliklerle karakterizedir (Bakhoum ve Compton, 2012). Artmış seviyelerde oksidatif stres DNA lezyonlarının birçok kanserin etiyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Sosa ve ark., 2013).

Bu çalışmada Rel Assay TAS ve TOS kitleri kullanılarak *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının ve cisplatin maddesinin IC₅₀ dozu HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatlarına uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik oksidatif stres ölçümü yapıldı. Elde edilen

sonuçlara göre, *Ganoderma lucidum* ve cisplatin grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu gözlemlenmemiştir.

NRF-2 deneyinde eliza kiti kullanılarak *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının ve cisplatin maddesinin IC_{50} dozu HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatlarına uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik NRF-2 seviyesi belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre hem HCT-116 hem de HT-29 KRK hücre hattında kontrol grubuna göre *Ganoderma lucidum* ve cisplatin kontrol grubuna göre NRF-2 seviyesini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bu nedenle bu çalışmada cisplatin ve *Ganoderma lucidum* uygulanmış hücrelerde NRF-2 seviyesinin düşük olması dikkate alındığında, bu maddelerin kanserli hücrelerde NRF-2 adaptasyonunu kırdığı varsayılabilir. Elde edilen bu sonuçlar sitotoksikite testi sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Koloni oluşumu deneyinde *Ganoderma lucidum* ve cisplatin maddesinin IC_{50} dozu belirli sayıdaki HT-29 ve HCT-116 KRK hücre hatlarına uygulanarak 21 günlük koloni sayıları tespit edildi. Deney sonuçlarına göre kontrol grubu *Ganoderma lucidum* ve cisplatin'in maddesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde koloni oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda cisplatin maddesinin *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktına göre de istatistiksel olarak anlamlı derecede koloni oluşumunu önlediği görülmüştür. Yapılan sitotoksikite testi ve NRF-2 eliza testi sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Hücre göçü (Scratch assay) testinde *Ganoderma lucidum* ve cisplatin maddesinin IC_{50} dozu kullanıldı ve 24, 48 ve 72 saatlik hücre göçü oranları tespit edildi. Elde edilen sonuçlara cisplatin maddesinin kontrol grubuna göre hücre göçünü istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Fakat *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktı kontrol grubuna göre hücre göçü istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının kanser tedavisinde alternatif bir yöntem ya da kemoterapik bir ilaç olup olamayacağı potansiyeli araştırılmıştır. Bu hipotez ile gerçekleştirilen deneylerde, kullanılan mantar ekstraktlarının IC_{50} değerlendirmesi sonucunda *Ganoderma lucidum* ekstraktının sitotoksik etkisi diğer mantar ekstraktlarına göre yüksek bulunmuştur. *Ganoderma lucidum* uygulaması sonucu NRF-2 seviyesinin düşük çıkması, bu mantar hücrelerin oksidatif strese karşı antioksidan savunma adaptasyonunu zayıflatmış olduğunu göstermektedir.

Başka bir deyişle *Ganoderma lucidum* ekstraktı NRF-2 seviyesini düşürerek hücrel oksidan miktarını arttırmıştır. Ayrıca oksidatif stres analizlerindeki OSI değerin dalgalanma göstermesi sitotoksik etkinin yüksek çıkmasını desteklemektedir. *Ganoderma lucidum* ekstraktının sitotoksik ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Çalışmadan elde edilen veriler genel olarak *Ganoderma lucidum* ekstraktının sitotoksik ve antiproliferatif etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Bu veriler literatüre katkı sağlayacaktır. Yine de *Ganoderma lucidum* mantar ekstraktının anti-kanserojenik etkilerinin tam ortaya çıkarılması, bu çalışmadan elde edilen verilerin desteklenmesi için gelecekte hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmaların gerçekleşmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Baby, S., Johnson. A.J., Govindan, B., 2015, Secondary metabolites from Ganoderma. **Phytochemistry**, **114**; 66–101.
- Bakhoun, S.F., Compton, D.A., 2012, Chromosomal instability and cancer: A complex relationship with therapeutic potential. **J Clin Invest**, **122**: 1138–43.
- Başak, P., Sadhukhan, P., Sarkar, P., ve Sil, P.C., 2017, Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy. **Toxicol Rep**, **4**:306–318.
- Baykara, O., 2006, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. **Balıkesir Sağlık Bil. Derg**, **5** (3): 154-165.
- Bishop, K.S., Kao, C.H.J., Xu, Y., Glucina, M.P., 2015, Paterson R.R.M., Ferguson L.R. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. **Phytochemistry**. **114**:56–65
- Chatterjee, B., 2016, Patel T. Edible mushroom—a nutritious food improving human health. **Int J Clin and Biomed Res** **2** (1): 34-37.
- Chen, G.G., Lai, BS., 2009, Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy Apoptosis in Canc. **Springer Netherlands**:1-396
- Cutsem, E.V., Lenz, H-J., Köhne, H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezinek, I., ve ark. 2015, Fluorouracil, leucovorin and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** **33** (7): 692-700.
- Demain, A.L., ve Vaishnav, P., 2011, Natural products for cancer chemotherapy, **Microb. Biotechnol.** **4**: 687–699.
- Duesberg, P., Li, R., David, R., Charlotte R, Andreas W, Alwin K ve ark. 2000, Aneuploidy Precedes and Segregates with Chemical inogenesis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 83-93.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
- Girek, M., Klosinski, K., Grobelski, B., Pizzimenti, S., Cucci, MA., Daga, M., ve ark. 2019, Novel tetrahydroacridine derivatives with iodobenzoic moieties induce G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 non-small lung cancer and HT-29 colorectal cancer cells. **Mol Cell Biochem** **460**,(1): 123–150.
- Gold, R., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., ve ark., 2012, "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis". *The New England Journal of Medicine*. **367** (12): 1098–107.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell J**. **144**(5):646-674.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., ve ark. 1997, "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements". **Biochem Biophys Res Commun**, **236** (2): 313–22.

- İnci, A., Yıldırım, A., Yavuz, A., Duzlu, Ö., 2009, Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **6** (2): 121-133.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., 2002, Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, **108**:153–64.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., ve ark. 2004, Oxidative stress sensör Keap1 functions as an adaptör for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and Cellular Bio*, **24** (16): 7130-39.
- Li, J., Zou, L., Chen, W., Zhu, B., Shen, N., Ke, J., ve ark. 2014, Dietary mushroom intake may reduce the risk of breast cancer: evidence from a meta-analysis of observational studies. *PloS one*, **9** (4):e93437.
- Liang, Z., Guo, Y.T., Yi, Y.J., Wang, R.C., Hu, Q.L., Xiong, X.Y., 2014, Ganoderma lucidum Polysaccharides Target a Fas/Caspase Dependent Pathway to Induce Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev*, **15**: 3981–86.
- Liang, Z., Yi, Y., Guo, Y., Wang, R., Hu, Q., Xiong, X., 2014, Chemical characterization and antitumor activities of polysaccharide extracted from Ganoderma lucidum. *Int. J. Mol. Sci*, **15**: 9103–16.
- Ma, H-T., Hsieh, J-F., Chen, S-T., 2015, Anti-diabetic effects of Ganoderma lucidum. *Phytochemistry*, **114**: 109–13.
- Mehlen, P., Puisieux, A., 2006, Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer*, **6**: 449–58.
- Mian, M., Tinelli, M., March, DE., Turri, G., Meneghini, V., Pescosta, N., Berno, T., ve ark. 2016, Bortezomib, Thalidomide and Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma? *Anticancer Res*. **36** (3):1059-65.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65** (1–2): 55–63.
- Peplow, P.V., Chatterjee, M.P., 2013, İn vitro insan keratinosit göçünde büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisinin gözden geçirilmesi. *Sitokin*, **62** (1): 1–21.
- Rajendran, V., ve Jain, M.V., 2018, In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells, *Methods Mol Biol*, **1692**:89-95.
- Ranjan, A., Fofaria, N.M., Kim, S.H ve Srivastava, S.K., 2015, Modulation of signal transduction pathways by natural compounds in cancer, *Chin. J. Nat. Med*, **13** (10):730-42.
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P., 2012, The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, **4** (4):687–709.
- Sheikh, B.Y., Sarker, M.M.R., Kamarudin, M.N.A., Ismail, A., 2017, Prophetic medicine as potential functional food elements in the intervention of cancer: a review. *Biomed. Pharmacother*, **95**: 614-48.

- Siegel, R., Desantis, C., ve Jemal, A., 2014, Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J. Clin*, **64** (2): 104-117.
- Siegel, RL., Miller, K.D., Jemal, A., 2013, Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin*, **66** (1): 7-30
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev*, **12**: 376–90.
- Stewart , B.W., Wild, C.P., (2014). *World Cancer Report*, ISBN: 978-92-832-0429-9.
- Suman, S., Pandey, A., Chandna, S., 2012, An improved non-enzymatic “dNA ladder assay” for more sensitive and early detection of apoptosis. *Cytotechnology*, **64**, (1); 9–14.
- Tez, M., Göçmen, E., Koç, M., ve Akgül, H., 2005, Kolorektal Kanserde Oksidatif Stres (Erken Sonoçlar). *Selçuk Tıp Derg*, **21**: 79-82.
- Tokur, O., Aksoy, A., 2017, In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniv.Vet. Fak. Derg.*, (1):112–8.
- Tülüce, Y., Ahmed, B.A., Koyuncu, İ., ve Durgun, M., 2018, The cytotoxic, apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells. *J. Bioenerg and Biomembr*, 07-116.
- Tülüce, Y., Lak, P.T., Koyuncu, İ., Kilic, A., Durgun, M., Özkol, H., 2017, The apoptotic, cytotoxic and genotoxic effect of novel binuclear boron-fluoride complex on endometrial cancer. *BioMetals*, **30** :933-44.
- Tülüce, Y., Masseh, H.D.I., Koyuncu, İ., Kiliç, A., Durgun, M., Özkol, H., 2019, Novel fluorine boron hybrid complex as potential antiproliferative drugs on colorectal cancer cell line. *Anticancer Agents Med Chem*, **19**: 627-37.
- Urgen, M., Kocabaş, F., Nalbantsoy, A., Hames-Kocabas, E., Uzel, A., ve Bedir, E., 2010, Bioassay-guided isolation of antibacterial and cytotoxic compounds from the mesophilic actinomycete M-33-5. *Nat Prod Commun*, **5** (2):249-52.
- Vucic, D., Fairbrother, W., 2007, The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*, **13**:20.
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J.A., Benzie, I.F.F., Ganoderma lucidum (lingzhi or reishi): a medicinal mushroom. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 9.
- Wang, Y.Y., Khoo, K. H., Chen, S.T., Lin, C.J., Wong, C.H., Lin, C. H., (2002). Studies on the immuno-Modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-Containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorganic and medicinal chemistry*. **10**; 1057-62.
- World Health Organization, (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272596>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, viii, 86 p.

Xiuli, D., Wenlong, L., Jack, H.W., Tzi, B., 2016, A Ribonuclease Isolated from Wild *Ganoderma Lucidum* Suppressed Autophagy and Triggered Apoptosis in Colorectal *Cancer Cells. Front Pharmacol*, **7**: 217.

Saxena, R., Rida, P.C., Kucuk, O., Aneja, R., 2016, Ginger augmented chemotherapy: A novel multitarget nontoxic approach for cancer management. *Mol Nutr Food Res*. **60** (6):1364-73.

Yan, X.T., Lee, S.H., Li, W., Sun, Y.N., Yang, S.Y., Jang, H.D., Kim, Y.H., 2014, Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. *Food Chem*, 408-15.

Yin, D., Morris, C.R., Bates, J.H., ve German, R.R., 2011, Effect of misclassified underlying cause of death on survival estimates of colon and rectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. **103**: 1130–33.

Yuen, J.W., Gohel, M.D., 2008, The dual roles of Ganoderma antioxidants on urothelial cell DNA under carcinogenic attack. *J. Ethnopharmacol*, **118**: 324–330.

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., ve Lowe, S.W., 2006, Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell J*, **125**, 1253–67.

ÖZGEÇMİŞ

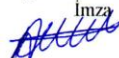
27.11.1995 tarihinde Van'da doğan Ahmet Yasin KELEŞ, ilk öğrenimini 2001-2005 yılları arasında Vankulu İlköğretim okulunda, orta öğrenimi 2005-2009 yılları arasında okuyarak mezun olmuştur. Lise öğrenimini 2009-2013 yılları arasında Van Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamlamıştır. Lisans öğrenimini ise 2013-2017 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde tamamlamıştır.

2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. 2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde diş protez teknisyeni olarak çalışmaya başlamıştır.

EKLER

EK1. Tez Orjinallik Raporu

	T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 13/01/2021
Tez Başlığı / Konusu: ÇEŞİTLİ MANTAR EKSTRAKTLARININ KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATLARINDA GENOTOKSİK, APOPTOTİK, SİTOTOKSİK ve GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ Yukarıda başlığı belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 13/01/2021 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %10 (yüzde ON) dur. <u>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</u> - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Ahmet Yasin KELEŞ Öğrencinin Adı Soyadı İmza 

Öğrencinin Adı Soyadı	Ahmet Yasin KELEŞ
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji
Öğrenci No	17930002013
Programı	: ☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) Prof. Dr. Yasin Tülüce	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) 