



Geliş(Received) :31/07/2018  
Kabul(Accepted) :24/09/2018

Araştırma Makalesi  
Doi:10.30708/mantar.449790

## ***Ganoderma lucidum*'un Türkiye'deki Yabani Ve Kültür Formlarının Tavuk Embriyoları Üzerindeki Bazı Etkilerinin Karşılaştırılması**

Haluk ÖZPARLAK<sup>1\*</sup>, Bülent ÇELİK<sup>1</sup>, Döndü BALTA<sup>1</sup>

\*Sorumlu Yazar: hozparlak@selcuk.edu.tr

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Türkiye

**Öz:** “Ölümsüzlük mantarı” veya “Reishi” olarak da bilinen *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst tüm dünyada ve özellikle de Çin’de alternatif tıp alanında kullanılan bir mantardır. Son yıllarda *G. lucidum*’un kültür formu Türkiye’de de yetiştirilmektedir ve halk tarafından özellikle çay, kahve ve tablet olarak tüketilmektedir. Bu çalışmayla Türkiye’deki yabani ve kültür *G. lucidum*’un alternatif bir deney hayvanı olarak tavuk embriyoları üzerindeki bazı etkilerinin ilk kez tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaçla iki deney gerçekleştirildi. *G. lucidum*’un birinci deneyde yabani ve ikinci deneyde kültür formu aynı dozlarda test edildi. Deneylerde dömlü tavuk yumurtalarına kuluçkanın 8. gününde *G. lucidum*’un sulu ekstraktları farklı dozlarda (1750 µg/yumurta, 875 µg/yumurta ve 219 µg/yumurta) enjekte edildi. Kontrol gruplarına steril bi-distile su enjekte edildi. Kuluçkanın 11. gününde ölü ve anormal embriyo oranları, malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo oranları tespit edildi. Ayrıca kemik gelişiminin belirlenebilmesi için embriyoların bir kısmı total olarak Alizarin Red-S yöntemiyle boyandı. *G. lucidum*’un hem yabani hem de kültür formları test edilen dozlarda önemli bir embriyotoksik ve teratojenik etki göstermedi. Ayrıca embriyoların kemik gelişimini de makroskopik seviyede etkilemedi.

**Anahtar kelimeler:** Alizarin Red-S, civciv embriyosu, embriyotoksiste, *Ganoderma*, teratojenite

### **Comparison Of Some Effects Of Wild-Grown And Cultivated Forms Of *Ganoderma Lucidum* In Turkey On Chicken Embryos**

**Abstract:** *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst is a mushroom which used for alternative medicine worldwide particularly in China, also known as “Immortality Mushroom or Reishi”. In recent years, cultivated *G. lucidum* is also produced in Turkey and consumed by people especially as tea, coffee and tablets. The aim of this study was to determine the some effects of wild-grown and cultivated *G. lucidum* in Turkey on the development of chicken embryos, as an alternative experimental animal, for the first time. Two experiments were carried out for this purpose. Wild-grown and cultivated forms of *G. lucidum* were tested at the same doses in the first and second experiment, respectively. Aqueous extracts of *G. lucidum* at different doses (1750 µg/egg, 875 µg/egg and 219 µg/egg) were injected into the fertilized chicken eggs at 8th day of incubation as well as sterile bi-distilled water for control groups. Following parameters were examined on 11th day of the incubation: rates of dead and abnormal embryo, malformation types, live and relative embryo weights. In addition, some of the embryos were totally stained with Alizarin Red-S method for bone development. Both wild-grown and cultivated forms of *G. lucidum* at doses tested did not present significant embryotoxic and teratogenic effects as well as did not affect the bone development of embryos at the macroscopic level.

**Key words:** Alizarin Red-S, Chick Embryo, embryotoxicity, *Ganoderma*, teratogenicity



## Giriş

Mantarlar çok uzun zamanlardan beri insanlar için doğal besin kaynağı ve alternatif tıp yöntemleri içinde ilaç olarak kullanım alanı bulmuştur. Bu mantarlardan bir tanesi de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'dır. Çin, Kore ve Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde *Ganoderma*'nın bazı türleri tıbbi amaçlı doğal ürünler olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda *G. lucidum*'ün kullanımına ilişkin yoğun bir ilgi oluşmuştur. Yapılan araştırmalar içerdiği bileşiklerin medikal anlamda çok ciddi etkileri olduğunu göstermiştir (Lee ve ark., 1998).

Çin'de "Ling Zhi" olarak bilinen *G. lucidum* için Japonya'da Reishi, Mannentake veya Sachitake, Kore'de ise Youngzi isimleri kullanılır. Çin geleneklerine göre, Lingzhi "mucize" veya "uğurlu" mantar olarak bilinip genellikle mutluluğun, iyi şansın, sağlığın ve uzun yaşamın sembolüdür (Wasson, 1968). Geleneksel Çin Tıbbi'nde, gerek diğer tıbbi bitkilerle birlikte, gerekse tek başına kullanılsın, Ling Zhi'nin önemli bir yeri vardır. Hafızayı geliştirme, yaşamı uzatması, çevikliği artırması, karaciğer hastalıkları, nefritler, artrit, astım, gastrik ülser, arteriyosklerosis, lökopeniya, diyabet ve anoreksiya gibi hastalıkların tedavisinde ayrıca geleneksel tıpta da çok kullanılmaktadır (Chang ve ark., 1986; Jong ve Birmingham, 1992). Çin'de halk arasında *G. lucidum*, her türlü hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve her derde deva olarak bilinmektedir (Liu, 1999). Günümüzde özellikle bazı kanser türleri, karaciğer yetmezliği, herpetik enfeksiyonlar, HIV gibi pek çok rahatsızlığa iyi geldiği

bilindiği için, yoğun araştırmalar yapılmakta ve ilaç gelişiminde katkı sağlamaktadır (Liu ve ark., 2002).

Yukarıda bahsedildiği gibi *G. lucidum*'ün bu denli kapsamlı olarak etki etmesi sebebiyle hem gıda takviyesi olarak hem de farmakoloji alanında kullanımı söz konusudur. Günümüzde daha çok kültür formu kullanılan *G. lucidum*'ün günlük hayatta çay, kahve, kapsül ve sıvı ekstrakt şeklinde tüketimi giderek artmakta ve çok talep görmektedir. Bu çalışmayla Türkiye'deki yabancı ve kültür *G. lucidum*'ün sulu ekstraktının embriyotoksite ve teratojenite açısından olası etkilerinin alternatif bir deney hayvanı olan tavuk embriyoları üzerinde ilk kez değerlendirilmesi ve bu mantarın iki farklı formundan elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Mantar materyali ve su ekstraktın hazırlanması

Bu çalışmada test edilen yabancı *G. lucidum* örnekleri Karabük-Yenice (Kanyon girişi, 41°08'16K, 032°21'51D, 456 m) ilçesinden Prof.Dr. Gıyasettin KAŞIK ve Uzm.Dr. Sinan ALKAN'ın yardımlarıyla toplandı ve teşhis edilerek laboratuvarında özel kurutma dolaplarında 40-45°C'de kurutuldu (Şekil 1). Kültür *G. lucidum* örnekleri ise ticari bir firmadan kuru ve dilimlenmiş olarak satın alındı (Şekil 2). Kuru örnekler değirmende toz haline getirildi ve su ekstraktlarının hazırlanması için 10 g öğütülmüş mantar 300 ml kaynar bidistile suyla 15 dk karıştırıldı. Ardından örnekler liyofilize edilerek kullanılıncaya kadar buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 1. Türkiye'den toplanan yabancı *G. lucidum*.



Şekil 2. Türkiye'den ticari bir firmadan temin edilen kurutulmuş ve dilimlenmiş kültür *G. lucidum*.



### Deneysel aşamalar

Bu çalışma S. Ü. Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun 20.10.2015 tarih-2015/82 sayılı ve 28.04.2017 tarih-2017/42 sayılı izinleriyle gerçekleştirildi.

Çalışmada iki deney gerçekleştirildi. Birinci deneyde yabancı *G. lucidum* ekstraktı, ikinci deneyde kültür *G. lucidum* ekstraktı test edildi. Test edilen dozların belirlenmesinde ekstraktların stok solüsyonda suda çözünmesi dikkate alınarak kullanılacak en yüksek doz ve onun azalan iki dozu tercih edildi. Deneylerde ticari bir işletmeden temin edilen kahverengi renkte ATA-S cinsi damızlıklara ait toplam 90 adet dömlü kuluçkalık özelliklerde yumurta kullanıldı. Birinci deney için Kontrol (Bi-distile su), YGLEI (219 µg/y) [Yabancı *Ganoderma lucidum* ekstraktı I (219 mikrogram/yumurta)], YGLEII (875 µg/y) ve YGLEIII (1750 µg/y); ikinci deney için Kontrol (Bi-distile su), KGLEI (219 µg/y) [Kültür *Ganoderma lucidum* ekstraktı I (219 mikrogram/yumurta)], KGLEII (875 µg/y) ve KGLEIII (1750 µg/y) grupları oluşturuldu. Her grup için en az 10 yumurta olacak şekilde yumurtalar tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Kuluçka işlemine başlamadan önce %70'lik etanolle kuluçka makinesi dezenfekte edilip yumurtalar kuluçka makinesine uygun konumda yerleştirildi. Kuluçka gelişim makinesine (Cimuka-Prodi HB500S) sıcaklık 37.7°C'ye, nispi nem %55'e ve her saat başı yumurtalar bir kez 180° çevrilecek şekilde gerekli ayarlamalar yapılarak kuluçka işlemi başlatıldı.

Her bir deney için kuluçkanın 8. gününde önceden steril şartlarda hazırlanan ve 4°C'de saklanan test solüsyonlarıyla steril şartlar altında enjeksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Enjeksiyon işlemi yapılmadan yaklaşık 12 saat önce hava kamaralarının uygun pozisyon alması amacıyla çevirme işlemi durdurularak yumurtaların küt ucu yukarı gelecek şekilde dik pozisyona getirildi. Yumurtaların küt uçları enjeksiyon yapılmadan önce %96'lık etanolü pamukla dezenfekte edildi ve yumurta delicisi yardımıyla hava kamarasına delikler açılarak enjeksiyon işlemlerine geçildi. Birinci deney için Kontrol (Bi-distile su) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bi-distile su; YGLEI (219 µg/y), YGLEII (875 µg/y) ve YGLEIII (1750 µg/y) gruplarındaki yumurtalara ise 60 µl hacminde belirtilen dozlarda steril bi-distile suda çözdürülmüş yabancı *G. lucidum* ekstraktı enjekte edildi. İkinci deney için ise farklı olarak KGLEI (219 µg/y), KGLEII (875 µg/y) ve KGLEIII (1750 µg/y) gruplarındaki yumurtalara ise 60 µl hacminde belirtilen dozlarda steril bi-distile suda çözdürülmüş kültür *G. lucidum* ekstraktı enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi tamamlandığında daha önce açılan delikler hızlı bir şekilde sıvı parafinle kapatıldı. Enjekte edilen solüsyonların diffüze olabilmesi için ilk 1 saat yumurtalar hava kamarası yukarıda olacak biçimde dik pozisyonda bekletildi. Takiben yumurtalar kuluçka gelişim makinesine tekrar yerleştirilip kuluçka işlemine 11. güne kadar devam edildi.

Kuluçkanın 11. günü açılan yumurtalarda canlı ve ölü embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (Hamburger ve Hamilton, 1951) skalasına (HH skalası)

göre belirlendi. Canlı embriyolar hassas teraziyle tartıldı ve rölatif embriyo ağırlıkları aşağıda gösterilen formülle hesaplandı;

$$\text{Rölatif embriyo ağırlığı} = \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \times 100$$

Elde edilen embriyolar malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin belirlenmesi amacıyla %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklandı. Bu embriyolarda kanat ve bacakların gelişmemesi, parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler, tüylenmede anormallik, hemoraji, anormal gaga oluşumu, ödem, iç organların ters dönük dışarıda oluşu, tek ve çift göz anormalliği, boyun ve kalça defektleri, beyin dışarda gelişimi ve genel gelişim geriliği gibi çeşitli malformasyonların olup olmadığı öncelikle çıplak gözle daha sonra stereo mikroskopla belirlenmeye çalışıldı. Her gruptan 2-3 adet embriyo kemik gelişiminin tespit edilmesi amacıyla total olarak Alizarin Red-S boyama metoduyla (Tamayo Arango ve ark., 2012) boyandı. Bu metoda göre; tespit edilmiş embriyolar bir gün %70'lik etanolde ve ardından bir gün %2'lik KOH'de bekletildikten sonra, %2'lik KOH'de taze olarak hazırlanmış %0.005-0.0025'lik Alizarin Red-S (Merc-106278) içerisinde kontrollü bir şekilde 1-2 gün süreyle boyandı. Embriyolar 1-2 gün tekrar %2'lik KOH'e alındı. Son olarak KOH (%2'lik)+gliserol+amonyak (1:1:1) karışımında 3-7 gün bekletilen embriyolar gliserole alınarak fotoğrafları çekildi.

Canlı ve rölatif embriyo ağırlıklarının değerlendirilmesi amacıyla Kontrol ve diğer grupların aralarındaki farkı belirlemek için t-testi uygulandı ve p<0.05 önem düzeyi olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler uygulanırken paket program (SPSS, 2004) kullanıldı.

### Bulgular

Çalışmada kullanılan yumurtaların dömlülük oranları Tablo 1'de verilmiştir. Kontrol gruplarında 11 günlük yumurta ağırlık kaybı ve günlük yumurta ağırlık kaybı sırasıyla I. deneyde %5.54 ve %0.50, II. deneyde ise %6.39 ve %0.58 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

I. ve II. deneylerdeki tüm gruplarda canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2). Hem yabancı hem de kültür *G. lucidum* ekstraktının test edilen dozlarda bir embriyonik ölüme sebep olmadığı ve tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Yabancı *G. lucidum* ekstraktının test edildiği ilk deneyde canlı embriyo ağırlığı bakımından Kontrol grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir. Rölatif embriyo ağırlığı bakımından ise sadece YGLEIII (1750 µg/y) grubu Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde azalma göstermiştir (p<0.05). Kültür *G. lucidum* ekstraktının test edildiği ikinci deneyde Kontrol grubuyla diğer gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark



gözlenmezken, rölatif embriyo ağırlığı bakımından sadece KGLEI (219 µg/y) grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bu veriler de *G. lucidum*'un Türkiye'deki yabancı ve kültür formlarının tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermediğine işaret etmektedir.

Gelişme geriliklerinin ve malformasyonların tespiti için çıplak gözle ve stereo mikroskop altında yapılan gözlemlerde, her iki deneyde de hiçbir grupta anormal embriyo gözlenmemiştir (Tablo 2). Gruplardaki normal embriyolardan bazılarının fotoğrafları Şekil 3-6'da görülebilir. Ayrıca iskelet sisteminin gelişim geriliklerini

incelemek amacıyla Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyolar makroskobik olarak incelenmiştir. Her iki deneydeki tüm gruplardan boyama yapılan embriyoların iskelet gelişiminde Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman önemli bir geriliğe ve herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Kemik gelişimini gösteren fotoğraflar Şekil 7 ve 8'de görülebilir. Anormal embriyo oranları ve Alizarin Red-S boyama yöntemi sonuçları göz önüne alındığında; test edilen dozlarda kültür ve yabancı *G. lucidum* ekstraktının tavuk embriyoları üzerinde teratojenik bir etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 1. Kuluçkanın 11. gününe ait veriler (YGLE, yabancı *Ganoderma lucidum* ekstraktı; KGLE, Kültür *Ganoderma lucidum* ekstraktı; µg/y, mikrogram/yumurta; Ort±SS, ortalama±standart sapma).

Gruplar (Doz)		Graptaki yumurta sayısı	Döllü yumurta sayısı	Döllülük oranı (%)	Yumurta başlangıç ağırlığı (g) (Ort±SS)	Kuluçkanın 11. gününde yumurta ağırlığı (g) (Ort±SS)	11 günlük yumurta ağırlık kaybı (%)	Günlük yumurta ağırlık kaybı (%)
I. deney	Kontrol (Bi-distile su)	12	10	83.33	59.95±2.56	56.63±2.72	5.54	0.50
	YGLEI (219 µg/y)	13	10	76.92	61.74±4.92	58.17±5.32	5.78	0.53
	YGLEII (875 µg/y)	13	12	92.31	61.82±4.50	58.00±4.71	6.18	0.57
	YGLEIII (1750 µg/y)	12	9	75.00	62.5±3.58	58.46±3.46	6.46	0.59
II. deney	Kontrol (Bi-distile su)	10	7	70.00	64.13±4.71	60.03±4.59	6.39	0.58
	KGLEI (219 µg/y)	10	7	70.00	61.21±3.15	58.15±1.93	5.00	0.46
	KGLEII (875 µg/y)	10	10	100.00	59.83±3.45	55.28±4.09	7.60	0.70
	KGLEIII (1750 µg/y)	10	9	90.00	61.96±4.66	57.82±5.08	6.68	0.61

Tablo 2. Kuluçkanın 11. gününde embriyolara ait bazı veriler (YGLE, yabancı *Ganoderma lucidum* ekstraktı; KGLE, Kültür *Ganoderma lucidum* ekstraktı; µg/y, mikrogram/yumurta; Ort±SS, ortalama±standart sapma).

Gruplar (Doz)		Döllü yumurta sayısı	Canlı embriyo sayısı	Canlılık oranı (%)	Canlı embriyo ağırlığı (g) (Ort±SS)	Rölatif embriyo ağırlığı (%) (Ort±SS)	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%)
I. deney	Kontrol (Bi-distile su)	10	10	100	3.27±0.26	5.73±0.30	0	0
	YGLEI (219 µg/y)	10	10	100	3.18±0.27	5.51±0.76	0	0
	YGLEII (875 µg/y)	12	12	100	3.40±0.33	5.91±0.54	0	0
	YGLEIII (1750 µg/y)	9	9	100	3.11±0.14	5.32±0.32*	0	0
II. deney	Kontrol (Bi-distile su)	7	7	100	3.27±0.37	5.44±0.38	0	0
	KGLEI (219 µg/y)	7	7	100	3.58±0.33	6.16±0.63*	0	0
	KGLEII (875 µg/y)	10	10	100	3.12±0.32	5.67±0.79	0	0
	KGLEIII (1750 µg/y)	9	9	100	3.05±0.21	5.31±0.54	0	0

\* Kontrol (Bi-distile su) grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test.  $p<0.05$ )





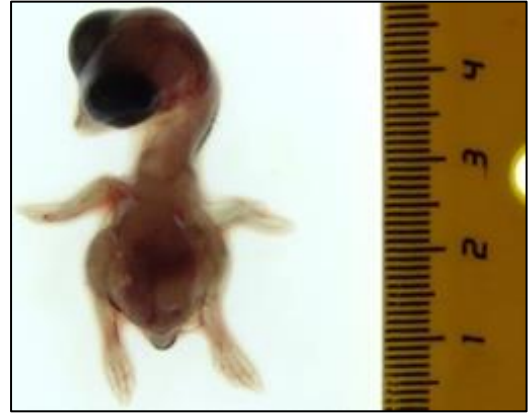
Şekil 3. Birinci deneydeki Kontrol (Bi-distile su) grubuna ait bir embriyo.



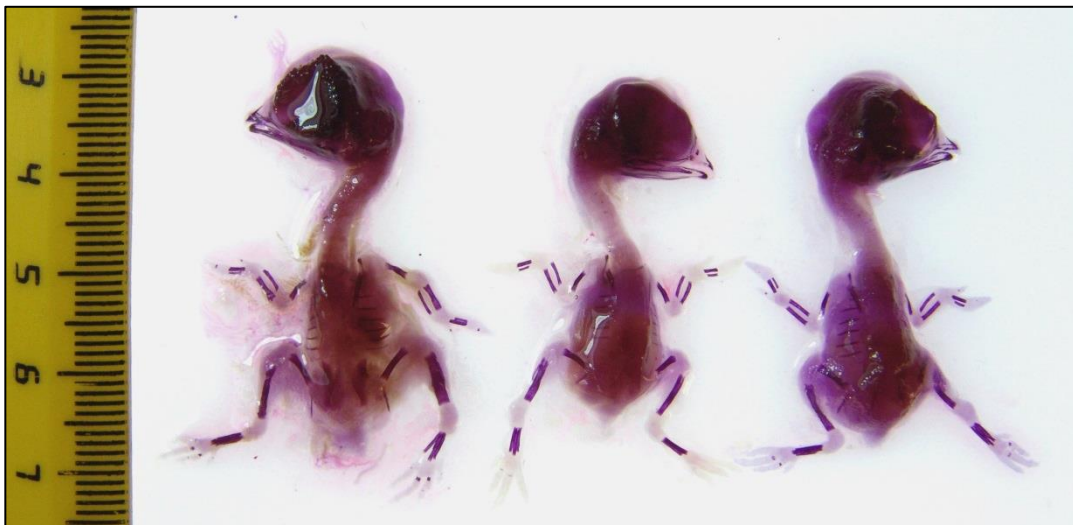
Şekil 4. Birinci deneydeki YGLEIII (1750 µg/y) grubuna ait bir embriyo.



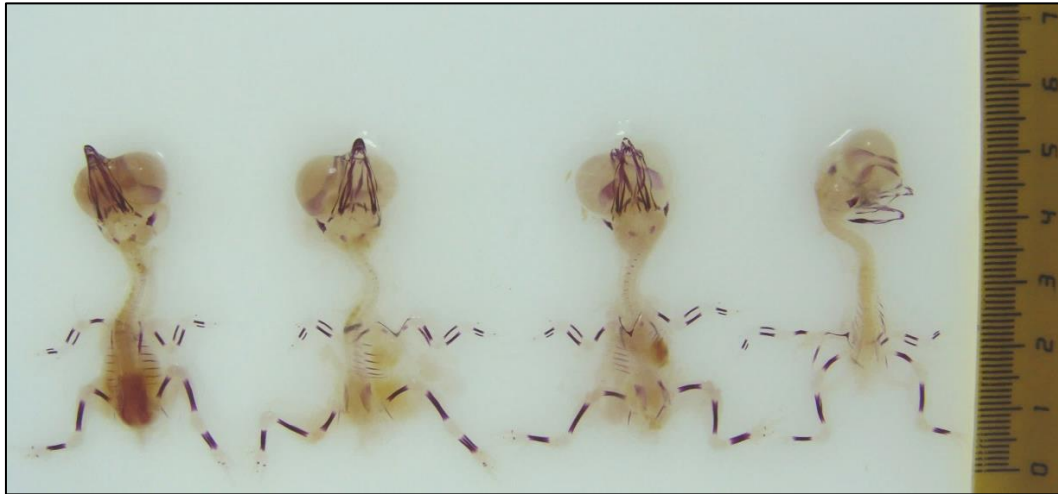
Şekil 5. İkinci deneydeki KGLEI (219 µg/y) grubuna ait bir embriyo.



Şekil 6. İkinci deneydeki KGLEII (875 µg/y) grubuna ait bir embriyo.



Şekil 7. Birinci deneyde Kontrol (Bi-distile su), YGLEI (219 µg/y) ve YGLEIII (1750 µg/y) gruplarına (soldan sağa doğru) ait kemik gelişimi normal embriyolar (Alizarin Red-S boyama).



Şekil 8. İkinci deneyde Kontrol (Bi-disile su), KGLEI (219 µg/y), KGLEII (875 µg/y) ve KGLEIII (1750 µg/y) gruplarına (soldan sağa doğru) ait kemik gelişimi normal embriyolar (Alizarin Red-S boyama).

### Tartışma

İnsanoğlu her geçen gün artan miktarlarda embriyotoksik ve teratojenik potansiyeli bilinmeyen ilaçlar, endüstri yan ürünleri ve çevre kirleticilerine ister istemez maruz kalmaktadır. Bu çeşit kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin sıçan veya fare gibi kemirgenler ya da tavşanlar üzerinde ayrıntılı olarak test edilmesi çok önemlidir. Ancak dünyadaki tüm kimyasal bileşiklerin test edilmesi mümkün değildir. Bu sebeple bir kimyasal bileşiğin memeli embriyosu üzerine olumsuz etkilerini doğru bir şekilde tahmin edebilecek, ucuz ve hızlı alternatif tarama yöntemlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Bu amaca yönelik olarak memeli ve memeli olmayan hayvan türlerinin kullanıldığı çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. Kanatlı embriyoları özellikle de tavuk embriyoları kullanılarak değişik kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği çok sayıda araştırma mevcuttur (Özparlak, 2015).

Tavuk Embriyotoksisite Tarama Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) dömlü tavuk yumurtası kullanılarak Jelinek (1977) tarafından geliştirilen ilk testlerden biridir ve CHEST-I (embriyotoksik doz sınırlarının belirlenmesi) ve CHEST-II (teratojenik parametrelerin tespiti) olmak üzere iki basamakta gerçekleştirilmektedir. Bu testin yanı sıra dömlü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET) ve Nishigori ve ark. (1992) ise Dömlü Tavuk Yumurtası Tarama Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) geliştirmişlerdir. Kanatlı embriyolarıyla yapılan son yıllardaki bir çalışmada ise dömlü tavuk yumurtalarındaki embriyoların perifer kan eritositlerinde mikronucleus (MN) oluşumu tanımlanmış ve tavuk yumurtası mikronucleus testi (Hen's Egg Test for

Micronucleus Induction, HET-MN) olarak adlandırılan yöntem geliştirilmiştir (Wolf ve Luepke, 1997).

Bahsedilen ve benzer diğer testler genel olarak ucuz ve kolay olup tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Cıvciv embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi önemli diğer avantajlarıdır. Çok sayıda cıvciv embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlamaktadır. Bu testler daha sonra memeliler üzerinde yapılacak çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısını ve deneme sayısını azaltmakta, canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara, yasal kısıtlamalara ve hayvan haklarına da aykırı düşmemektedir. Ancak tavuk embriyosu kullanılan bu testlerde plasenta ve memelilerdeki anne-fetüs ilişkisi olmaması, bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajları olarak görülmektedir. HET yöntemiyle ölüm oranının (LD<sub>50</sub>), gelişme geriliğinin (yumurtadan çıkış ağırlığı, kemik uzunlukları ve organ ağırlıkları), teratojenitenin (iskelet gelişimi anormallikleri, makroskobik ve anatomik anormallikler), sistemik etkilerin (kan kimyasal parametreleri, hematolojik parametreler ve organ histopatolojisi) ve immünopatolojik etkilerin (timus ve bursa Fabricii'nin histolojik yapıları) değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Özparlak, 2015).

Kuluçka şartlarının optimum olması kanatlı embriyolarının kullanıldığı embriyotoksisite çalışmalarında çalışmanın güvenilirliğini artırmaktadır. Kuluçka makinesinin nispi (%) neminin belirlenebilmesi için yumurtaların kabuklarındaki porlardan nemin buharlaşması sonucu kaybedilmesiyle oluşan ağırlık kaybı önemli bir ölçüttür. Kuluçka süresince günlük ortalama %0.55-0.70 aralığında ağırlık kaybı önerilmektedir



(Mauldin 1993). Bu çalışmada birinci ve ikinci deneylerdeki Kontrol gruplarında gözlenen değerler önerilen bu değerlere yakındır ve bu durum kuluçka şartlarımızın optimum şartlara yakın olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca Romanoff (1997) 11 günlük tavuk embriyolarının 3.68 g ağırlığında olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada ise birinci ve ikinci deneylerin Kontrol gruplarında embriyo ağırlıkları rapor edilen değere yakın olmakla birlikte aradaki farklılıklar yumurta büyüklüğünden veya tavuk ırklarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Tavuk embriyolarıyla yapılan çalışmalarda enjeksiyonun zamanı ve bölgesi, kullanılacak test solüsyonunun hacmi, uygulanacak doz ve bu dozlar için kullanılacak yumurtalarının sayısı, kullanılacak çözücünün cinsi ve konsantrasyonu göz önünde bulundurulması gereken önemli hususlardır (Özparlak, 2015). Tavuk yumurtalarıyla yapılan testlerde test edilecek maddenin verileceği yer hava kamarası, albümin, yumurta sarısı ve embriyonun kaudal bölgesidir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem hava kamarasına yapılan enjeksiyon yöntemidir. Uygulamasının basit olması, solüsyonun hızlı ve homojen bir şekilde diffüze olması, yumurtaların enfekte olma olasılığının düşük olması, iç basıncın artmasına bağlı olarak embriyoda oluşması muhtemel mekanik hasarların tolere edilmesi açısından hava kamarasına enjeksiyon ideal yöntem olarak göze çarpmaktadır (Prelusky ve ark., 1987; Çelik ve ark., 2000; Sur, 2001).

Enjeksiyon zamanı açısından bakıldığında ise test edilmek istenilen maddenin doğal formunun etkileri belirlenmek isteniyorsa erken dönemde enjeksiyon tercih edilmektedir. Test edilecek maddenin karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşacak metabolitlerinin etkileri belirlenmek isteniyorsa enjeksiyonun daha geç dönemde tercih edilmesi gereklidir (Jelinek ve ark., 1985; Prelusky ve ark., 1987; Özcan, 1992). Çünkü tavuk embriyosunda embriyonik dönemin 4. gününde karaciğer farklılaşması gözlenmektedir. Bu dönemden itibaren karaciğer görevlerini yerine getirmeye başlar ve detoksifikasyon olayları başlamış olur (Hamilton ve ark., 1983). HET-MN yönteminde de solüsyonların kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjekte edilmesi ve kuluçkanın 11. gününde kan örnekleri alınması genotoksisitenin belirlenmesi için optimum olarak kabul edilmiştir (Wolf ve ark., 2002). Bu çalışmada da yabancı ve kültür *G. lucidum* ekstraktlarının karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşacak metabolitlerinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir.

Enjeksiyon işleminde kullanılacak solüsyonlar için 3-100 µl/y arasında değişen hacimlerde solüsyonlar kullanılsa da (Özparlak, 2015) hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlarla ilgili olarak; döllü tavuk yumurtalarıyla yapılan bir çalışmada hava kamarasına kuluçkanın 24., 48. ve 72. saatlerinde 50 µl hacimde solüsyon verilmiştir (Wytttenbach ve Thompson, 1985). Başka bir çalışmada ise kuluçkanın hemen başlangıcında ve 12. gününde 100

µl hacim tercih edilmiştir (Varga ve ark., 2002). Diğer pek çok çalışmada ise hava kamarasına kuluçkanın 12. gününde 100 µl hacminde enjeksiyon uygulanmıştır (Varga ve ark., 1999; Varnagy, 1999; Budai ve ark., 2001; Varnagy ve ark., 2001; Budai ve ark., 2002; Fejes ve ark., 2002). HET-MN yönteminde ise hava kamarasına enjeksiyonda kuluçkanın 8. gününde hidrofilik özellikteki test maddeleri için 100 µl hacminde ve hidrofobik test maddeleri için 50 µl hacminde enjeksiyon önerilmiştir (Wolf ve ark., 2002). Bu çalışmada da kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon hacmi olarak embriyoların tolere edebileceği düşünülen 60 µl/y solüsyon hacimleri tercih edilmiştir.

Tavuk yumurtalarıyla yapılan çalışmalarda her grup için Jelinek ve ark. (1985) 6-10 yumurta kullanmışlardır. HET-MN için de her grupta en az beş-altı yumurta kullanılmıştır (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002). Bu çalışmada da her grup için 10-13 yumurta kullanılmıştır.

Toksosite testlerinde bir maddeyi test etmek için farklı dozlarının denenmesi gerekir. Brown ve ark. (1986) denemelerde en az üç farklı dozun çalışılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da her iki ekstraktın aynı üç dozu test edilmiştir. Böylece *G. lucidum*'un hem yabancı hem de kültür formunun test edilen dozlarda tavuk embriyoları üzerinde aynı etkiye sahip olduğu yani embriyotoksik ve teratojenik bir etki sergilemediği tespit edilmiştir.

Dünya'daki mantarlar içerisinde yaklaşık 30 türün ticari ve endüstriyel olarak üretimi yapılmaktadır. Doğal mantarların bazı türleri doğadan toplanıp tüketilirken bazı türleri ise kültüre alınıp tüketilmektedir. Özellikle makrofungusların geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olmaları gerçeği göz önünde bulundurularak günümüzde kullanılan ilaçlara alternatif olabilmeleri için yabancı türlerinin kültürde üretilmesi önem kazanmaktadır. Son yıllarda dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de tıbbi mantar yetiştiriciliği giderek artmaktadır ve bunların başında da *G. lucidum* gelmektedir. *G. lucidum* son yıllarda antikanserojen ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri ile insan vücudunu enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi sebebiyle son yıllarda çok popüler bir tıbbi mantar olmuştur (Üstün, 2011). Yabancı *G. lucidum*'a günlük hayatta halkın arazi şartlarında ulaşması teşhis etmesi ve temin etmesi oldukça zordur ve bu nedenle kültür *G. lucidum*'un kullanımı daha pratik görünmektedir. Kültür *G. lucidum* günlük hayatta çay, kahve, kapsül ve sıvı ekstrakt şeklinde tüketilmektedir. İnsanlar tarafından yoğun bir şekilde kullanılan *G. lucidum*'un etkileriyle ilgili pek çok literatür varken, balık embriyoları üzerine bir çalışma dışında (Dulay ve ark., 2012) olası embriyotoksik ve teratojenik etkileriyle ilgili bilgi yoktur. Bu çalışmayla ilk kez Türkiye'deki *G. lucidum*'un hem yabancı hem de kültür formlarından hazırlanan sulu ekstraktlarının test edilen dozlarda alternatif bir deney hayvanı olan tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik ve teratojenik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların bu alandaki literatür eksikliğine ışık tutması umut edilmektedir.





### Kaynaklar

- Brown L.P., Flint O.P., Orton T.C., Gibson G.G., *Chemical teratogenesis: testing methods and the role of metabolism*. Drug Metabolism Reviews 17:221-260 (1986).
- Budai P., Fejes S., Várnagy L., Somlyay I., Takács I., *Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination*. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen) 66:885-889 (2001).
- Budai P., Fejes S., Várnagy L., Szabo R. ve Keserü M., *Embryonic toxicity of a dimethoate containing insecticide formulation and Cu-sulphate in chicken after individual or combined administration*. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen) 67:99-103 (2002).
- Chang H.-M., But P.P., Yao S.-C., *Pharmacology and applications of Chinese materia medica*. World Scientific (1986).
- Çelik I., Oguz H., Demet O., Boydak M., Donmez H. Sur E., Nizamlioglu F., *Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus NRRL 2999*. British Poultry Science 41:401-409 (2000).
- Dulay R., Eguchi F., Kalaw S., Reyes R., Alfonso N., *Teratogenic and Toxic Effects of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, Ganoderma lucidum (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes), on Zebrafish Embryo as Model*. International Journal of Medicinal Mushrooms 14:507-512 (2012).
- Fejes S., Budai P., Varnagy L., Molnar T., Szabo R., Fancsi T., *Toxicity of a mancozeb containing fungicide formulation and CU-sulphate to chicken embryos after administration as single compounds or in combination*. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen) 67:105-109 (2002).
- Hamburger V., Hamilton H.L., *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. Journal of morphology 88:49-92 (1951).
- Hamilton J.W., Denison M.S., Bloom S.E., *Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo [a] pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo in ovo*. Proceedings of the National Academy of Sciences 80:3372-3376 (1983).
- Jelinek R., *The chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II)*. In: Neubert D, Merker HJ and Kwasigrooh TE (eds.) Methods in Prenatal Toxicology, Georg Thieme, Stuttgart, pp. 381-386.
- Jelinek R., Peterka M., Rychter Z., *Chick embryotoxicity screening test--130 substances tested*. Indian Journal of Experimental Biology 23:588-595 (1985).
- Jong S., Birmingham J., *Medicinal benefits of the mushroom Ganoderma*. Advances in Applied Microbiology 37:101-134. (1992).
- Kemper F., Luepke N., *Toxicity testing by the hen's egg test (HET)*. Food and Chemical Toxicology 24:647-648. (1986).
- Lee S., Park S., Oh J.-W., Yang C.-H., *Natural inhibitors for protein prenyltransferase*. Planta Medica 64:303-308 (1998).
- Liu G.T., Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of Ganoderma P. Karst. species (Aphyllophoromycetidae) in China. International Journal of Medicinal Mushrooms 1:63-67 (1999).
- Liu X., Yuan J.-P., Chung C.-K., Chen X.-J., *Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of Ganoderma lucidum*. Cancer Letters 182:155-161 (2002).
- Mauldin J.M., *Quality control procedures for the hatchery*. Poultry Science 93:1-24 (1993).
- Nishigori H., Mizumura M., Iwatsuru M., *The hen's fertile egg screening test (HEST): A comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodents of 20 drugs*. Cell Biology and Toxicology 8:255-265 (1992).
- Özcan M., *Hidrokinon'un (HK) Gelişim Toksisitesinin Döllenmiş Tavuk Embryosunda Analiz ve Değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, GÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara (1992).
- Özparlak H., *The use of chick embryos in embryotoxicity and teratogenicity tests*. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi 40:13-22 (2015).
- Prelusky D., Hamilton R., Foster B., Trenholm H., Thompson B., *Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites*. Journal-Association of Official Analytical Chemists 70:1049-1055 (1987).
- Romanoff A., *Life in Twenty-one Days*. Extension Bulletin 205 (1997).
- SPSS, *SPSS for Windows 13.0.0*. SPSS Inc., Chicago 60606, USA (2004).
- Sur E., *Yumurtaya verilen Aflatoksin, B1 (AFB1)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması*. Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya (2001).
- Tamayo Arango L.J., Suárez Avendaño P.A., Cano Valderrama A.I., Martínez C., Brayian A., Ciro Y., Sergio A., Mejía Giraldo C.A., Lenis Sanin Y.Y., *Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 25:620-624 (2012).
- Üstün O., *Makrofungusların besin değeri ve biyolojik etkileri*. Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 68:223-240 (2011).
- Varga T., Cravedi J., Fuzesi I., Varnagy L., *Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide*. Revue De Medecine Veterinaire 153:275-278 (2002).
- Varga T., Hlubik I., Várnagy L., Budai P., Molnár E., *Embryonic toxicity of insecticide Sumithion 50 EC and herbicide Fusilade S in pheasants after individual or combined administration*. Acta Veterinaria Hungarica 47:123-128 (1999).
- Varnagy L., *Degradation of some pesticides in avian embryos*. Acta Veterinaria Hungarica 47:117-122 (1999).
- Varnagy L., Budai P., Molnar E., Füzesi I., Fancsi T., *Teratogenicity testing of BI 58 EC (38% dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient*. Acta Veterinaria Hungarica 49:355-361 (2001).
- Wasson R.G., *Soma: Divine mushroom of immortality*. Harcourt Brace Jovanovich New York (1968).
- Wolf T., Luepke N.-P., *Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 394:163-175 (1997).
- Wolf T., Niehaus-Rolf C., Luepke N.-P., *Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN)*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 514:59-76 (2002).
- Wytenbach C.R., Thompson S.C., *The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: malformations detected by histological examination*. American Journal of Anatomy 174:187-202 (1985).