# *GANODERMA LUCIDUM'*UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

**Ülkü ÇAYIR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**
**BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2012**
**ANKARA**

Ülkü ÇAYIR tarafından hazırlanan *GANODERMA LUCIDUM'*UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU ...……..……
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL ……
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU …….
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü

Doç. Dr. Serkan YILMAZ ……..
Ebelik Anabilim Dalı, A.Ü

Tarih: 09/07/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU …….
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ülkü ÇAYIR

# *GANODERMA LUCIDUM'*UN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Ülkü ÇAYIR**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**Temmuz 2012**

## ÖZET

**Bu çalışmada, *Ganoderma lucidum* mantarının sulu ekstraktının tek başına genotoksik etkisi ve mitomisin-C'nin oluşturduğu hasara karşı antigenotoksik etkisi kromozomal anormallik (KA), mikronükleus (MN) ve kardeş kromatid değişim testleri (KKD) ile belirlenmiştir. Çalışmada *G. lucidum*'un 9500,00; 4750,00; 2375,00; 1187,50 ve 593,75 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. KA testinde 24 saatlik uygulamada gerek mantar ekstraktınının tek başına gerekse mitomisin C ile eşzamanlı uygulaması önemli bir genotoksik ve antigenotoksik (593,75 µg/ml hariç) etki göstermemiştir. 48 saatlik uygulamada ise mantar ekstraktının tek başına uygulandığı grupta anormal hücre frekansında ve KA/hücre sayısında önemli bir değişim gözlenmezken mantar ekstraktı ve mitomisin C'nin eş zamanlı uygulamasında bu değerler pozitif kontrole göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Mantar ekstraktının tek başına uygulandığı grupta mikronükleus frekansı negatif kontrole göre azalış gösterirken mantar ekstraktı ve mitomisin-C'nin eş zamanlı uygulandığı grupta anlamlı bir değişim yoktur. Her iki grupta da nükleer bölünme indeksinde (NBI) istatiksel olarak anlamlı bir değişim oluşmamıştır. 24 saatlik uygulamada KKD/hücre değerindeki değişim anlamlı değildir. 48 saatlik uygulamada ise KKD/hücre değerinde ekstraktın tek başına uygulandığı grupta negatif kontrole göre artış vardır. Buna karşın, mantar ekstraktı ve mitomisin-C'nin birlikte**

**uygulandığı grupta pozitif kontrole göre anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. Her iki grupta da replikasyon indeksinde (RI) değişim belirlenmemiştir. Mantar ekstraktının tek başına uygulandığı gruplarda (24 ve 48 saat) mitotik indekste (MI) anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak MMC ile eş zamanlı 24 saatlik uygulamada 593,75 ve 2375,00 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyonda (4750,00 ve 9500,00 µg/ml) MI anlamlı artış göstermiştir.**

**Bu sonuçlara göre *in vitro* insan lenfosit kültüründe *G. lucidum* genellikle sitotoksik, klastojenik ve anojenik etki göstermemiştir. Aynı zamanda MMC tarafından oluşturulan genetik hasarı düzeltici etkileri de gözlenmiştir.**

**Bilim Kodu : 203.1.048**
**Anahtar Kelimeler :*Ganoderma lucidum*, MMC, genotoksik etki, antigenotoksik etki, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN)**
**Sayfa Adedi : 87**
**Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU**

**GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF *GANODERMA LUCIDUM* AGAINST MITOMYCIN C ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES**

**(M. Sc. Thesis)**

**Ülkü ÇAYIR**

**GAZİ UNIVERSITY**
**INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**
**July 2012**

## ABSTRACT

**In this study, genotoxic effects of water extract of *Ganoderma lucidum* and antigenotoxic effects *Ganoderma lucidum* against damage induced by mitomycin C was determined with chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs) and micronucleus (MN) assays. In the study 9500,00; 4750,00; 2375,00; 1187,50 and 593,75 µg/ml concentrations of mushroom extracts were used. In CA test, neither alone nor simultaneous application with MMC did not show significant genotoxic and antigenotoxic effect during 24 h (except for 593,75 µg/ml). In 48 hours treatment, in the group which mushroom extract applied alone any change on the frequency of abnormal cells and CA/cell were not observed, however in the group which mushroom extract and mitomycin C are applied simultaneously these rates reduced compared with positive control. In the group which mushroom extract applied alone, micronucleus frequency decreased compared with negative control and there is no change in micronucleus frequency in the group which mushroom extract and mitomycin C are applied simultaneously. There is not any alteration in nuclear division index (NBI) in both groups. There is no significant change in SCE/cell in 24 hour treatment. SCE/cell rates in group which mushroom extract applied alone increased compared with negative control in 48 hour application. In contrast, SCE/cell rates in group which mushroom extract and mitomycin C are applied**

**simultaneously decreased compared with positive control in 48 hour treatment. RI didn't change in either groups. In the group which mushroom extract applied alone, the mitotic index (MI) was not effected compared with negative control (24 and 48 hour). However when mushroom extract and MMC were applied simultaneously mitotic index increased significantly at 593,75 and 2375,00 µg/ml concentrations for 24 h and at 4750,00 and 9500,00 concentrations for 48 h application.**

**According to these results *G. lucidum* generally did not show any cytotoxic, clastogenic and aneugenic effects in cultured human lymphocytes *in vitro*. Furthermore *G. lucidum* have remedial effects against genetic damage induced by MMC.**

**Science Code : 203.1.048**
**Key Words : *Ganoderma lucidum*, MMC, genotoxic effect, antigenotoxic effect, chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN)**
**Page Number: 87**
**Adviser : Assoc. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, Yüksek Lisans eğitimim zarfında bilgi, görüş ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, Yurt içi Yüksek Lisans Bursuyla beni destekleyen TÜBİTAK'a ve laboratuvardaki tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen değerli aileme çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

ÖZET ..... iv

ABSTRACT ..... vi

TEŞEKKÜR ..... viii

İÇİNDEKİLER ..... ix

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ..... xi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ ..... xii

RESİMLERİN LİSTESİ ..... xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xiv

1. GİRİŞ ..... 1

2. GENEL BİLGİLER ..... 5

2.1. Kanser ..... 5

2.2. Mantarlar ..... 6

2.2.1. *Ganoderma lucidum*'un Özellikleri ..... 8

2.2.2. *Ganoderma lucidum*'un Kanseri Önleyici Mekanizmaları ..... 13

2.3. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Testleri ..... 28

2.4. *Ganoderma lucidum* ile Yapılmış Genotoksisite ve Antigenotoksisite Testleri ..... 31

**Sayfa**

3. MATERYAL VE METOT ..... 34

3.1. Materyal ..... 34

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal ..... 34

3.1.2. Test materyali ..... 34

3.2. Metot ..... 34

3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ..... 34

3.2.2. Preparatların hazırlanması ..... 35

3.2.3. Preparatların boyanması ..... 37

3.2.4. Kromozom anormalliklerinin saptanması……37

3.2.5. Mitotik indeks, replikasyon indeksi ve nükleer bölünme Indeksinin belirlenmesi…….38

3.2.6. Kardeş kromatid değişiminin belirlenmesi……...39

3.2.7. Mikronükleus frekansının belirlenmesi……39

4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....40

4.1. Kromozomal anormallik testi sonuçları…… 40

4.2. Kardeş kromatid değişimi testi, mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI) sonuçları…….....48

4.3. Mikronükleus testi sonuçları ……..53

5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....56

KAYNAKLAR .....69

ÖZGEÇMİŞ .....87

# ÇİZELGELERİN LİSTESİ

**Çizelge** **Sayfa**

Çizelge 4.1. *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum* uygulanan (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen anormallik miktarı…….41

Çizelge 4.2. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulanan (48 saat uyulama) insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen anormallik miktarı...…….....42

Çizelge 4.3. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulamasının (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi…….49

Çizelge 4.4. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulamasının (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi……...50

Çizelge 4.5. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulanan insan periferal lenfositlerin de mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri……54

# ŞEKİLLERİN LİSTESİ

**Şekil** **Sayfa**

Şekil 2.1. Mantarların biyoaktif bileşenlerinin antikanser mekanizması……8

Şekil 2.2. *Ganoderma*'dan izole edilen β-D glukan iskeleti.....11

Şekil 2.3. *Ganoderma*'dan izole edilen lanostan tip bir triterpenoid…….12

Şekil 2.4. Klasik bir NFκB aktivasyon yol ağı modeli……...23

Şekil 2.5. *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen bileşenin NFκB ve AP-1 transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi……...26

Şekil 2.6. *Ganoderma*'nın antikanser etkileri ve kanseri önlemesi için olası mekanizmalar……..28

Şekil 4.1. *G.lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluştuduğu anormal hücre oranı……..43

Şekil 4.2. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik miktarı.....43

Şekil 4.3. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu anormal hücre oranı …...…….44

Şekil 4.4. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik miktarı……44

Şekil 4.5. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen KKD miktarı ve MI değerleri üzerine etkisi…….51

Şekil 4.6. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (48 saatlik uygulama) insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen KKD miktarı ve MI değerleri üzerine etkisi…….....52

Şekil 4.7. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu mikronükleus frekansı etkisi…….54

# RESİMLERİN LİSTESİ

**Resim** **Sayfa**

Resim 4.1.*G. lucidum* uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri ..... 45

Resim 4.2. *G. lucidum* uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimi..... 53

Resim 4.3. *G. lucidum* uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler ..... 55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| **Simgeler** | **Açıklama** |
|---|---|
| **%** | Yüzde |
| **α** | Alfa |
| **β** | Beta |
| **γ** | Gama |
| **°C** | Santigrat derece |
| **Da** | Dalton |
| **µg/ml** | Mikrogram/ Mililitre |
| **µL** | Mikrolitre |
| **$LD_{50}$** | Letal doz 50 |
| **rpm** | Devir sayısı |
| **$O2^{\bullet-}$** | Süperoksit |
| **$OH^-$** | Hidroksil |
| **UV** | Ultraviyole |

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| **BrdU** | Bromo-deoksiuridin |
| **CAs** | Chromosomal aberrations |
| **MMC** | Mitomisin C |
| **KA** | Kromozomal anormallik |
| **KKD** | Kardeş kromatid değişimi |
| **MI** | Mitotik indeks |
| **MN** | Mikronükleus |
| **NBİ** | Nükleer bölünme indeksi |
| **Rİ** | Replikasyon indeksi |
| **GLPS** | *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri |
| **ROS** | Reaktif oksijen türleri |
| **SCE** | Sister Chromatid Exchange |
| **SSC** | Sodyumsalinsitrat |
| **$NSAID_s$** | Sterodial olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar |
| **CR3** | Membran komplemen reseptör tip 3 |
| **uPA** | Ürokinaz tip plazminojen aktivatör |
| **uPAR** | Ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptörü |
| **DNA** | Deoksiribonükleik asit |
| **TGF-β** | Transforme edici büyüme faktörü β |
| **FGF** | Fibroblast büyüme faktörü |
| **AP-1** | Aktivatör protein-1 |
| **NF-κB** | Nüklear faktör kappa B |
| **GLPP** | *G. lucidum* polisakkarit peptidleri |
| **GA-Me** | Ganoderik asit Me |
| **Dox.** | Doksorubisin |
| **NK** | Doğal öldürücü hücreler |

| Kısaltmalar | Açıklamalar |
|---|---|
| **IL** | İnterlökin |
| **IFN** | İnterferon |
| **TNF** | Tümör nekroz faktör |
| **ODC** | Ornitin dekarboksilaz |
| **PMA** | Forbol miristal asetat |
| **EMS** | Etil metansülfanat |
| **B[a]P** | Benzo[a] piren |
| **iNO** | Uyarılabilir Nitrik oksit |

# 1. GİRİŞ

Günümüzde önde gelen ölüm nedenlerinden biri kanserdir. Dünya genelinde yaklaşık 11 milyon insanın kanser hastalığına yakalandığı tahmin edilmektedir. Kanser karsinogenez süreci olarak bilinen, genomda birçok mutasyonun birikmesi sonucu ortaya çıkar. Kanserin görülme sıklığı yaşla birlikte artmakta ve yaşlı nüfusun fazla olduğu toplumlarda bu problem giderek yayılmaktadır [Saunders ve Wallace, 2010].

Şimdiye kadar kanser tedavisi için büyük umudun dört esas modülde olduğu düşünülmektedir. Bunlar ameliyat, radyasyon, kemoterapi ve immünoterapidir [Gibbs, 2000]. Geleneksel kanser kemoterapisi sentetik bileşenler uygulamak yoluyla vücuttaki normal hücreleri koruyarak tümör hücrelerini öldürmeyi ya da etkisiz hale getirmeyi hedeflemektedir. Ancak genellikle bu ajanlar dar bir güvenlik sınırına sahiptirler. İlaç direnci ve doz-sınırlı toksisiteyle de sıklıkla karşılaşılmaktadır [Ratain, 1997]. Kanser terapileri sadece kanser erken basamaklarda belirlendiğinde veya belli tip tümörlerde etkili olmaktadır (örneğin bazı tip lösemilerde). Bu yüzden kanser terapileri çoğu kez ilerlemiş tümörlerde, özellikle tümörler epiteliyal hücrelerden gelişmişse (örneğin akciğer, meme, kolon, karaciğer, prostat, pankreas gibi) başarısız olmaktadır [Tamimi ve ark., 2002; Young ve Wilson 2002].

Kanser tedavileri oldukça pahalıdır. Son yıllardaki çalışmalarla göğüs ve kolorektal kanserin %40'dan daha fazlasının önlenebileceği gösterilmiştir. Bu yüzden kanserin önlenmesinde bu pahalı yöntemlere karşı alternatif tedaviler de kullanılabilir [Saunders ve Wallace, 2010]. Kemoprevasyon bir ilaç ya da kimyasal madde kullanılarak kanser hücrelerinin gelişiminin engellenmesidir. Bu yöntem kemoterapiye alternatif bir yöntem olarak kabul edilmektedir [Sporn ve Suh, 2000]. Pek çok madde kemopreventif ajan olarak kullanılmaktadır. Ancak bunların bir kaçı rutin klinik kullanımlar için uygun bulunmuştur. Kemoprevensiyon için yaygın kullanılan ilaçlar NSAIDs (steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar), tamoxifen, finasteriddir [Larrosa ve ark., 2006]. Pek çok doğal bileşen de kemopreventif ajan

olarak kullanılabilmektedir. Elajik asit, kuersetin, kurkumin doğal kemopreventif ajanlara örnek olarak verilebilir [Saunders ve Wallace, 2010].

Bitkisel ilaçların iyileştirici etkisine günümüzde büyük bir ilgi vardır. Bunların ticari satışları sürekli artarken, yapılan araştırmalar da artmaktadır. Bitkisel ilaçlar her zaman kanserin tedavisi ve önlenmesi için güvenli ve kullanışlı bir yaklaşım olarak görülmüştür [Jacobson ve ark., 2000; Wargovich ve ark., 2001; Milner, 2002]. Bitkisel ilaçlardan elde edilen pek çok aktif bileşen tümör hücreleri üzerinde direkt sitotoksik özelliğe sahip olabilmektedir. Bu bitkisel ilaçların çoğu genellikle immünostimulan olarak kullanılmaktadır [Werner ve Jolles, 1996; Zhou ve ark., 2002].

*Ganoderma* genellikle Lingzhi veya Reishi adlarıyla bilinmekte ve ölümsüzlük mantarı olarak adlandırılmaktadır. Asya'da geleneksel olarak yüzyıllardır kullanılan bu mantar Ganodermataceae familyasına aittir. *Ganoderma lucidum* tek başına ya da kemoterapi/radyoterapiyle birlikte kullanılmakta ve antikanser etkisi olduğu düşünülmektedir [Pillai ve ark., 2010]. Bu mantar farmakolojik olarak aktif bileşenlere sahiptir. *G. lucidum*'un polisakkaritleri ve triterpenoidleri onun antitümör ve/veya immünomodülatör etkilerinden sorumludur [Lin, 2002].

Çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen veriler *Ganoderma*'nın kanser önleyici ve tümör hücrelerine zarar verici özelliğinin antioksitatif ve radikal temizleyici etkisine, konakçı immün işlevini artırmasına, hücre döngüsünü durdurması ve apoptozisi indüklemesine ve diğer biyolojik etkilerine bağlanabileceğini göstermiştir [Gao ve Zhou, 2003].

Genotoksisite testleri, çeşitli kimyasalların mutajenik etkilerini incelemek için kullanılmalarının yanı sıra farklı bileşiklerin antigenotoksik etkilerini belirlemek için de kullanılmaktadır. Bu testlerden en yaygın olarak kullanılanlarından biri kromozomal anormallik (KA) testidir. Kromozomal aberasyonlar insanların

radyasyona ve genotoksik kimyasallara maruziyetinin biyolojik göstergesi olarak kabul edilmektedir. Gerek yapısal gerekse sayısal aberasyonlar insan sağlığıyla ilişkilidir. İnsanlardaki pek çok resesif hastalık (örneğin Fanconi's anemi, Bloom's sendromu gibi) kromozomların artan instabilitesi ile bağlantılıdır. İnsan periferal lenfositlerindeki spontan kromozomal aberasyonların sıklığı ile kanser arasında pozitif bir ilişkinin varlığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [Natarajan, 2002]. Yine sıklıkla kullanılan bir diğer test kardeş kromatid değişimi (KKD) testidir. Kardeş kromatid değişimi testi çoğu mutajenik bileşene karşı duyarlı bir testtir [Wojcik ve Obe, 2007]. KKD frekansı artışının biyolojik önemi mutagenez ve karsinogenez açısından değerlendirildiğinde bu artışın belirsiz ve pekte açık olmadığı söylenebilmektedir [Speit ve Henderson, 2005]. İnsan lenfositlerindeki indüklenmiş kromozomal değişimler ve de kardeş kromatid değişimi genotoksik ajanlara maruziyetin biyolojik göstergeleridir [Çelik ve Akbaş, 2005]. Son yıllarda *in vitro* mikronükleus testi (MN), genotoksisitenin ve antigenotoksisitenin belirlenmesinde cazip bir yöntem olmaya başlamıştır. Çünkü bu test anojenlerin ve klastojenlerin her ikisinin belirlenmesine izin veren, sayımı kolay olan, farklı hücre tiplerine uygulanabilen, uluslararası kabulü olan ve kanser için öngörü değeri bulunan bir testtir. MN testi eşik değerlerinin veya olası maruziyet limitinin belirlenmesine de olanak sağlayan bir testtir [Kirsch-Volders ve ark., 2011].

Dünya Kanser Araştırma Fonu tarafından yapılan araştırmalarla kanserin önlenmesinde beslenmenin önemi ortaya konmuştur. Bazı besinlerin kemoprevensiyon sağlayıcı ve kansere karşı terapötik etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Besin takviyelerinin antikanser etkileri onların kanser hastaları arasındaki popüleritesini önemli ölçüde artırmaktadır. *G. lucidum* 2000 yıldan daha fazla süredir geleneksel Çin tıbbında pek çok hastalığın ve kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda *G. lucidum*'un meyvelerinden ve sporlarından elde edilen kapsül ve ekstrakt şeklindeki besin takviyelerinden yararlanılmaktadır [Jiang ve ark., 2004a].

Çalışmamızda insan periferal lenfositlerinde *Ganoderma lucidum* mantarının sulu ekstraktının kromozomal anormallik testi, kardeş kromatid testi ve mikronükleus testi kullanılarak genotoksik ve mitomisin-C'ye karşı antigenotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Kanser

Kanser dünya genelinde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir [Patel ve Goyal, 2012]. Kanser tüm yaştaki insanları etkiler ve her üç insandan biri, yaşamının bir döneminde kanser tanısı konusunda deneyim yaşamaktadır. Kanserler arasında en öldürücü olanı akciğer kanseridir, bunu meme, prostat ve kolon kanserleri takip etmektedir. Klinik olarak kanser köken aldıkları hücre tiplerine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki kompleks hastalıkları kapsayan bir olgu olarak tanımlanır. Kanserler başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedir. Ancak bütün kanserler onları tek bir birim aile içerisine birleştiren, moleküler seviyede ortak, karakteristik özellikler (metastaz, anormal hücre bölünmesi ve büyümesi gibi) gösterirler [Klug ve ark., 2006].

Oldukça kompleks olan çok sayıda farklı sinyal yolağı kanserin gelişimiyle ilişkilidir. NF-κB, Wnt, hormon reseptör sinyal yolağları kanserle ilişkili olan yol ağlarına örnek olarak verilebilir. Kanser gelişiminin en karakteristik özelliklerinden biri normal olarak yalnızca gelişim sırasında aktif olan molekül ve sinyal yol ağlarının ifade olunmasıdır [Saunders ve Wallace, 2010].

Kanser, genetik hasarın birikimiyle ilişkili olan genetik bir hastalıktır. Solid tümörlerin çoğu kromozomlarda meydana gelen ciddi hasarlara sahiptirler. Kromozomlarda meydana gelen bu hasarlar hem kötü huylu hem de iyi huylu lezyonlarda görülmektedir. Bu genetik instabilite birikimi karsinogenez sürecinin erken basamağını oluşturmaktadır. Çok hücreli organizmalarda hücresel süreçlerin kompleks etkileşimi genetik stabilitenin korunmasıyla (hücresel homeostazi tarafından), genlerle getirilen kalıtımın kararlılığıyla karakterize edilmektedir. Ancak hücresel genom sürekli endojen ve ekzojen ajanlara maruz kalmaktadır. Bu ajanlar

ise genlerde doz ve ekspresyon farklılıklarına yol açan kromozom hasarlarına yol açmaktadır. Onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve diğer genlerde mutant fenotiplerin oluşumuna yol açmaktadır. Pek çok tümör baskılayıcı genlerde kalıtsal mutasyonlarla karakterize edilen Fanconi anemisi, Bloom's sendromu, Werner's sendromu gibi pek çok sendrom kromozomal instabilite ve kansere yatkınlıkla ilişkilidir. Epidemiyolojik çalışmalar kanser hastalarının birinci derece akrabalarının kansere yakalanma riskinin diğerlerine göre 2-4 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur [Bonassi ve ark., 2011].

Kanser tedavisinde kemoterapide kullanılan antitümöral ajanlardan biri de Mitomisin-C'dir. Bir çok antikanser ilacı, *in vitro* ve *in vivo* test sistemlerinde mutajenik, teratojenik ve karsinojenik bulunmuştur. Sekonder tümörlerin oluşumuyla ilişkili oldukları bilinmektedir [Sorsa ve ark., 1985; IARC, 1987; Kocaman ve ark., 2012]. Turkez ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmayla Mitomisin-C'nin oksidatif stresi ve 8-OH-dG seviyesini artırdığı tespit edilmiştir [Turkez ve ark., 2012]. Ortega-Gutierrez ve arkadaşları ise Mitomisin-C'nin metabolize edildiğinde serbest radikal oluşumuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır [Ortega-Gutierrez ve ark., 2009]. Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da farelerde kan ve karaciğer örneklerinde Mitomisin-C maruziyetinden sonra antioksidan aktiviteye sahip süperoksit dismutaz ve gulutatyon peroksidaz seviyyelerinin arttığı ortaya konulmuştur [Li ve ark., 2009].

## 2.2. Mantarlar

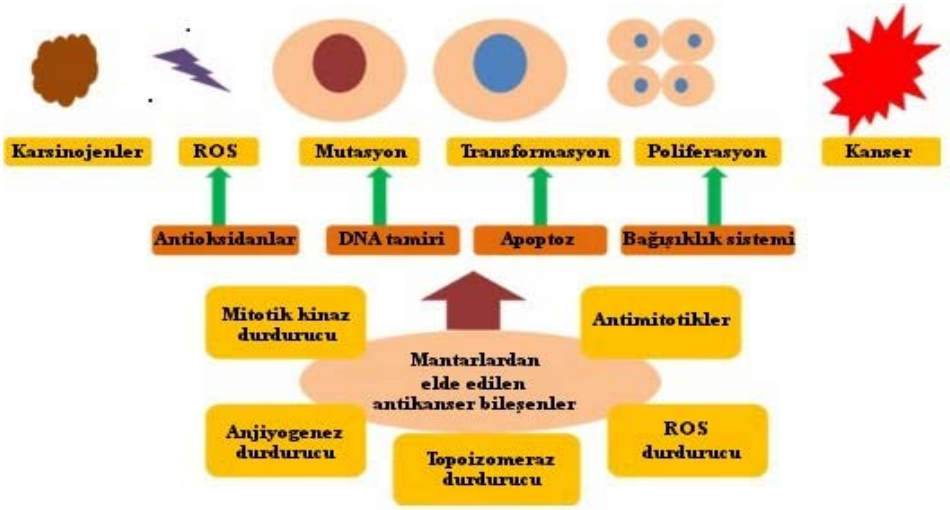
Mantarlar besinsel değerleri ve tıbbi yararları bakımından yüzyıllardır insanoğlu tarafından kullanılmaktadır. Dünya genelinde çok fazla sayıda ve çeşitte mantar ve fungus bulunmaktadır [Wasser, 2011]. Dünya üzerindeki fungus sayısının 500 bin ile 10 milyon tür arasında olduğu tahmin edilmektedir. Ancak günümüzde tanımlanmış 100 000 fungus türü bulunmaktadır (bu sayının içerisinde cıvık mantarlar, mayalar, liken formundaki mantarlar vs. de bulunmaktadır) [Kirk ve ak., 2008; Wasser 2011].

Mantarlar yaklaşık 10 000 türden oluşmakta ve bunların 2000 tanesi insanlar için güvenilir sayılmaktadır. Yaklaşık 300 mantar türünün de tıbbi özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir [Joseph ve ark., 2009].

Mantarların antitümör, immünomodülatör, antioksidan, radikal temizleyici, antihiperkolesterolemik, antiviral, antibakteriyal, detoksifikasyonu sağlayıcı, antidiyabetik, karaciğer koruyucu etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [Dai ve ark., 2009; Ichinohe ve ark., 2010; Wasser, 2010].

Polisakkaritler, proteinler, yağlar, glikozitler, alkaloitler, uçucu yağlar, tokoferoller, fenolikler, flavanoidler, karotenoidler, folik asit ve organik asitler mantarların biyoaktif bileşenleridir. Polisakkaritler mantarların immünomodülatör ve antikanser etkilere sahip en iyi bilinen bileşenleridir [Patel ve Goyal, 2012]. Çoğu yüksek Basidiomycetes mantarı biyolojik olarak aktif polisakkaritleri meyvelerinde ve kültüre edilmiş miyeselyumlarında ihtiva etmektedirler [Wasser, 2011]. Mantarlardan elde edilen polisakkaritler onkogenezi önlemekte, çeşitli sinerjik tümörlere karşı direkt antitümör aktivite göstermekte ve tümör metastazını engellemektedir. Bu etkileri özellikle kemoterapi ile birlikte kullanıldığı zaman faydalı olmaktadır. Bu polisakkaritler, sitotoksik makrofajları, monositleri, nötrofilleri, doğal öldürücü hücreleri, dendritik hücreleri ve kimyasal habercileri (sitokinler örneğin interferonlar, interlökinler gibi) aktive ederler. Mantar polisakkaritleri multisitokin indükleyicisi olarak kabul edilirler. Bunlar çeşitli immünomodülatör sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin gen ekspresyonunu indükleyebilirler [Sullivan ve ark., 2006; Radic ve ark., 2010]. Mantarlardan elde edilen terapötik özelliği olan diğer bileşenler lektinler, laktonlar, triterpenoidler, alkaloidler, antibiyotikler gibi ikincil metabolitlerdir. Bu bileşenlerde organizmanın immün fonksiyonları için önemlidir. Tıbbi özellikleri olan mantarlar bir dizi enzimleri de yapılarında bulundurabilirler. Bu enzimlere süperoksit dismutaz, glukoz oksitaz, peroksitaz, lakkaz örnek olarak verilebilir. Enzim terapisi ise kanserin tedavisinde oksitatif stresi önleyerek ve hücre gelişmesini engelleyerek önemli bir rol

oynamaktadır [Zaidman ve ark 2005; Wasser, 2011]. Mantarlardan elde edilen biyolojik olarak aktif bileşenlerin immün sistemi aktive etmeleri yanında özel transdüksiyon yollarını düzenleme yoluyla spesifik hücresel cevapları da modüle ettiği bildirilmiştir. Pek çok mantar türünün farklı hücreler arası yol ağı düzenleyici özelliğe sahip metabolitler ürettiği bildirilmiştir. Bu metabolitler kanserin tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır [Petrova ve ark., 2009; Dotan ve ark., 2010; Mahajna ve ark., 2010]. Mantarlardan elde edilen bileşenlerin çeşitli biyolojik etkileri şekil 2.1'de gösterilmiştir [Patel ve Goyal; 2012].




Şekil 2.1. Mantarların biyoaktif bileşenlerinin antikanser mekanizması [Patel ve Goyal, 2012]

### 2.2.1. *Ganoderma lucidum*'un Özellikleri

*G. lucidum*, Hymenomycetes sınıfının, Polyporales takımının Ganodermataceae familyasının *Ganoderma* cinsine ait bir mantar türüdür. Bu mantar Çin'de Lingzhi, Japonya'da ise Reishi ya da Mannentake isimleriyle bilinmektedir [Mahajna ve ark., 2008; Camargo ve Kaneno, 2011]. *Ganoderma* yüzyıllardır hipertansiyon, sinir zayıflığı, karaciğer hastalıkları ve kanser gibi pek çok hastalığın tedavisinde

kullanılmaktadır. Ayrıca bu mantarın geleneksel Çin tıbbında sağlığı koruyucu ve ömrü uzatıcı özelliğinden yararlanılmaktadır [Xie ve ark., 2006; Paterson, 2006; Weng ve Yen, 2010]. *Ganoderma* cinsi dünya genelinde 250'den fazla türü kapsamaktadır. Bu türlere *G. adspersum*, *G. applanatum*, *G. australe*, *G. tsugae* ve *G. lucidum* örnek olarak verilebilir. Ancak literatürlerde çoğunlukla kastedilen tür *G. lucidum*'dur [Moncalvo, 2000; Wasser ve ak., 2006; Mahajna ve ark., 2008].

Yıllık bir mantar olan *G. lucidum* ölmüş ve cansız ağaçların üzerinde yetişmektedir, özellikle yaprak döken bu ağaçlara meşe akağaç, söğüt, sığla, akasya örnek olarak verilebilir. *G. lucidum* daha az sıklıkla Asya'da, Avrupa'da, Kuzey ve Güney Amerika'da kozalaklı ağaçların (Larix, Pinus gibi) üzerinde yetişir [Wasser, 2005]. Geleneksel Çin tıbbına göre, farklı *Ganoderma lucidum* tipleri ayrı tatlara sahiptir (tatlı, acı, ekşi, tuzlu) ve bunlar renklerine göre (mavi, kırmızı, sarı, beyaz, siyah ve pembe) altı farklı tipe ayrılmıştır. Bu mantarlar farklı organlar üzerinde etki göstermekte ve farklı kullanımlara sahiptir [Hsu ve ark., 1985; Wasser, 2005; Joseph ve ark., 2009].

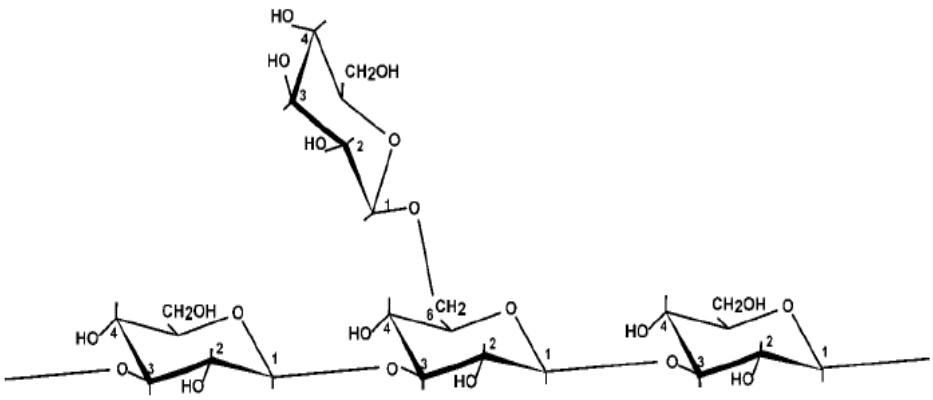
*Ganoderma lucidum*'un çeşitli bileşenleri antiviral, sitoksik, antimikrobiyal, antineoplastik etkilere sahiptirler [Zjawiony, 2004; Weng ve Yen; 2010]. Son yıllarda *G. lucidum* üzerine yapılan çalışmalar mantarın triterpenler, polisakkaritler, nükleozidler, steroidler, yağ asitleri, alkaloidler, proteinler, peptidler, aminoasitler ve inorganik elementler gibi birçok biyoaktif bileşeni yapısında bulundurduğunu ortaya koymuştur [Chen ve ark., 2007; Weng ve Yen; 2010]. Bu mantarın antikanser ve anti metastatik etkilerinin mantarın yapısındaki bu çeşitli bileşenler tarafından özellikle polisakkaritler ve triterpenlerle sağlandığına inanılmaktadır [Gao ve ark., 2004; Sliva, 2006]. Suni olarak yetiştirilen *Ganoderma lucidum* ile yabani tip *Ganoderma lucidum*'un besinsel bileşenleri açısından herhangi bir farkı yoktur. Ekstraksiyon ise ham protein ve karbohidratların miktarında artmaya sebebiyet verirken ham lif miktarında da azalmaya neden olmaktadır [Wasser, 2005]. Mizuno ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış oldukları çalışmada *Ganoderma lucidum* ekstraktının (kuru

ağırlığının yüzdesi), folin-pozitif materiyalden (% 68,9), glukozdan (% 11,1), proteinden (%7,3) ve metallerden (% 10,2) oluştuğunu bildirilmiştir. Yapısında bulunan başlıca metaller K, Mg, Ca ve Ge'dur [Mizuno, 1995].

*Ganoderma lucidum*'un polisakkaritleri (özellikle glukanlar ve glikoproteinler) ve lanostan tip triterpenleri (ganoderik asitler, ganoderik alkoller ve onların türevleri) biyolojik olarak aktif bileşenlerinin iki ana grubunu oluşturur. Son yirmi yıl boyunca *G. lucidum*'un meyvelerinden, sporlarından ve miyeselyumundan 200'den fazla polisakkarit ve 130'dan fazla triterpenoid izole edilmiştir [Zhou ve ark., 2007; Harhajı Trajković ve ark., 2009]. Polisakkaritlerin ve triterpenlerin birbirinden farklı yollarla antikanser etkisi gösterdiği tahmin edilmektedir. Triterpenler kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılması üzerine direkt durdurucu etkiye sahipken, polisakkaritler immün cevabı düzenleyerek antikanser etki göstermektedir [Sliva, 2006]. *G. lucidum*'un miselyum, spor ve meyvelerinden farmakolojik olarak aktif birçok bileşen elde edilmesine rağmen bu mantarın antikanser ve antimetastatik özellikleri yapısındaki polisakkaritlere ve triterpenlere bağlanmaktadır. Bu mantardan elde edilen polisakkaritler ve polisakkaropeptidlerin immünnostimulant aktiviteleri sonucu antikanser ve antimetastatik etki gösterdiği yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Pek çok triterpenoid bileşenin de (ganoderik asitler, ganolusidik asitler, lusidenik asitler gibi) bazı terapötik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [Weng ve Yen, 2010].

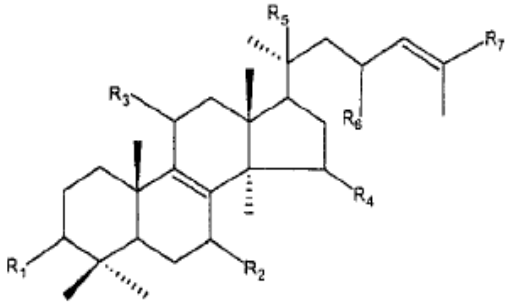
*Ganoderma lucidum*'un polisakkasitleri onun farmakolojik olarak aktif bileşenlerinin esas kaynaklarından biridir [Gao ve ark., 2004; Pillai ve ark., 2010]. Bunların çoğunun moleküler ağırlıkları temel yapıda $4\times10^5$ ile $1\times10^6$ Da arasındadır [Wasser, 2005]. *Ganoderma*'nın polisakkaritlerinin suda çözünürlüğü molekül ağırlıklarına ve suyun sıcaklığına bağlıdır. Düşük molekül ağırlıklı polisakkaritler yüksek çözünürlüğe sahiptir ve sıcak su da ekstraktsiyon etkisini artırabilir [Liu ve ark.,1989; Willard, 1990; Gao ve Zhou, 2003]. İzole edilen ve tanımlanan β-D glukanlar, heteropolisakkaritler ve glikoproteinler gibi polisakkaritlerin *Ganoderma*

*lucidum*'un bioaktivite özelliğine önemli ölçüde katkı sağlayan bileşikler olduğu düşünülmektedir. *Ganoderma lucidum'*dan izole edilen β-D glukanlar çeşitli seviyede C6 pozisyonundan dallanma gösteren düz zincir şeklindeki β-(1→3)'e bağlı D-glukopiranosil gruplarından oluşmaktadır (Şekil 2.2) [Cheong ve ark., 1999; Gao ve ark., 2002; Gao ve Zhou, 2003; Wasser, 2005]. β-D glukanların biyolojik aktiviteleri, suda çözünebilirliklerinden, moleküler boyutlarından, dallanma oranları ve şekillerinden, ana β-(1→3) zincirindeki β-(1-6) bağlanma sisteminden etkilenmektedir [Wasser ve Weis, 1999; Bao ve ark., 2001a, Gao ve Zhou 2003]. Antitümör aktiviteye sahip β-D glukanlar diğer polisakkaritlere oranla yüksek moleküler ağırlığa, daha düşük seviyede dallanmaya ve suda daha fazla çözünürlüğe sahiptir [Wu ve ark., 2001; Weng ve Yen, 2010]. *Ganoderma'*dan elde edilen β-D glukanlar makrofaj gibi immün efektör hücrelerde bulunan CR3'lere (membran komplemen reseptör tip 3) bağlanarak biyolojik cevabı uyarırlar [Battle ve ark., 1998; Mueller ve ark., 2000; Sliva, 2003]. İzole edilen bazı protein bağlı polisakkaritler ve fukoz taşıyan glikoproteinler de biyoaktivite özelliği göstermektedir [Ooi ve Lui, 2000; Wang ve ark., 2002; Gao ve ark., 2004].




Şekil2.2.*Ganoderma*'dan elde edilen β→D glukan iskeleti [Gao ve Zhou, 2003]

*Ganoderma lucidum*'un triterpenoidleri yüksek derecede okside lanostan tip triterpenoidlerdir. Bunlara ganoderik asit, lucidenik asitler, ganodermik asitler, ganoderenik asitler, lucidon, ganoderal, ganoderoller örnek verilebilir (Şekil 2.3) [Kim ve Kim, 1999; Ma ve ark., 2002]. Bu triterpenoidler bir lanostan iskeletinden oluşmuştur ve karbon numaraları, oksidasyon derecelerine göre 10 grupta sınıflandırılırlar (Şekil 2.3) [Komoda ve ark., 1985; Kim ve Kim 1999]. *Ganoderma'*dan izole edilen pek çok triterpenoid antitümör, immünomodülatör, karaciğeri koruyucu, antioksitatif gibi biyoaktif özellikler göstermektedirler [Gao ve Zhou, 2003]. Chen ve Zhong'un yaptığı bir çalışmada lanostan tip bir triterpenoid olan ganoderik asit T'nin insan kolon karsinoma hücre hattı HCT-116'nın yayılışını önlediği bildirilmiştir [Chen ve Zhong, 2011]. Ayrıca ganoderik asit -R, -T, -U, -V, -W, -X, -Y, -Z, lucidimol-A, -B, ganodermanandiol, ganoderiol F ve ganodermanontriolun de kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Min ve ark., 2000; Sliva, 2003; Wen ve Yen, 2010].




Şekil 2.3 *Ganoderma*'dan izole edilen lanostan tip bir triterpenoid [Wasser, 2005]

*Ganoderma*'dan izole edilen bazı proteinler biyoaktivite özelliğine sahiptir [Lin ve ark., 1997; Pan ve ark., 1997]. Biyolojik cevap düzenleyici protein Ling-Zhi-8 *G. lucidum*'un miselyumundan izole edilmiştir [Lin ve ark., 2009]. Sağlığı düzeltici pekçok özelliğe sahip olduğu gösterilmiş, T-hücreleri ve sitokin üretimini artırmıştır [Kino ve ark., 1989; Tanaka ve ark., 1989]. Bu protein *in vitro* koşullarda mitojenik

aktivite gösterirken *in vivo* koşullarda immünomodülatör etki göstermekte, böylece immün cevabı düzenlemekte ve anafilaksiyi önlemektedir [Kino ve ark., 1989].

*Ganoderma lucidum* sterolleri, aminoasitleri, çözünebilir proteinleri, oleik asiti, siklo-oktasülfürü, adenozini de içerir. Mantar ayrıca inorganik iyonlardan Mg, Ca, Zn, Mn, Fe, Cu ve Ge'u da yapısında barındırır [Wasser, 2005].

### 2.2.2. *Ganoderma* lucidum'un Kanseri Önleyici Mekanizmaları

*G. lucidum*'un antikanser etkisinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. *G. lucidum*'un kanseri önlemesi ve/veya tedavi etmesinin tek mekanizması konakçının immün cevabının aktive edilmesi olarak düşünülmekteydi. Ancak aynı zamanda hücre farklılaşmasının uyarılması, faz-II metabolizma enzimlerinin uyarılması, anjiyogenezin engellenmesi, kanser hücrelerindeki ürokinaz tip plazminojen aktivatör (uPA) ve uPA reseptörünün ekspresyonunun engellenmesi gibi mekanizmalar da *G. lucidum*'un antikanser mekanizmaları arasında sayılabilir [Liu ve Zhang, 2005]. Bu mekanizmaları şöyle sıralayabiliriz:

1. Antioksidan ve radikal süpürücü etki

Reaktif oksijen türleri (süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit) normal metabolik süreçler sonucunda ya da dış kaynaklı faktör ve ajanlar tarafından oluşturulabilir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) normalin üzerinde üretimi astım, eklem iltahabı, kalp ve damar hastalıkları ve kanser gibi pekçok hastalıkla bağlantılıdır. Aşırı derecede ROS birikimi DNA, proteinler ve diğer makromoleküllerin oksitatif hasarıyla sonuçlanabilir [Lee ve Lee, 2006; Xu ve ark., 2009]. Kritik biyomoleküllerin ROS bağımlı hasarlardan çeşitli doğal ve/veya sentetik bileşenlerce korunması kanserin önlenmesine pratik ve ümit verici bir yaklaşım olarak düşünülmektedir [Tamimi ve ark., 2002]. Bitkilerden elde edilen doğal antioksidanların, aktif oksijen ve serbest radikaller tarafından oluşturulan

oksitatif hasarı, hastalık oluşumunu, kanseri ve yaşlanmayı önlediği bildirilmiştir [Gao ve Zhou, 2003].

Bazı yenilebilen mantarların (örneğin *Ganoderma lucidum*) biyolojik olarak aktif olan bileşenlerinin ROS'a bağlı hasarlardan hücrenin önemli makromoleküllerini koruyabildiği saptanmıştır [Gao ve Zhou, 2003]. *Ganoderma*'dan elde edilen aktif bileşenlerin antioksitatif ve radikal süpürücü etkisi olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [Lee ve ark., 2001; Shieh ve ark., 2001; Shi ve ark., 2002]. Bu etkiler ise *Ganoderma*'nın kanseri önleyici, karaciğer koruyucu ve kemopreventif özelliği ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir [Gao ve Zhou, 2003; Liu ve ark., 2010].

Shi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *G. lucidum*'un da içinde bulunduğu sekiz mantarın sporlarının sulu ekstraktları çalışılmıştır. Bu çalışmada Comet testi kullanılmış ve hücresel DNA hidrojen peroksit tarafından oksitatif hasara uğratılmıştır. *G.lucidum* ve *A. bisporus*'un (Bu mantarlardan *A. bisporus*'un soğuk su ve *G. lucidum*'un sıcak su ekstratları 0.5mg $ml^{-1}$ konsantrasyonda) en yüksek genoprotektif etkiye sahip oldukları bulunmuştur. *F. velutipes*, *A. auricula, H. marmerous, L. edodes, P. sajor-caju, V. volvacea* mantarlarının ise koruyucu etkisi bulunmamıştır [Shi ve ark., 2002]. Chen ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise *G. lucidum* polisakkaritlerinin $DPPH^-$, $O^-$, $OH^-$ karşı serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Süperoksit için en fazla antioksidan etki 2,2 mg/ml'lik konsantrasyonda % 80,4 olarak tespit edilmiştir. Hidroksil radikali için artan konsantrasyonla birlikte radikal süpürücü etkinin de arttığı tespit edilmiştir. *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri DPPH'ye karşı doza bağlı bir etki göstermektedir. DPPH radikaline karşı gösterdiği etki iyi bir antiosidan olduğu bilinen vitamin C ile kıyaslandığında düşük konsantrasyonlarda (0,2 ve 1,8 mg/ml) vitamin C'den daha az bir antioksidan etkiye sahipken, yüksek konsantrasyonlarda (2-2,6 mg/ml) vitamin C'den daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu da göstermektedir ki *G. lucidum* polisakkaritleri DPPH için iyi bir süpürücü etkiye sahiptir [Chen ve ark., 2009].

2. Faz II metabolizma enzimlerinin uyarılması

Faz II enzimleri (glutatyon transferaz, NAD(p)H:kinon redüktaz, UDP-glucuronasyl transferaz) karsinojenlerin ve toksik elektrofilik bileşenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Bu enzimler karsinojenleri inaktive edebilmekte ve onların vücuttan daha kolay bir şekilde atılımını sağlayabilmektedir [Casson ve ark., 2003; Liu ve ark., 2007]. Faz II detoksifikasyon enzimlerinin kimyasal karsinogenez için başlangıcı düzenleyebileceğini ve karsinojen maruziyetine karşı hücre direncini artırabileceğini gösteren birçok bulgu vardır. Bu yüzden metabolik aktivasyonun inhibisyonu ve detoksifikasyon yolunun geliştirilmesi pek çok doğal bileşenin koruyucu etkisi için olası bir mekanizma olarak düşünülmektedir [Gao ve Zhou, 2003]. *G. lucidum*'dan izole edilen polisakkaritler ve triterpenoidler faz II metabolizma enzimlerini indükleme özelliğine sahiptirler. *G. lucidum* polisakkaritlerinin önemli bir faz II enzimi olan glutatyon S transferazın aktivitesini uyarabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Kim ve ark., 1999]. *G. lucidum*'dan elde edilen iki yeni lanostanoid (birinci bileşen 26, 27-dihidroksi-5α-lanosta-7, 9(11), 24-triene-3, 22-dione, ikinci bileşen 26-hidroksi-5α-lanosta-7, 9(11), 24-triene-3, 22 dione) NAD(p)H:quinone oksireduktazın (QR) özel aktivitesini artırırlar. Bu lanostanoidlerden biri QR'nin aktivasyonunu 3.0 μg/mL konsantrasyonda iki katına çıkarırken, diğer lanostanoid 20 μg/L'de 1.7 kat indükleme yaparak daha az bir aktiviteye sahiptir [Ha ve ark., 2000]. Bu çalışma *G. lucidum*'un bazı karsinojenler için detoksifikasyon metabolik yolunu kolaylaştırabileceğini ayrıca triterpenoidlerinin faz II enzimlerini uyarabileceğini de göstermektedir [Liu ve ark., 2007]. Bu mantar konakçı için immünomodülatör etkilerine ek olarak detoksifikasyon avantajlarına da sahiptir. Bu da *G. lucidum*'un kanserin önlenmesi ve tedavisinde destekleyici bir ilaç olarak kullanılmasına önemli bir temel teşkil etmektedir [Liu ve Zhang, 2005].

3. Direkt sitotoksisite

*Ganoderma lucidum*'un meyvelerinden ve sporlarından elde edilen bir çok triterpenoidin tümör hücrelerine karşı sitotoksik olduğu *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir [Zhu ve ark., 2000; Wu ve ark., 2001; Gao ve ark., 2002]. Bu mantarın sporlarından elde edilen alkolik ekstraktlar da tümör hücrelerine karşı sitotoksiktir [Zhu ve ark., 2000]. Kurutulmuş meyvelerinden elde edilen triterpenoidler (lucidenik asit N, lucidenik asit A, ganoderik asit E gibi) Hep G2 ve P-388 tümör hücrelerine karşı önemli derecede sitotoksisite göstermiştir [Wu ve ark., 2001]. *G. lucidum*' un yüksek derecede oksijenlenmiş birkaç lanostane tip triterpenleri (ganoderik asid γ, ganoderik asid ε, ganoderik asit φ) *in vitro* koşullarda Meth-A ve LLC tümör hücrelerine karşı sitotoksik özelliğe sahiptir [Min ve ark., 2000]. Ayrıca bu mantardan ele edilen ganoderik asit U, V, W, X ve Y'nin de hepatom üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur [Toth ve ark., 1983; Sliva, 2003].

GLPS'nin (*G. lucidum* polisakkaritleri) *in vitro* koşullarda tümör hücrelerini direkt öldürücü etkiye sahip olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Lin, 2002]. *G. lucidum*'un triterpenoidleri ise *in vitro* koşullarda tümör hücrelerine karşı direkt sitotoksik özelliğe sahiptir. Bu yüzden *G. lucidum*'un *in vitro* şartlarda antikanser etkisinin triterpenoidlerinin direkt sitotoksisitesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir [Liu ve Zhang, 2005].

4. Kanser hücrelerinde uPA ve uPAR ekpresyonunun durdurulması

Ürokinaz-tip plazminojen aktivatör (uPA) ve uPA reseptörü (uPAR) kanserin metastazında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bir serin proteaz olan uPA ekstraselular matrikse yapışmaktadır. Bu molekül hücre adhezyonu ve hücre göçü ile ilgili bir moleküldür. Birçok farklı tümörde uPA ve uPA reseptörü normalden fazla ifade edilirler [Mazar, 2001; Sliva ark., 2002]. uPA, transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ve fibroblast büyüme faktörünü (FGF) aktive ederek doğrudan

proteolitik aktivitesiyle hücre göçünü uyarabilir. uPA eksik proteolitik aktivitede ise hücre göçü uPA'nın uPAR ile direkt etkileşime geçmesi yoluyla uyarılır [Odekon ve ark., 1992; Sliva ve ark., 2002]. uPA ve uPAR'nin ekspresyonu transkripsiyon faktörleri AP-1 ve NF-κB tarafından kontrol edilir [Sliva ve ark., 2002]. Kanser hücrelerinin yüzeyindeki uPA reseptörüne bağlı uPA, metastaz ve kanser hücrelerinin yayılmasından sorumludur. Bu yüzden uPA aktivitesinin durdurulması ve uPA ile uPAR'nin ekspresyonunun durdurulması tümörün yayılmasını önemli ölçüde azaltır [Mazar, 2001; Sliva ve ark., 2002].

Sliva ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış olduğu bir çalışmada *G. lucidum*'un kuru meyve ve sporlarının suda kaynatılarak elde edilen çayları (0.5-2.5 mg/ml), yüksek yayılma özelliğine sahip göğüs kanser hücre hattı MDA-MB-231 ve yüksek yayılma özelliğine sahip diğer bir hücre hattı olan prostat kanser hücre hattı PC-3'ün migrasyonunu önlediği bulunmuştur [Sliva ve ark., 2002]. *G. lucidum*'un antikanser aktivitesi transkripsiyon faktörleri AP-1 ve NF-κB'nin inhibe edilmesiyle sağlanıyor olabilir. Bu da uPA ve uPAR'nün ekspresyonunun baskılanmasıyla ve uPA'nın salınımının baskılanmasıyla sonuçlanır. Böylece göğüs ve prostat kanseri gibi yüksek derecede yayılma özelliği gösteren kanser hücrelerinin motilitesi durdurulur [Sliva ve ark; 2002; Sliva, 2003; Petrova ve ark., 2008]. Yapılan çalışmalar *G. lucidum*'un kemoterapi ve radyoterapi boyunca tamamlayıcı bir madde olarak kullanıldığı zaman kanserin metastazını azaltıcı bir özelliğe sahip olduğunu göstermektedir [Liu ve Zhang, 2005].

5. Antianjiyogenez

Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşumunu içeren fizyolojik bir süreçtir. Anjiyogenez büyüme, gelişme ve yaraların iyileşmesi için normal bir süreç olmasının yanında tümörün dormant (uyku) halinden malignant hale dönüşmesinde de esas bir basamak teşkil etmektedir. Tümörler kılcal kan damarlarının oluşumunu sağlayan çeşitli büyüme faktörlerinin (VEGF, bFGF gibi) salgılanması yoluyla anjiyogenezi

uyarmaktadırlar. Bu damarlar tümör hücrelerinin ihtiyaç duyduğu besin ve oksijenini sağlarken artık ürünleri de ortamdan uzaklaştırmaktadırlar [Carmaliet, 2005; Mahajna ve ark., 2008].

Birçok bulgu kanserin önlenmesi ve antikanser tedavisinde anjiogenezin önlenmesinin etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir [Kerb, 2000; Liu ve ark., 2002; Tosetti ve ark., 2002]. Antianjiyogenez *Ganoderma*'nın olası kanseri önleyici mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir. Çünkü doğal kaynaklardan elde edilen kanseri önleyici birçok ajan antianjiyogenik özellikleriyle tümör hücrelerinin metastazını azaltmışlardır [Demeule ve ark., 2000; Yang ve ark., 2001; Masso-Welch ve ark., 2002]. *G. lucidum*'un meyvelerinden izole edilen triterpenoid fraksiyonlarının (800 µg/mL) Martigel tarafından uyarılan anjiyogenezi engelleyebildiği tespit edilmiştir (bu çalışma *in vivo* modelde gerçekleşmiş ve VEGF ile heparin uygulanmıştır). *G. lucidum*'un triterpenoid fraksiyonlarının antitümör aktiviteleri, bu bileşenlerin tümör tarafından uyarılmış anjiyogenezi durdurmasına bağlı olabilir [Kimura ve ark., 2002]. Bir diğer çalışmada *G. lucidum*'dan izole edilen ganoderik asid F'ninde Martigel tarafından uyarılmış anjiyogenezi durdurduğu gösterilmiştir [Kimura ve ark., 2002]. *G. lucidum*'un taze meyvelerinin %70' lik etil alkol ekstraktından elde edilen, kahverengimsi katı materyalin (GL), CAM testinde (civciv embriyo koriyoallantoik membran testi) güçlü bir antianjiyogenetik etki gösterdiği belirlenmiştir [Song ve ark., 2004]. Cao ve Lin'in 2004 yılında yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise *G. lucidum*'un polisakkarit peptidleri (GLPP) ekstre edilmiş ve antianjiyogenik özelliği CAM testiyle belirlenmiştir. Her disk GLPP'nin 80 µg'ı ile 48 saat muamele edildikten sonra disk etrafında mikrodamar oluşumu gözle görülür bir şekilde azalmıştır [Cao ve Lin, 2004]. Bu sonuçlar da GLPP'nin anjiyogenezi durdurucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

6. Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz

Apoptoz programlanmış hücre ölümünün aktif bir sürecidir ve bu süreç pek çok önemli fizyolojik şartlarda meydana gelebilmektedir. Prekanseröz ve kanserli hücrelerin önceden elimine edilmesi için ideal bir yol olarak görülen apoptoz kanser araştırmalarında üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan bir alan haline gelmektedir [Han ve ark., 2008; Jang ve ark., 2010]. Çeşitli hastalıkların tedavisinde hücrelerin apoptozise duyarlılığının artırılması ya da azaltılması şeklindeki özel terapilerden yararlanılmaktadır [Bold ve ark., 1997; Lee ve ark., 2011]. Ancak apoptozisteki uygun olmayan düzenlemeler nöral bozulmalar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi ciddi hastalıklara sebep olmaktadır [Earnshaw ve ark., 1999; Lee ve ark., 2011]. Tıbbi bitkilerden elde edilen çeşitli fitokimyasallar apoptoz yoluyla antikanser etki göstermektedirler. Apoptotik özelliklere sahip doğal ürünler antikanser ilaç olarak kullanım açısından yoğun ilgi çekmektedirler [Lee ve ark., 2011].

Apoptoz *Ganoderma*'nın kanseri önleyici etkisi için de olası bir mekanizma olarak düşünülebilir [Gao ve Zhou, 2003]. *Ganoderma lucidum*'un etanolik ekstraktları insan kolon kanser hücre hattı HT-29'da nitrik oksiti ve kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozisi indüklemiştir [Hong ve ark., 2004]. Lingzhi ekstraktları PC-13 hücrelerinde Bcl-2, Bcl-xl proteinleri ve $G_2$/M geçiş proteinlerinin (siklin B, Cdc2) ekspresyonunu azaltmıştır. Hücrelerin $G_2$/M evresinde kaldıkları tespit edilmiştir [Jiang ve ark., 2004b]. Lingzhi ekstraktlarına maruz bırakılan insan göğüs kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücreler $G_1$ fazında kalmışlardır [Hu ve ark., 2002; Jiang ve ark., 2004b]. Zhou ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada *G. lucidum*'un biyoaktif bir triterpeni olan ganoderik asit Me (GA-Me) insan kolon kanseri hücre hattına (HTC-116) uygulanmıştır. Bu çalışmada Hoechst 33258 boyama testinde HTC-116 hücreleri GA-Me'nin 18,1; 36,2; 54,3; 90,4 μM konsantrasyonları ve pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubisin (dox.)'in 18,4 μM konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilmiştir. GA-Me ilave edilen uygulama grubunda konsantrasyona bağlı olarak apoptotik hücre sayısında artış

gözlenmiştir. Annexin V-PI testinde ise hücreler GA-Me'nin 0,18; 1; 36,2; 54,3; 90,4 μM konsantrasyonları ile muamele edilmiş ve geç apoptotik hücre oranları sırası ile %3,2; %4,93; %6,51; %10,45; %13,14 olarak bulunmuştur. Bu çalışmayla GA-Me'nin insan kolon tümörlerinde apoptozu uyarıcı doğal bir ajan olduğu ortaya konulmuştur.

7. Farklılaşmanın indüksiyonu

Farklılaşma terapisi promiyelositik lösemi tedavisinde en etkili tedavidir. Solid tümörlerin (örneğin prostat kanseri gibi) tedavisi için de farklılaşma tedavisinin uygulanması araştırılmaktadır [Walczak ve ark., 2001]. Farklılaşma ajanları terminal farklılaşmayı, hücresel fonksiyonlarla birlikte olgun bir hücreye farklılaşmayı, malignant olmayan bir hücre benzeri farklılaşmayı uyarabilmekte ya da apoptozu başlatabilmektedir. Bunlar sıklıkla azaltılmış bir toksisite profili sunarlar. Kanserin gelişimini önleyici ya da yavaşlatıcı bir potansiyele sahiptirler. İlerlemiş derecede kansere sahip insanlarda kemoterapiye bir alternatif sağlarlar. Yüksek riskli kansere sahip insanlarda kemoprevensiyon için düzenli olarak verilen düşük toksisiteli bir ajan olarak kullanılabilirler. Pek çok sentetik farklılaşma ajanının (örneğin tamoksifen gibi) ve bitkisel bileşenlerin, tümör hücrelerinin farklılaşmasını uyarıcı potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir [Chen ve ark., 1997; 2002; Fisher ve Yang 2002].

GLPS (*Ganoderma lucidum* polisakkaritleri) ile uyarılmış insan kan mononüklear hücreleri U937 hücrelerinin gelişimini önemli ölçüde önleyici etkiye sahiptirler ve onların olgun monositlere/makrofajlara farklılaşmasını indüklemektedirler. Bu monosit/makrofajların fagositoz ve sitoplazmik süperoksit üretmek gibi fonksiyonları mevcuttur [Lieu ve ark., 1992]. Cheung ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada *G. lucidum* özütlerinin PC12 hücrelerinin sinirsel farklılaşmasını indüke edebildiği gözlenmiştir. Ayrıca NGF bağımlı PC12 nöronlarını da apoptozisten koruduğu bulunmuştur [Cheung ve ark., 2000].

8. Konağın immün savunmasının geliştirilmesi

Besinsel fitokimyasalların konakçı immün fonksiyonlarını geliştirmesi kanserin önlenmesi ve tümör hücrelerinin öldürülmesinden kısmen sorumlu tutulmaktadır [Lowell ve ark., 1990; Appelbaum, 1992; Hughes, 1999]. Ticari sitotoksik kemoterapötik kimyasalların aksine *Ganoderma* tümör hücrelerine karşı konakçı biyolojik cevabı düzenleyerek etki etmekte bu ise terapötik etkilerle sonuçlanmaktadır. Bu etki *Ganoderma*'nın bir antikanser ajan olarak kullanılması için önemli temel teşkil etmektedir [Gao ve Zhou, 2003].

*Ganoderma*'nın bileşenlerinin immünostimülatör etkiye sahip oldukları *in vitro* çalışmalarla ve hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir. *Ganoderma*'dan elde edilen ekstraktların T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) gibi hücreleri içeren immün efektör hücrelerini *in vivo* ve *in vitro* koşullarda aktive ettiği bildirilmiştir [Bao, 2001b; 2002; Gong ve ark., 2001]. *Ganoderma*'nın sulu ekstraktları hidrokortizonun varlığında splenositlerden IL-2'nin üretimini uyarmaktadırlar [Zhang ve ark., 1993]. *Ganoderma* TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 gibi çok sayıda sitokini üreten T lenfositlerini aktive eder [Gao ve ark., 2000; Gong ve ark., 2001]. *G. lucidum*'dan elde edilen polisakkarit fraksiyonları (sulu ekstraktı) tümör taşıyan farelerde splenik NK hücrelerinin sitotoksisitesini artırmıştır [Won ve ark., 1989; Lee ve ark., 1995]. Yine bu mantardan izole edilen polisakkaritler özellikle β-D glukanlar, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda insan ve fare makrofajlarını uyarıcı bir etkiye sahiptirler [Li ve ark., 2000; Bao ve ark., 2001a,b; 2002; Wang ve ark., 2002]. *G. lucidum*'dan elde edilen bileşenler tarafından uyarılan makrofajlar sitokinlerin (IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α), nitrikoksidin ve diğer düzenleyicilerin salınımını sağlarlar [Han ve ark., 1998]. Bu mantardan izole edilen proteoglikanlar fare dalak lenfositlerinin proliferasyonunu uyarmaktadır ve bu da B hücrelerinin oranında 3-4 kat artışa sebebiyet vermektedir [Zhang ve ark., 2002]. B hücreleri genişlemekte, hücre yüzeyindeki CD71 ve CD25

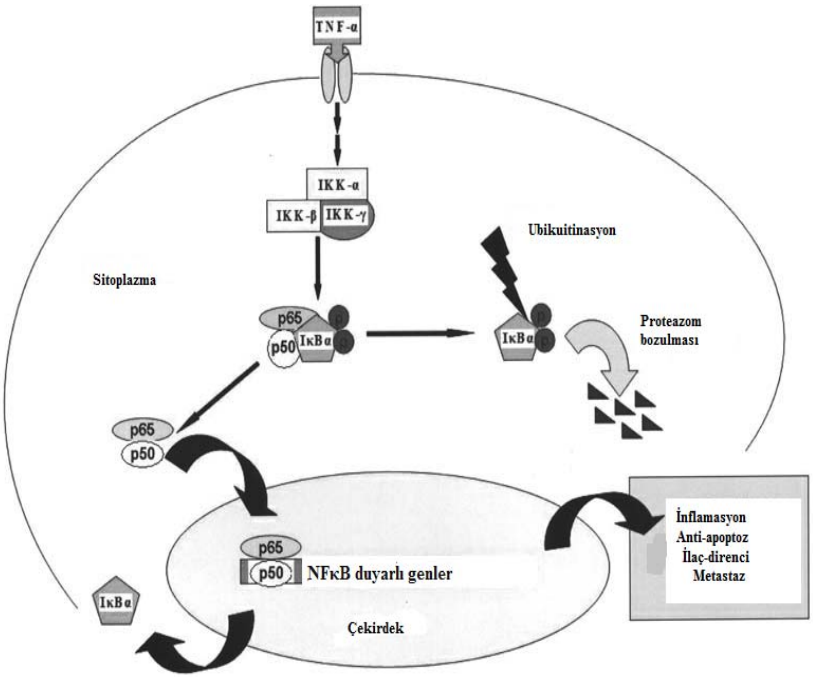
ekspresiyon edilmekte ve immünoglobulinin salgılanmasında bir artış görülmektedir [Gao ve Zhou 2003].

*G. lucidum*'un taze meyvelerinden elde edilen polisakkaritlerin (PS-G) varlığında, makrofaj kültürlerinde IL-1b, TNF-α, IL-6 seviyelerinin sırasıyla muamele yapılmayan kontrollere göre 5.1-, 9.8-, 29 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [Wang ve ark., 1997]. Ayrıca PS-G'nin varlığında T lenfositlerden IFN-γ salınımının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. PS-G'nin antitümör etkisi lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonuyla bağlantılıdır. Bu da kanser hücrelerinin gelişimini durduran TNF-α ve IFN-γ'nın salınımına sebep olmaktadır. Benzer sonuçlar *G. lucidum* polisakkaritleri B (GL-B) ile yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. GL-B'nin TNF-α ve IFN-γ'nin mRNA ekspresyonunu artırabildiği bulunmuştur [Zhang ve Lin 1999]. Bir *G. lucidum* polisakkarit ekstratı olan Gonopoly-R'nin ilerlemiş evredeki kanser hastalarının immün fonksiyonlarına etkisiyle ilgili yapılan klinik çalışmada, 34 kanser hastasına ağız yoluyla günde 3 defa 1800 mg Ganopoly(R) verilmiştir. 12 haftalık bir tedavinin sonucunda IL-2, IL-6 ve INF-γ'nın ortalama plazma konsantrasyonlarında önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ortalama doğal öldürücü hücre aktivitesinde de önemli bir artış vardır. Bu çalışma ilerlemiş derecedeki kanser hastalarında Ganopoly(R)'nin immün cevabı artırabileceğini göstermektedir [Gao ve ark., 2003].

9. Hücre içi sinyal iletim yollarının düzenlenmesi

Mantarlar hem immün sistemi güçlendirici hem de yapılarında bulunan bileşenler sayesinde hücre membranlarını delerek geçip hücre farklılaşması, karsinogenez, metastaz gibi süreçlerle ilgili önemli sinyal iletim yollarını düzenleme özelliğine sahiptirler. Nüklear transkripsiyon faktörü κB'nin (NFκB) aktivasyonu da önemli yol ağlarından biridir. Şekil 2.4'de kalsik bir NFκB yolağı gösterilmiştir. 26 mantar türünün farklı mekanizmalar aracığı ile NFκB'ye karşı etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [Petrova ve ark., 2008]. NFκB hücre

kemoresistansından sorumlu faktörlerden biridir. Rel/NF-κB transkripsiyon ailesine ait dimerik bir transkripsiyon faktörüdür [Karin ve Ben-Neriah, 2000; Karin ve ark., 2002]. NFκB kompleksi sitoplazmada IκBα inhibitör proteini aracığı ile inaktif formda bulunmaktadır. NFκB'nin aktifleşmesini sağlayan IκB kinaz kompleksidir (IKK). Bu kompleks IKK-α ve IKK-β olmak üzere iki katalitik alt birimden oluşmaktadır. Bu komplekste ayrıca IKK-γ, düzenleyici alt birimi de bulunmaktadır [Zandi ve Karin, 1999]. NFκB yolağı bakteriyal ve viral enfeksiyonlar, proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler (TNF-α, IL-1, IL-6, lipopolisakkaritler gibi) tarafından başlatılabilir. Bu faktörlerin tümü IKK kompleksini aktive eder. Aktivasyonun ardından NFκB'ye bağlı IκB proteinleri fosforile edilir ve proteazomal bozulmaya uğratılır. Eş zamanlı olarak serbest kalan NFκB dimerleri nükleusun içerisine girer ve hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu başlatılır. Bu genler immünsupresif, inflamatuvar ve antiapoptotik genlerdir [Pahl, 1999; Karin ve ark., 2002].




Şekil 2.4 Klasik bir NFκB aktivasyon yolağı modeli [Petrova ve ark., 2008]

Ayrıca NFκB inflamasyon ve apoptozun baskılanmasına ek olarak hücre çoğalması, anjiyogenez, metastaz, tümörün ilerlemesi ile ilgili genlerin transkiripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir. NFκB'nin düzenlenmesindeki bozukluklar katı ve hematopoetik malignitelerin de içinde bulunduğu pek çok kanser türünde gözlenmiştir [Cilloni ve ark., 2007; Jost ve Ruland, 2007]. NFκB ve sinyal iletim yolunun yanlış düzenlenmesi kanserin ilerlemesinde ve özellikle kemoterapi ve radyoterapi esnasında ilaç direncinde etkilidir. NFκB'nin bloklanması tümör hücrelerinde proliferasyonun durdurulmasına ya da antitümör ajanların etkilerine karşı daha duyarlı hale gelmeye neden olabilir [Karin, 2006].

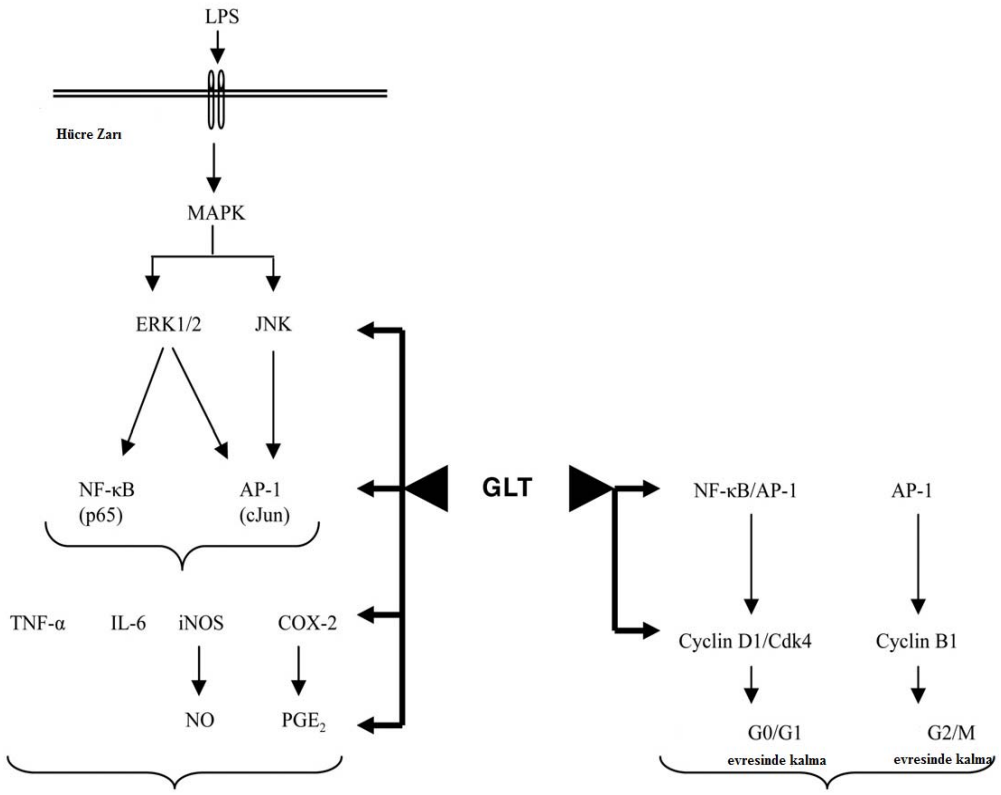
Mantarlardan elde edilen geniş çeşitlilikteki biyolojik olarak aktif bileşenler sadece immün sistemi uyarmakla kalmamakta aynı zamanda özel sinyal iletim yollarını düzenleyerek özel hücresel cevabı da ayarlamaktadırlar [Petrova ve ark., 2005]. *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* ve *Phellinus linteus*'dan elde edilen kafeik asit fenil ester (CAPE) buna örnek olarak verilebilecek bileşikler arasında gelmektedir. CAPE, NFκB'nin DNA'ya bağlanmasını engellemektedir ve bu da insan göğüs kanseri MCF-7 hücrelerinde ümit verici sonuçlar doğurmaktadır [Mattila ve ark., 2001; Nakamura ve ark., 2003]. Tıbbi özellikleriyle iyi bilinen bir diğer mantar *Hericium erinaceum*'un sulu ekstraktının interlökin-β'in ekspresyonunu indükleyerek NFκB'nin aktivitesini (pro-apoptotik etkisiyle) artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [Son ve ark, 2006]. *Marasmius oreades* IκBα'yi fosforlanması engelleyen güçlü bir inhibitördür ve böylelikle anti- NF-κB özellik gösteren mantarlara bir diğer örneği oluşturmaktadır. *Marasmius oreades* gibi *Ganoderma* sp., *Pleurotus ostreatus* ve *Schizophyllum commune* de benzer özellikler göstermektedir. Tüm bu mantarlar güçlü birer IκBα inhibitörüdürler [Petrova ve ark., 2007]. *Ganoderma* sp. IκBα'nin fosfarilasyonunu üzerindeki etkileri yanında IκBα bozulması üzerine de etkileri mevcuttur [Petrova ve ark., 2008].

Bir serin proteaz olan uPA'nin ve resestörü olan uPAR'nin birçok insan malignant kanserlerde yüksek seviyelerde olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Çeşitli

transkripsiyon faktörleri uPA ve UPAR'nin tanskripsiyonunu düzenlemektedir. Aktivatör protein (AP-1) ve NFκB bu transkripsiyon faktörlerine örnek olarak verilebilir [Sliva, 2004; Allgayer, 2006]. uPA ve uPAR'nin ekspresyonunu düzenlemenin yanında AP-1 ve NFκB, hücre döngüsünün devamlılığını sağlayan (siklin D1), hücre canlılığını devam ettiren (Blc-2, Blc-xl), inflamatuvar tümör büyümesi (sikloksigenaz-2, COX2) ve anjiyogenezle (vasküler endoteliyal büyüme faktörü, VEGF), IL-6, TNF-α ve iNOS (nitrikoksik sentaz) ilgili genlerin ekspresyonun düzenlenmesi ile de ilgili transkripsiyon faktörleridir [Eferl ve Wagner, 2003; Lu ve ark., 2006]. AP-1 ve NFκB aktivasyonu, yüksek çoğalma potansiyeli, anti-apoptoz, kanser hücrelerinin metastazı ve yayılması ile ilişkilidir [Eferl ve Wagner, 2003; Jiang ve ark., 2008]. AP-1 ve NFκB'nin aktivasyonu ise ekstaraselular sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2), p38 MAP kinaz, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) gibi mitojen aktiviteli protein kinazlar (MAP) ve inhibitör kappa B kinaz (IKKs) tarafından düzenlenmektedir [Dudhgaonkar ve ark., 2009].

*Ganoderma lucidum*'dan elde edilen ganoderik asit A ve H, MDA-MB-231 insan göğüs kanseri hücre hattının yayılmasını önleyici etki göstermiştir. Bu hücre hattında AP-1 ve NFκB'nin baskılanması sonucu uPA ve CDK4'ün sekresyonu azalmıştır [Jiang ve ark., 2008]. *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen bir diğer ganoderik asit olan ganoderik asit T HCT-116 hücre hattının proliferasyonunu engellemiştir. Burada ganoderik asit T NFκB'yi ve IκBα'nın de degradasyonunu engellemiş ve uPA, iNO'nun (uyarılabilir nitrik oksit) da ekspresyonunu azaltmıştır [Chen ve ark., 2011]. Weng ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları bir diğer çalışmayla lusidenik asit B'nin PMA (Forbol miristal asetat) tarafından indüklenen HepG2 hücre hattında oldukça etkili olduğu ortaya koymuşlardır. Lusidenik asit B ERK1/2'nin fosforilasyonu engellenmiş ve AP-1 ve NFκB'nin DNA'ya bağlanma aktiviteleri azaltılmıştır ve bu da MMP-9 aktivasyonunda azalmaya neden olmuştur [Weng ve ark., 2008]. Thyagarajan ve arkadaşları tarfından 2006 yılında yapılan bir diğer çalışmada *Ganoderma lucidum*, oksitatif stres tarafından indüklenmiş ERK1/2 fosforilasyonunu engellemiştir ve bu da AP-1 ve NFκB'nin transkripsiyonel

aktivasyonunu azaltmıştır. Ayrıca interlökin-8'in ekspresyonu azalmış ve bu çalışmada *Ganoderma lucidum* tarafından MCF-7 göğüs kanseri hücre hattının yayılmasının engellendiği ortaya konulmuştur [Thyagarajan ve ark., 2006]. Şekil 2.5'de *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen bileşenin NFκB ve AP-1 üzerindeki etkisi gösterilmiştir.



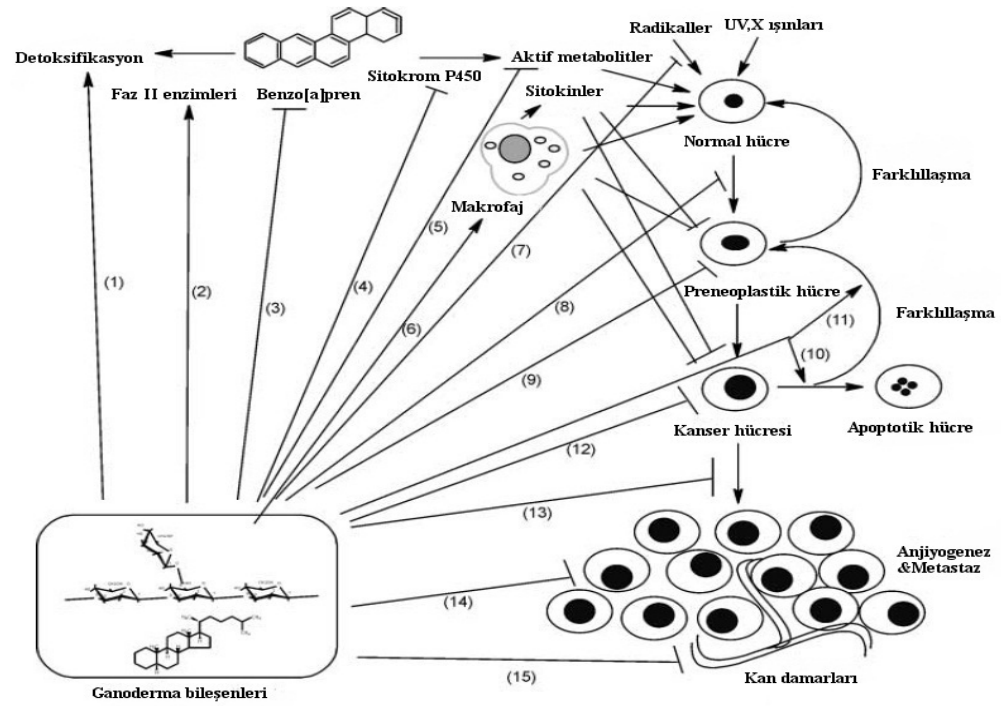

Şekil 2.5. *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen bileşenin NFκB ve AP-1 transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi [Dudgaonkar ve ark., 2009]

10. Poliamin sentezinin engellenmesi

Poliaminler normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun önemli intraselular düzenleyicileridir [Thomas ve Thomas, 2001]. Poliamin konsantrasyonunun kanserli dokulardaki oranı normal dokulardaki oranına göre daha

fazladır. Örneğin normal dokuya oranla göğüs kanseri dokusunda 4 ila 6 kat, kolon kanseri dokusunda 3 ila 4 kat daha fazla poliamin konsantrasyonuyla karşılaşılmaktadır [Saunders ve Wallace, 2010]. Poliamindeki azalma veya poliamin sentezinin durdurulması apoptozla ve/veya hücre proliferasyonunun durdurulmasıyla sonuçlanmaktadır. Biyosentezinin inhibitörleri, poliamin analogları, oligonükleotid/ poliamin analog kombinasyonları kanserin tedavisi ve/veya kemoprevensiyon için ilaç adayları olmakta ümit verici maddelerdir [Thomas ve Thomas, 2001].

Ornitin dekarboksilaz (ODC) hücrede poliaminlerin sentezini kontrol eden bir enzimdir. ODC'nin engellenmesi poliaminlerin (spermin ve spermidin) sentezi için gerekli olan putreskin oluşumunu önlenmektedir [Saunders ve Wallace, 2010]. GLPS, forbol miristal asetat (PMA) indüklemesiyle oluşan ornitin dekarboksilaz aktivitesini azaltmış ve Balb/3T3 hücrelerinin proliferasyonunun durdurulmasına katkı sağlamıştır [Kim ve ark., 1999]. Bu nedenle *Ganoderma*'dan elde edilen polisakkaritler kanserin tedavisi ve/veya kemoprevensiyon için bir çözüm sunmaktadır [Gao ve Zhou, 2003]. *G. lucidum*'un olası kanser önleyici mekanizmaları şekil 2.6'de gösterilmiştir.




Şekil.2.6. *Ganoderma*'nın antikanser etkileri ve kanseri önlemesi için olası mekanizmalar, *Ganoderma*'nın aktif bileşenleri pek çok mekanizmayı düzenleyebilir. 1. Karsinogenezin detoksifikasyonunun artırılması 2. Faz II enzimlerinin aktivitesinin ve ekspresyonunun artırılması 3. Boşaltımın artırılması ya da absorpsiyonun azaltılmasına bağlı olarak karsinojenlerin organ maruziyetinin azaltılması 4. Faz I enzimlerinin aktivitesinin ve ekspresyonunun azaltılması 5. Toksik metabolitlerin oluşumununazaltılması ve makromoleküllere etkisinin azaltılması 6. Konakçı immün cevabın artırılması 7. Antioksitatif ve radikal süpürücü etki 8. Gelişmeyi önleyici etkisi 9. Çomayı önleyici etkisi 10. Tümör hücrelerinin apoptozunu uyarıcı etkisi 11. Farklılaşmayı uyarıcı etki 12. Direkt sitotoksisite, hücre döngüsünü durdurucu etki, çoğalmayı önleyici ve sinyal iletim moleküllerini düzenleyici etki 13. Tümörün gelişimini önleyici etki 14. Metastazı engelleyici etki 15. Anjiyogenez üzerine etkisi [Gao ve Zhou, 2003].

## 2.3. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Testleri

Kimyasal maddelerin potansiyel mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesinde genotoksisite testleri kullanılmaktadır. Bu testlerde tek ve çift zincir

kırıkları, nokta mutasyonlar, delesyonlar, kromozomal aberasyonlar, mikronükleus oluşumu, DNA tamiri ve hücre döngüsü etkileşimi gibi farklı noktalar incelenmektedir [Ng ve ark., 2010]. Bu amaçla *in vitro* (insan ve memeli hücreleri) ve *in vivo* (populasyon biyogözlem ve hayvan çalışmaları) sistemler kullanılmaktadır. Farklı türlerde çeşitli biyosistemlerde benzer noktaların kullanımı türler arası etkilerin kıyaslanmasına imkan vermektedir. *In vitro* genotoksisite testleri hedeflenen toksisitenin ve altında yatan mekanizmanın belirlenmesinde basit, güçlü, zaman ve maliyet bakımından elverişli imkanlar sunmaktadır. Genotoksisitenin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan metodlara Ames testi, hücrelerde DNA iplik kırıklarının ölçüldüğü testler (comet testi, hidroksiapatit kromotografisi), sitogenetik testler (kromozomal anormallik ve mikronükleus testi) örnek olarak verilebilir [Dusinska ve ark., 2012].

Kromozomal anormallik (KA) testi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda memeli sistemlerde sıklıkla kullanılan bir testtir. *In vitro* kromozomal aberasyon testi kültüre edilmiş memeli hücre hatlarında ve primer kültürlerde yapısal kromozom ya da kromatid kırıklarına sebebiyet veren ajanların belirlenmesinde kullanılır. Kromozomal aberasyonlar insanlarda pek çok genetik hastalığa sebep olurlar. Somatik hücrelerdeki tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde meydana gelen kromozomal hasarlar ve ilgili olaylar insanlarda ve hayvanlarda kanser oluşumunu uyarmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda, insanlardaki kromozomal anormallik frekansındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir [Hagmar ve ark., 1998; Bolognesi ve ark., 2003]. Bu testte hücreler test materyaline maruz bırakılmakta ve çalışmanın bitiminden önce hücrelerin metafaz evresinde kalmasını sağlayıcı bir madde (kolkisin veya kolsemid gibi) ortama eklenmektedir. Metefaz evresindeki hücreler kromozomal abeasyonların varlığı açısından değerlendirilmektedir [Dusinska ve ark., 2012].

Sık kullanılan testlerden biri olan Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi bir bileşen tarafından hücrelerde oluşturulan genetik hasarın belirlenmesinde ve bu maddenin

olası mutajenitesinin tespitinde kullanılan bir testtir. KKD testi hücre bölünmesi sırasında bir kromozomun iki kardeş kromatidi arasında DNA parça değişimininin belirlenmesini sağlamaktadır. Bir maddenin varlığında artan KKD frekansı o maddenin mutajenitesini göstermektedir [Holz ve ark., 1995; Hoerauf ve ark., 1999]. KKD testi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kimyasala maruziyetten kaynaklanan sitogenetik cevabın ve doz ilşkisinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ekstraktların genotoksik potansiyellerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [Lopez-Nigro ve ark., 2003].

Son yıllarda *in vitro* mikronükleus testi genotoksisitenin belirlenmesinde cazip hale gelmeye başlamıştır. Bu testin klastojenik ve anojenik olayların her ikisinin birden belirlenmesine izin vermesi, farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği, kesin sonuç vermesi, kolay bir şekilde sayımı gibi özellikleri bu teste artan ilginin nedenlerindendir [Kirsch-Volders ve ark., 2011]. *In vitro* mikronükleus testi genotoksisitenin belirlenmesi açısından kromozom aberasyon testine bilimsel olarak bir alternatif olarak düşünülmektedir [Corvi ve ark., 2008].

MN testiyle mikronükleus olarak adlandırılan küçük ve ekstrasellüler parçacıklar belirlenmektedir. Mikronükleuslar (MN) hücre bölünmesi sırasında oluşan asentrik kromozom/kromatid parçacıkları ya da tüm bir kromozom ya da kromatid olabilmektedir. Bunlar anafazda geri kalmış ve telofazda oluşan iki kardeş çekirdeğin içerisine girememiş genetik materyallerdir [Kirsch-Volder ve ark., 2002; 2011; Fenech ve ark., 2011]. MN genetik ve epigenetik gibi geniş yelapazedeki mekanizmalarla meydana gelebilir. Klastojenlere ve anojenlere maruziyet sonucu oluşabileceği gibi bir savunma mekanizması olarak ya da hücre farklılaşmasına katkı sağlayıcı olarak kendiliğinden de oluşabilir [Kirsch-Volder ve ark., 2011].

Genetik değişimlerdeki birikim genetik dengesizliğe sebebiyet verebilir ve bu da kanser ile sonuçlanır. MN sıklığı (ayrıca kromozom aberasyon sıklığı da buna dahil) artan kromozomal değişimler ile kanser riski arasındaki ilişkiyi güçlü bir şekilde

gösteren sitogenetik bir göstergedir [Kirsch-Volder ve ark., 2011]. Rajagopalan ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada insan kolorektal kanserlerinden ve adenomalardan elde edilen hücreler artmış bir genom dengesizliğine sahip olmakla birlikte bu hücrelerde yüksek bir MN sıklığı gözlenmiştir [Rajagopalan ve ark., 2004].

Her üç test de aynı zamanda farklı bileşiklerin, mutajen olduğu kanıtlanmış ajanlara karşı antigenotoksik etkilerini belirlemek için de kullanılmaktadır.

### 2.4. *G. lucidum* ile Yapılmış Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları

Geçtiğimiz son 20 yılda mantarlardan elde edilen polisakkaritlerin antikanser etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir [Ooi ve Liu, 2000]. Terapötik yararlarından dolayı üzerinde araştırmaların yapıldığı ve geniş bir kullanıma sahip olan *Ganoderma lucidum* da bu mantarlardan biridir [Lin ve Zhang, 2004].

Chen ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada mantarlardan elde edilen β-glukanların genotoksik potansiyelleri *in vitro* kromozomal aberasyon testi ile belirlenmiştir. Kullanılan β-glukanlar *G. lucidum*'dan elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan ürün %90 karbohidrat (bunun %50-60'ı β-glukandan oluşur), yağ (%2,4) ve protein (%0,7) içermektedir. Bu testte CHO-K1 hücre hattı kullanılmıştır. β-glukanların 5 dozu (0,313; 0,625; 1,250; 2,500; 5,000 mg/mL) kullanılarak sitotoksisiteleri MTT testi aracılığıyla belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak kültür ortamı, pozitif kontrol olarak ise farklı uygulamalar için mitomisin-C (3 ve 18 saat) ve benzo(a)piren (3saat) kullanılmıştır. MTT testinde hücrelerin yaşayabilirliği ölçülmüştür. Mikroskobik gözlemle de hücrelerin morfolojileri incelenmiştir. Mantar β-glukanlarının sitotoksik olmayan 1,250; 2,500; 5,000 mg/mL'lik dozları S9'lu veya S9'suz kısa süreli (3 saat), S9'suz uzun süreli (18 saat) olmak üzere kromozomal aberasyon testi için seçilmiştir. Kromozom kırıkları ve değişimi, kromatid kırıkları ve değişimi ile diğer anormallikler gözlenmiştir. 3 saat muamele sonucunda S9'un

yokluğunda hücre yaşayabilirliği 5,000; 2,500; 1,250; 0,625; 0,313 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla %83,53; %85,38; %91,96; %91,54; %96,79 olarak bulunmuştur. Kısa süreli uygulamada S9 varlığında ise aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %96,17; %85,83; %93,49; %97,39; %100,82 olarak tespit edilmiştir. S9'suz uzun süreli uygulamada hücre yaşayabilirliği sırasıyla %67,05; %69,40; %81,46; %82,01; %95,61'dir. Mantar β-glukanı uygulanan CHO-K1 hücre hattında genotoksisite gözlenmemiştir. Kromozom aberasyon testinde gerek uzun gerekse kısa süreli uygulamaların hiçbirinde β glukan muamelesi negatif kontrole göre herhangi bir farklılığa sebebiyet vermemiştir [Chen ve ark., 2011].

Chiu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Ganoderma*'nın dondurularak kurutulmuş meyveleri kullanılmıştır. Bu meyvelerden *Ganoderma* ekstraktı elde edilmiştir. Bu çalışmada her biri 5 fareden oluşan 4 grup oluşturulmuştur. Gecelik açlıktan sonra 2 gruba ultrasaf su ve diğer 2 gruba ise *Ganoderma* ekstrakt solüsyonu ağız yoluyla 2 hafta boyunca uygulanmıştır (doz 0,9259 g dondurularak kurutulmuş ekstrakt/kg vücut ağırlığı her fare için). Pozitif kontrol ve *Ganoderma* ile beslenen gruplardan birine 15. gün etil metansülfanat (EMS) enjekte edilmiştir (300 mg EMS/kg vücut ağırlığı her fare için). Negatif kontrol grubuna ise aynı dozda ultra saf su enjeksiyonu yapılmıştır. 12 saat sonra kan örnekleri alınmıştır. Fare lenfositlerinde genotoksisitenin belirlenmesi için kullanılan *in vivo* comet testiyle kontrol ve *Ganoderma* ile beslenen grupta benzer sonuçların olduğu ortaya konmuştur. EMS enjekte edilen ve EMS enjeksiyonundan önce 2 hafta *Ganodema* ile beslenen grupta tüm kriterler birbirleriyle benzer olarak bulunmuştur. Tüm parametreler DNA kırıklarının EMS alınımıyla arttığını göstermiştir. Ayrıca kontrol grubuyla sadece *Ganoderma* ekstraktı verilen grup arasında önemli bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle *Ganoderma* ekstraktının bu test metodunda herhangi bir genotoksik etkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca EMS'nin genotoksisitesine karşı herhangi bir koruyucu etkisi gözlenmemiştir [Chiu ve ark., 2000].

Smina ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Ganoderma lucidum*'dan izole edilen triterpenlerin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada fare dalak lenfositleri 2 Gy γ-radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Radyasyon sonrasında hücrelerde meydana gelen hasara karşı triterpenlerin farklı konsantrasyonlarının (25, 50 ve 100 μg/ml) koruyucu etkisi comet testi ile ölçülmüştür. Işınlama kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde artışa neden olurken triterpen uygulaması etkili bir şekilde DNA hasarını azaltmıştır ve kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde azalmaya neden olmuştur [Smina ve ark., 2011].

Wachtel-Galor ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada *G. lucidum*'un insan lenfositik DNA'sına olan etkileri *ex vivo* comet testi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada *G. lucidum*'un düşük konsantrasyonda genoprotektiv etkiye sahip olduğu ancak yüksek konsantrasyonda ise DNA'ya hasar verdiği belirlenmiştir. *G. lucidum*'un hasara neden olmayan konsantrasyonlarının hücrelerde zararlı etkilere neden olan oksitatif bileşenlere karşı koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu mantarın düşük konsantrasyonlardaki koruyucu etkisi onun sağlığı iyileştirici etkisini açıklayabilir [Wachtel-Galor ve ark., 2005].

*Ganoderma lucidum*'un sulu ekstraktı ile yapılmış *in vitro* insan lenfositlerinin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

# 3. MATERYAL METOD

## 3.1. Materyal

### 3.1.1 Kromozomların incelenmesi için materyal

Bu çalışmada *G. lucidum* mantarının muhtemel genotoksik etkisi ile antitümöral bir ajan olan mitomicin-C (MMC)'nin kromozomlar üzerinde yapmış olduğu hasara karşı muhtemel antigenotoksik etkisinin saptanması için insan periferal kanı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kan 25 yaşındaki dişi bireyden ve 23 yaşındaki erkek bireyden temin edilmiştir. Bu bireylerin herhangi bir hastalık nedeniyle düzenli ilaç kullanmaması, sigara, alkol kullanmaması ve sağlıklı bireyler olması dikkate alınmıştır.

### 3.1.2. Test materyali

Bu çalışmada *G. lucidum* mantarının % 30'luk sulu ekstraktı kullanılmıştır. Bu çalışma için ekstraktlar piyasada sulu ekstrakt satımı yapılan firmalardan temin edilmiştir.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

Bu çalışmada rodentlerdeki $LD_{50}$ dozu (38 g/kg) dikkate alınarak lenfosit kültüründe kullanılan en yüksek doz 9500,00 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ticari olarak elde edilen 10 ml'lik %30'luk mantar ekstraktı içeren üründen en yüksek konsantrasyon 9500,00 µg/ml olarak hazırlanmış ve diğer konsantrasyonlar 4750,00; 2375,00; 1187,50; 593,75 µg/ml şeklinde tespit edilmiştir.

### 3.2.2. Preparatların Hazırlanması

Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için preparatların hazırlanması

Kromozomal anormalliklerin ve KKD'lerin belirlenmesi amacıyla preparatlar Evans ve ark., [1984]; Perry ve ark., [1984] ve Speit ve Houpter'in [1985] yöntemlerine göre bazı modifikasyonlarla yapılmıştır. Her bir donörden alınan kanların 0,2 ml'si 2,5 ml hacmindeki besiyerine (Chromosome Medium B) ilave edilmiştir. Her bir tüpe 10 µg/ml olacak şekilde, daha önceden hazırlanmış olan BrdU çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler 72 saatlik inkübasyon sürelerini geçirmek üzere 37˚C'deki etüve kaldırılmıştır.

*G. lucidum* mantarının sulu ekstraktının genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı uygulama yapılmıştır. Mantarın genotoksik etkisinin belirlenmesi için 593,75; 1187,50; 2375,00; 4750,00; 9500,00; µg/ml'lik sulu ekstraktı, besiyerlerine, inkübasyonun 24. saatinde eklenmiş ve saf su uygulanan bir negatif kontrol de oluşturulmuştur. Yukarıdaki 5 farklı konsantrasyonun 24 saatlik uygulaması için de inkübasyonun 48. saatinde kültür ortamına mantar ekstraktları eklenmiş ve negatif kontrol oluşturulmuştur.

Mantarın antigenotoksik etkilerini belirlemek için mantarın sulu ekstraktı ve mitomisin-C (MMC) eşzamanlı uygulanmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde 593,75; 1187,50; 2375,00; 4750,00; 9500,00 µg/ml' lik mantar ekstraktları ve aynı zamanda her bir tüpe MMC (0,2 µg/ml) eklenmiştir. Ayrıca sadece MMC ilave edilen bir pozitif kontrol de oluşturulmuştur. Antigenotoksik etkisinin 24 saatlik uygulaması içinde yukarıdaki konsantrasyonlar ve MMC, inkübasyonun 48. saatinde uygulanmıştır.

Kültürün 70. saatinde her bir tüpe kolkisin (10 µl) ilave edilmiştir. Bu ilaveden sonra tüpler karıştırılarak etüve kaldırılmıştır. Kültür süresinin dolmasından sonra (72. saatten sonra) tüpler 10 dakika süreyle 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımları atılmış, tüpün dip kısmındaki kısma daha önceden hazırlanmış 0,075 M KCl hipotonik çözeltisi ilave edilmiş ve karışmaları sağlanmıştır. Daha sonra 10 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan 3:1 metanol:asetik asit karışımı tüplerin dip kısmında kalan sıvı üzerine karıştırılmak suretiyle ilave edilmiştir. Fiksatifin ilavesinden sonra tüpler +4˚C'deki buzdolabına kaldırılmış ve burada 45 dk bekletilmiştir. Buzdolabında bekletildikten sonra 10 dk 1200 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüjden sonra fiksatif ilavesi yapılmıştır. Fiksatif ilavesi 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuncu santrifüj işlemi sonunda tüplerin süpernatantı atılmış ve dipte kalan kısmın lamlara atılma işlemi gerçekleşmiştir. Lamlar oda sıcaklığında en az 1 gün kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması

*Ganoderma lucidum* mantarının sulu ektraktının insan periferal lenfositlerinde mikronükleus oluşturup oluşturmadığını tespit etmek ve MMC'nin kromozomlarda oluşturduğu hasara karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını saptamak için Fenech, [2000] ve Palus ve ark., [2003] yöntemi kullanılmıştır. Donörlerden alınan kanlar 2,5 ml hacmindeki besiyerine eklenmiştir. Kan ekimi yapılan bu tüpler 37˚C' deki etüve konulmuştur. Belirlenen konsantrasyonlar bir önceki testteki şekilde kültüre ilave edilmiştir. Bu testte yalnızca 48 saatlik uygulama yapılmıştır. Sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmemesi için her bir tüpe inkübasyonun 44. saatinde 7µl/ml sitokalasin-B ilave edilmiştir. 72 saatlik kültür süresinin sonunda tüpler etüvden çıkarılmıştır.

Etüvden çıkarılan tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. 0,075 M KCl çözeltisinde 5 dk bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda tüpler satrifüje konmuş ve 1000 rpm' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda

tüplerdeki süpernatant atılmış ve 3:1 metanol:asetik asit karışımından ilave edilmiştir. Fiksatif koyma işlemi 2 kez daha gerçekleştirilmiştir ve 3. fiksatife konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Son santrifüjün de ardından süpernatant atılmış ve geriye kalan hücreleri barındıran kısım pipetajla homojen hale getirilerek ve lamın farklı bölgelerine atılmak suretiyle preparatlar yapılmıştır.

### 3.2.3. Preparatların Boyanması

Kromozomlarda meydana gelen anormallikleri ve mikronükleus oluşumunu saptamak için hazırlanan preparatlar en az 24 saat oda sıcaklığında kurmaya bırakıldıktan sonra 20-25 dk %5'lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. Kardeş kromatid değişimini gözlemek için hazırlanan preparatlar Speit ve Haupter'in metodları modifiye edilerek boyanmıştır [Speit ve Haupter, 1985]. Bu uygulamada preparatların üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde hazırlanan ışınlama solusyonu dökülmüştür. Preparatlar 254 nm dalga boyunda ışık saçabilen UV lambasıyla ışınlanmıştır. Işınlama sonunda preparatlar 60˚C'ye getirilmiş 2xSSC tamponu içerisine yerleştirilmiştir. Preparatlar bir saat süreyle bu solüsyon içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 20-25 dk boyunca % 5'lik Giemsa boyasıyla boyanmıştır. Tüm testler için hazırlanan preparatlar kurumaya bırakılmış ve preparatlar kuruduktan sonra DPX aracılığıyla daimi hale getirilmiştir.

### 3.2.4. Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanması

Kromozom anormalliklerinin saptanması için dişi ve erkek bireyden 100'er tane olmak üzere toplam 200 metafaz hücresi incelenmiştir. Kromozom anormalliklerini saptarken bu hücrelerin iyi dağılmış olması ve gözlem yapmaya en uygun hücreler olması dikkate alınmıştır. Hücreler toplam hücre sayısı içindeki anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısına göre değerlendirilmiştir. Bulguların anlamlılığının belirlenmesi için genotoksisite deneyinde negatif kontrol

ile antigenotoksisite deneyinde ise pozitif kontrol ile z-testi kullanılarak kıyaslanmıştır. Doz etki ilişkisini belirlemek için SPSS 13.00 programı kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır.

### 3.2.5. Mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI) ve nükleer bölünme indeksinin (NBI) belirlenmesi

Mitotik indeksi belirleyebilmek için dişi ve erkek bireyden 1000'er olmak üzere toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu hücrelerdeki bölünme aşamasında bulunan hücrelerin toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

Replikasyon indeksi hesaplanırken KKD testi için hazırlanan preparatlardan gözlem yapılmıştır. Bu preparatlarda 100 tanesi dişiden 100 tanesi erkekten olmak üzere toplam 200 hücre değerlendirilmiştir. Bu 200 hücreden kaç tanesinin birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) metefaz evresinde olduğu tespit edilmiş ve replikasyon indeksi RI=[1x(M1)+2x(M2)+3x(M3)]/N (N=değerlendirilen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.

Mikronükleus testi için hazırlanan preparatlardan 500 hücre dişi bireyden 500 hücre erkek bireyden olmak üzere toplam 1000 hücre değerlendirilmiştir. Bu hücrelerden bir çekirdekli olanlar (1N), iki çekirdekli olanlar (2N), üç çekirdekli olanlar (3N), dört ve dörtten daha fazla çekirdeğe sahip olan hücreler tespit edilmiş ve Nükleer bölünme indeksi, NBI=[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)]/n (n=değerlendirilen hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.

Her üç indeks için bulunan sonuçların negatif ve pozitif kontrole göre anlamlılığı z-testi ile tespit edilmiştir. Regresyon analizleri SPSS 13.00 programı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.6. Kardeş kromatid değişiminin (KKD) belirlenmesi

KKD için hazırlanan preparatlardan ikinci mitozu geçiren, iyi dağılmış toplam 50 hücre (25 bayandan ve 25 erkekten olmak üzere) incelenmiştir. Kromozomların koyu boyanan bölgelerindeki açık renkli kısımlar ve açık boyanan bölgesindeki koyu kısımların sayısına göre birli, ikili, üçlü kırık olarak değerlendirilmiştir. Bulunan sonuçların negatif ve pozitif kontrollere göre anlamlılığı t-testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca SPSS 13.00 programı kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır.

### 3.2.7. Mikronükleus frekansının belirlenmesi

Mikronükleusları belirlemek için MN preparatlarında binükleat hücreler değerlendirilmiştir. Bu binükleat hücreler karyokinezi gerçekleştirmiş ancak sitokinezi gerçekleştirmemiş hücrelerdir. Bayandan 1000 hücre ve erkekten 1000 hücre olmak üzere toplam 2000 binükleat hücre değerlendirilmiştir. Bu hücrelerde mikronükleus olup olmadığı belirlenmiş ve eğer mikronükleus varsa bir, iki, üç, dört ve daha fazla mikronükleus taşımasına göre gruplandırılmıştır. Mikronükleuslar değerlendirilirken çapının ana nükleusların çapının 1/3'ü ile 1/16'sı arasında değişiklik göstermesi, ana çekirdekle bağlantı göstermemesi, diğer çekirdeklerle aynı şiddette boyanmış olması (bazen daha şiddetli boyanmış da olabilir), şekillerinin yuvarlak ve oval olması gibi özelliklere dikkat edilmiştir. Hücre başına düşen MN sayısı belirlenirken (MN/hücre)=[1 x(1MN)+2 x(2MN)+3 x(3MN+4MN)]/N (N=değerlendirilen toplam hücre sayısı) formülü kullanılmıştır. MN testi sonuçları z testi ile analiz edilmiştir. MN testinde doz-etki arasındaki ilişki ise SPSS 13.00 programı ile belirlenmiştir.

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

## 4.1. Kromozomal Anormallik (KA) Testi Sonuçları

*Ganoderma lucidum* mantarının insan periferal lenfositlerinde tek başına ve MMC ile eşzamanlı olarak 24 saatlik uygulamasının anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısı Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Anormal hücre yüzdesi Şekil 4.1'de verilmiştir. 24 saatlik uygulamada en fazla oranda tespit edilen anormallik tipi kromatid kırığı olmuştur. Bu anormalliğin yanı sıra kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve kromatid değişimi anormallikleri de tespit edilmiştir (Resim 4.1). Tek başına mantar ekstraktının uygulandığı grupta hücre başına düşen anormallik sayısında 2375 µg/ml'lik konsantrasyonda negatif kontrole göre anlamlı bir azalış ($p \square 0,05$) gözlenirken diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir. Ayrıca anormal hücre frekansında hiçbir konsantrasyonda negatif kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Hücre başına düşen anormallik sayısında ve anormal hücre frekansında konsantrasyona bağlı bir değişim vardır (sırasıyla r=0,627; 0,655). Mantar ve MMC'nin eş zamanlı uygulandığı grupta ise anormal hücre yüzdesinde pozitif kontrole göre anlamlı bir düşüş ($p \square 0,05$) yalnızca en düşük konsantrasyon olan 593,75 µg/ml'de gerçekleşmiştir (Şekil 4.2). Hücre başına düşen anormallik sayısında ise hiçbir konsantrasyonda anlamlı bir değişim söz konusu değildir. Anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısı ile konsantrasyonlar arasında zayıf bir ilişki vardır (sırasıyla r=0,457, r=0,558).

48 saatlik uygulama sonucunda oluşan kromozomal anormallikler, anormal hücre frekansı ve KA/hücre oranı Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. 48 saatlik uygulamada altı tip yapısal (kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid değişimi) ve bir tip sayısal (poliploidi) anormallik belirlenmiştir (Resim 4.1). En sık görülen anormallik kromatid kırığıdır.

Mantar ekstraktının tek başına uygulandığı grupta anormal hücre frekansında yalnızca en yüksek konsantrasyonda negatif kontrole göre anlamlı bir artış (p□0,05) oluşmuştur (Şekil 4.3). Hücre başına düşen anormallik sayısında ise en yüksek konsantrasyon olan 9500 µg/ml'de negatif kontrole göre anlamlı bir artış (p□0,05) gözlenirken, 1187,5 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlı bir azalış (p□0,05) tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Bu değişimlerin hiçbiri konsantrasyona bağlı değildir. Mantar ekstraktının MMC ile eş zamanlı 48 saat'lik uygulamasının anormal hücre frekansını 4750 µg/ml konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarda anlamlı oranda azalttığı tespit edilmiştir. Hücre başına düşen anormallik sayısında ise tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole göre önemli bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Bu değişimlerin konsantrasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *G.lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulanan (24 saatlik uygulama) insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen anormallik miktarı

| Test maddesi | Uygulama | | | Anormallikler | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Doz | | Ktk | Kzk | F | Kkb | Kd | Toplam | Anormal hücre ±SH(%) | KA/Hücre ±SH |
| | | MMC (µg/ml) | *G.lucidum* (µg/ml) | | | | | | | | |
| Kontrol | 24 | - | | 10 | 1 | 1 | 1 | - | 13 | 6,50±1,74 | 0,07±0,017 |
| MMC | 24 | 0,20 | | 19 | 2 | 2 | - | 1 | 24 | 12,00±2,30 | 0,12±0,023 |
| *G.lucidum* | 24 | - | 593,75 | 10 | - | 1 | 2 | - | 13 | 6,00±1,68 | 0,07±0,017 |
| | | - | 1187,50 | 11 | 1 | 1 | - | 1 | 14 | 7,00±1,80 | 0,07±0,018 |
| | | - | 2375,00 | 5 | 1 | - | - | - | 6 | 3,00±1,21 | 0,03±0,012[a] |
| | | - | 4750,00 | 10 | - | 1 | 2 | - | 13 | 6,50±1,74 | 0,07±0,017 |
| | | - | 9500,00 | 11 | - | - | - | - | 11 | 5,00±1,54 | 0,06±0,016 |
| MMC+*G.lucidum* | 24 | 0,20 | 593,75 | 10 | 2 | - | 1 | 1 | 14 | 5,50±1,61* | 0,07±0,018 |
| | | 0,20 | 1187,50 | 19 | 1 | 1 | - | 1 | 22 | 10,00±2,12 | 0,11±0,022 |
| | | 0,20 | 2375,00 | 14 | 2 | - | - | - | 16 | 7,00±1,80 | 0,08±0,019 |
| | | 0,20 | 4750,00 | 17 | 1 | - | - | - | 18 | 8,50±1,97 | 0,09±0,020 |
| | | 0,20 | 9500,00 | 16 | - | - | 2 | - | 18 | 8,50±1,97 | 0,09±0,020 |

Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, kromozom, Kd: kromozom değişimi,

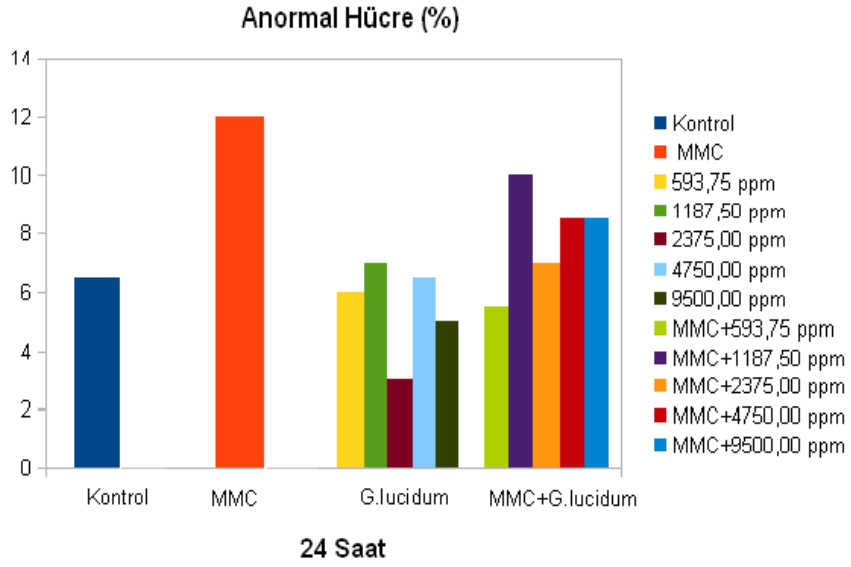
*Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
[a]Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

Çizelge 4.2. *Ganoderma lucidum* ve MMC+*Ganoderma lucidum* uygulanan (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen anormallik miktarı

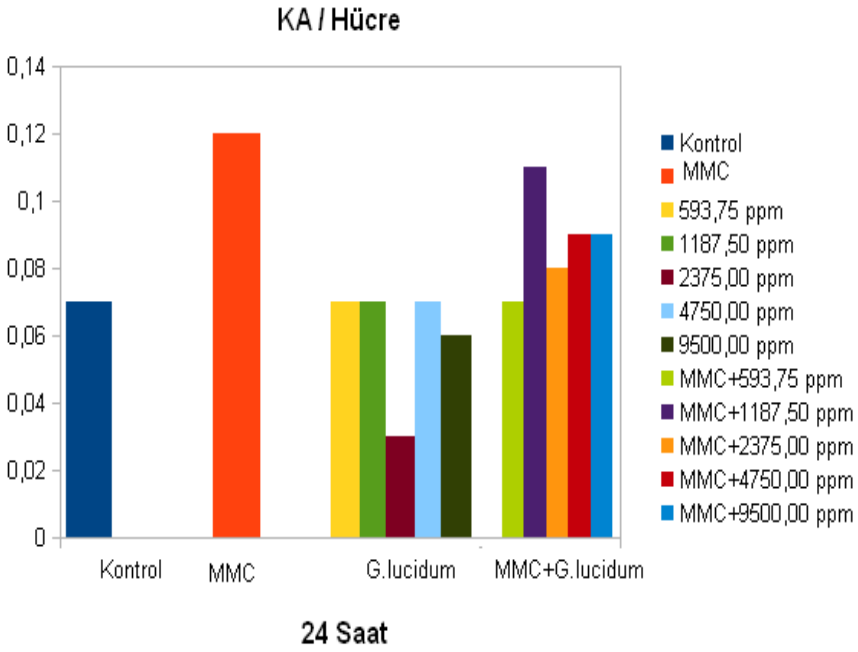
| Test maddesi | Uygulama | | | Anormallikler | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Doz | | Ktk | Kzk | F | Kkb | Dk | Kd | P | Toplam -P | Anormal-hücre-P ±SH(%) | KA/Hücre-P ±SH |
| | | MMC (µg/ml) | *G.lucidum* (µg/ml) | | | | | | | | | | |
| Kontrol | 48 | - | | 16 | - | 5 | 4 | - | - | - | 25 | 10,50±2,17 | 0,13±0,023 |
| MMC | 48 | 0,20 | | 52 | 25 | 6 | 2 | 3 | 15 | - | 103 | 36,00±3,39 | 0,52±0,035 |
| *G.lucidum* | 48 | - | 593,75 | 19 | - | 1 | 1 | - | - | 1 | 21 | 9,50±2,07 | 0,11±0,022 |
| | | - | 1187,50 | 11 | - | - | - | - | - | - | 11 | 5,50±1,61 | 0,06±0,017[a] |
| | | - | 2375,00 | 19 | 2 | 1 | 1 | - | - | - | 23 | 10,50±2,17 | 0,12±0,023 |
| | | - | 4750,00 | 9 | 2 | 4 | 6 | 3 | - | - | 24 | 10,50±2,17 | 0,12±0,023 |
| | | - | 9500,00 | 30 | 8 | 1 | 1 | 1 | - | - | 41 | 19,50±2,80[a] | 0,21±0,029[a] |
| MMC+*G.lucidum* | 48 | 0,20 | 593,75 | 32 | 5 | - | 1 | - | 1 | - | 39 | 17,00±2,66*** | 0,19±0,028*** |
| | | 0,20 | 1187,50 | 21 | 7 | 6 | - | 1 | 6 | - | 41 | 18,00±2,72*** | 0,21±0,029*** |
| | | 0,20 | 2375,00 | 39 | 8 | 2 | 5 | 1 | 3 | - | 58 | 23,00±2,98** | 0,29±0,032*** |
| | | 0,20 | 4750,00 | 45 | 16 | 2 | 5 | 2 | 2 | - | 72 | 28,00±3,18 | 0,36±0,034** |
| | | 0,20 | 9500,00 | 25 | 10 | 3 | 4 | 1 | 4 | - | 47 | 22,50±2,95** | 0,24±0,030*** |

Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Dk: Disentrik kromozom, Kd: kromozom değişimi, P: Poliploidi (Toplam anormallik miktarına Poliploidi eklenmemiştir)

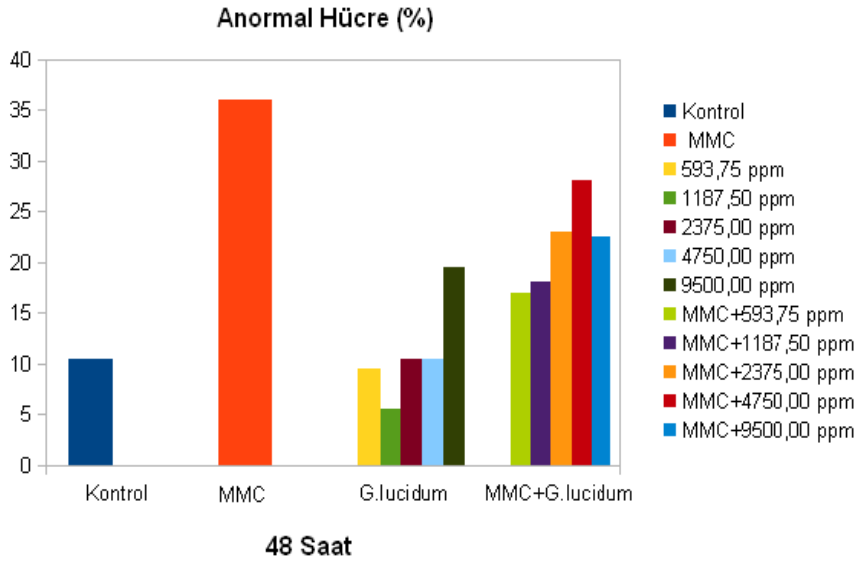
[a]Negatif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
** Pozitif kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)
***Pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



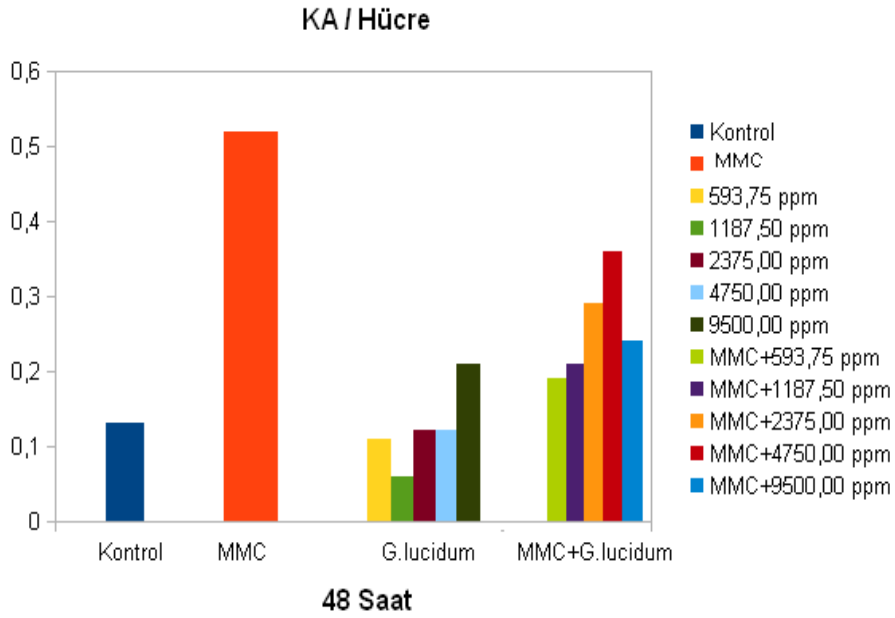

Şekil 4.1. *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum*'un (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu anormal hücre frekansı




Şekil 4.2. *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum*'un (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik miktarı



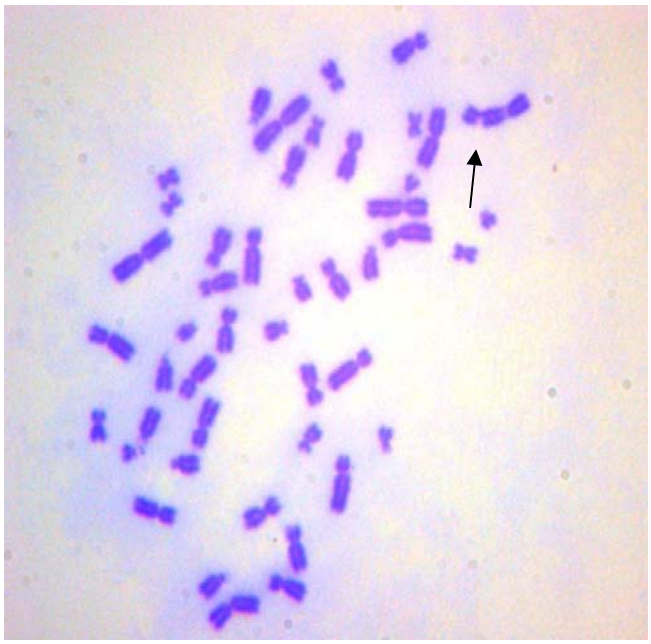

Şekil 4.3. *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum*'un (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu anormal hücre frekansı




Şekil 4.4. *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum*'un (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu hücre başına düşen anormallik miktarı



(a)

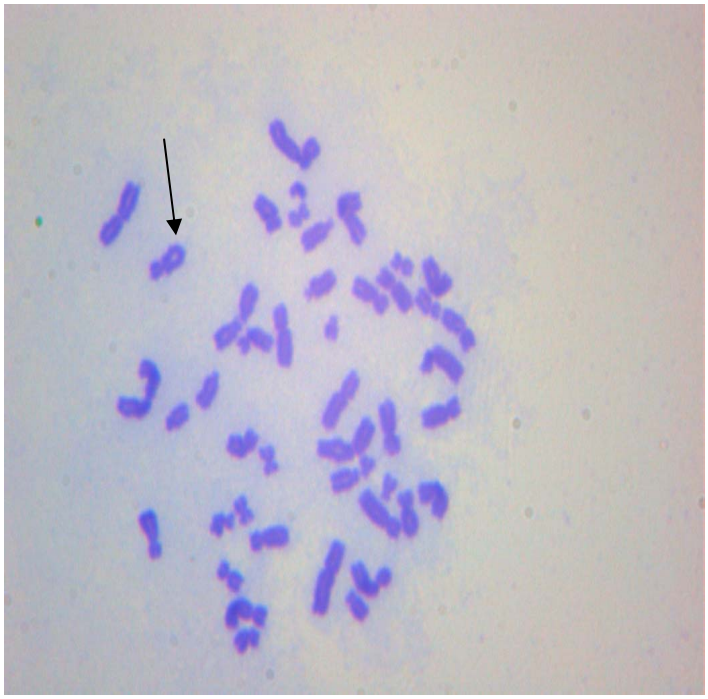


(b)

Resim 4.1. *G. lucidum* uygulanan insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri (a) kromozom kırığı (b) kromatid kırığı (c) fragment (d) kardeş kromatid birleşmesi (e) disentrik kromozom ve kromatid değişimi (f) poliploidi



(c)



(d)

Resim 4.1 (Devamı) *G. lucidum* uygulanan insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri (a) kromozom kırığı (b) kromatid kırığı (c) fragment (d) kardeş kromatid birleşmesi (e) disentrik kromozom ve kromatid değişimi (f) poliploidi



(e)



(f)

Resim 4.1 (Devamı) *G. lucidum* uygulanan insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri (a) kromozom kırığı (b) kromatid kırığı (c) fragment (d) kardeş kromatid birleşmesi (e) disentrik kromozom ve kromatid değişimi (f) poliploidi

## 4.2.Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI) sonuçları

*G.lucidum*'un tek başına ve MMC ile eş zamanlı 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamasının insan periferal lenfositlerinde Kardeş kromatid değişimi (KKD), Replikasyon indeksi (RI) ve Mitotik indeks (MI) üzerine etkisi Çizelge 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir. Mantar ekstraktının tek başına 24 saatlik uygulamasında 2-20 arasında KKD oluşumu belirlenmiştir (Resim 4.2). Tüm konsantrasyonlarda KKD frekansında negatif kontrole göre bir artış gözlenirken bu artış yalnızca en yüksek konsantrasyonda (9500 µg/ml) anlamlı düzeydedir (p□0,05) (Şekil 4.5 a) konsantrasyona bağlı zayıf bir değişim vardır (r=0,483). Bu grupta replikasyon indeksi ve mitotik indeks değerleri negatif kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.5 b). Mantar ekstraktı ve MMC'nin eş zamanlı 24 saatlik uygulamasında KKD değeri 10-50 olup, KKD/hücre değerinde ve replikasyon indeksinde hiçbir konsantrasyonda pozitif kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.5 a). Bununla birlikte 2375 ve 593,75 µg/ml konsantrasyonları pozitif kontrolle kıyaslandığında mitotik indeks değerlerinde anlamlı bir artış oluşturmuşlardır (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,001$) (Şekil 4.5 b). Mitotik indeks değerleri konsantrasyona bağlı değişim göstermiştir (r=0,813).

48 saat uygulamada KKD/hücre değerinde mantar ekstraktının tek başına uygulandığı grupta negatif kontrolle kıyaslandığında her konsantrasyonda artış gözlenmiştir. Bu artışlar 593,75, 2375 ve 9500 µg/ml konsantrasyonlarında istatiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.6 a). KKD değerleri 2-25 arasında değişmektedir ve konsantrasyona bağlı bir değişim de belirlenmiştir (r=0,577). RI ve MI değerlerinde negatif kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir değişim oluşmamıştır. KKD frekansında Mantar ekstraktı ve MMC'nin uygulandığı grupta pozitif kontrolle kıyaslandığında en yüksek üç konsantrasyonda anlamlı ve konsantrasyona bağlı (r=0,793) bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,05$). En az 17, en fazla ise 131 KKD gözlemiştir. RI değerleri anlamlı bir değişim göstermemiştir. Mitotik indeks

değerlerinde en yüksek iki konsantrasyon (9500 ve 4750 µg/ml) pozitif kontrolle kıyaslandığında anlamlı ve konsantrasyona bağlı bir artışa neden olmuştur (r=0,56). Mitotik indekste görülen değişimler Şekil 4.6 b'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. *G.lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulamasının (24 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi

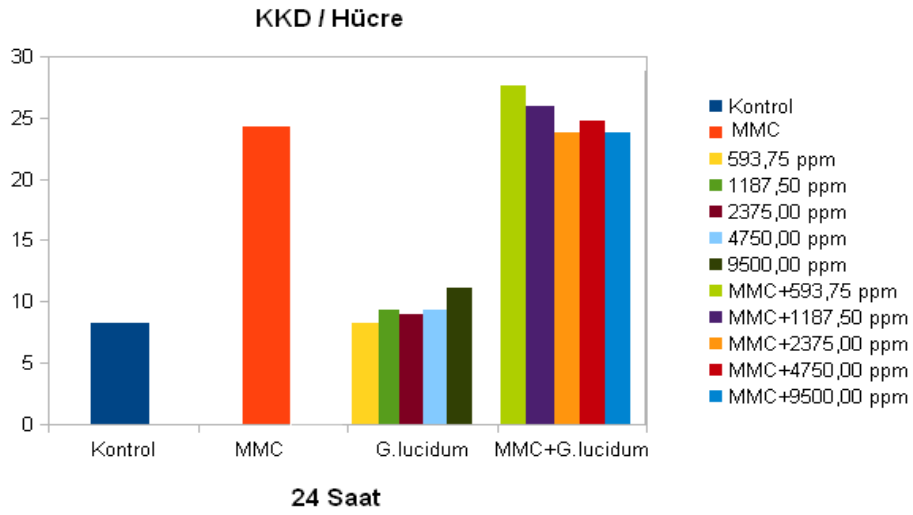
| Test maddesi | Uygulama | | | Min-max KKD | KKD/hücre± SH | $M_1$ | $M_2$ | $M_3$ | RI±SH | MI±SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Doz | | | | | | | | |
| | | MMC (µg/ml) | *G.lucidum* (µg/ml) | | | | | | | |
| Kontrol | 24 | - | - | 3-16 | 8,18±0,42 | 27 | 58 | 115 | 2,44±0,05 | 6,70±0,56 |
| MMC | 24 | 0,20 | - | 10-48 | 25,04±1,29 | 39 | 60 | 101 | 2,31±0,06 | 4,60±0,47 |
| *G.lucidum* | 24 | - | 593,75 | 3-13 | 8,26±0,37 | 34 | 38 | 128 | 2,47±0,05 | 7,50±0,59 |
| | | - | 1187,50 | 4-18 | 9,26±0,51 | 23 | 40 | 137 | 2,57±0,05 | 7,40±0,59 |
| | | - | 2375,00 | 3-20 | 8,98±0,56 | 35 | 62 | 103 | 2,34±0,05 | 6,40±0,55 |
| | | - | 4750,00 | 5-16 | 9,30±0,37 | 38 | 36 | 126 | 2,44±0,06 | 7,50±0,59 |
| | | | 9500,00 | 2-20 | 11,06±0,56[a] | 62 | 102 | 36 | 1,87±0,05 | 6,40±0,55 |
| MMC+*G.lucidum* | 24 | 0,20 | 593,75 | 10-44 | 27,56±1,07 | 70 | 64 | 66 | 1,98±0,06 | 7,30±0,58*** |
| | | 0,20 | 1187,50 | 14-42 | 25,98±1,02 | 36 | 49 | 115 | 2,40±0,06 | 5,50±0,51 |
| | | 0,20 | 2375,00 | 12-38 | 23,80±0,98 | 43 | 57 | 100 | 2,29±0,06 | 6,45±0,55* |
| | | 0,20 | 4750,00 | 11-50 | 24,78±1,08 | 55 | 66 | 79 | 2,12±0,06 | 4,30±0,45 |
| | | 0,20 | 9500,00 | 12-46 | 23,80±0,88 | 59 | 71 | 70 | 2,06±0,06 | 5,35±0,50 |

[a]Negatif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)
*Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)
***Pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

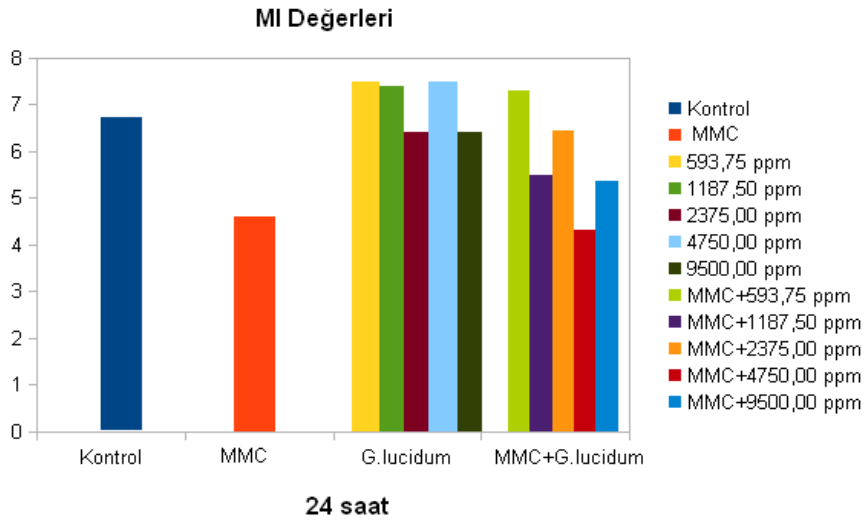
Çizelge 4.4. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum* uygulamasının (48 saat uygulama) insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkisi

| Test maddesi | Uygulama | | | Min-max KKD | KKD/hücre± SH | $M_1$ | $M_2$ | $M_3$ | RI±SH | MI±SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Doz | | | | | | | | |
| | | MMC (µg/ml) | *G.lucidum* (µg/ml) | | | | | | | |
| Kontrol | 48 | - | - | 2-19 | 6,92±0,45 | 21 | 46 | 133 | 2,56±0,05 | 7,15±0,58 |
| MMC | 48 | 0,20 | - | 28-127 | 66,44±3,81 | 58 | 93 | 49 | 1,96±0,05 | 4,40±0,46 |
| *G.lucidum* | 48 | - | 593,75 | 4-21 | 10,38±0,60[a] | 31 | 67 | 102 | 2,36±0,05 | 7,30±0,58 |
| | | - | 1187,50 | 2-17 | 7,46±0,47 | 13 | 45 | 142 | 2,65±0,04 | 7,25±0,58 |
| | | - | 2375,00 | 3-20 | 8,84±0,51[a] | 25 | 52 | 123 | 2,49±0,05 | 7,05±0,57 |
| | | - | 4750,00 | 3-15 | 7,88±0,38 | 25 | 47 | 128 | 2,52±0,05 | 6,85±0,57 |
| | | - | 9500,00 | 4-25 | 10,88±0,76[a] | 40 | 84 | 76 | 2,18±0,05 | 6,00±0,53 |
| MMC+*G.lucidum* | 48 | 0,20 | 593,75 | 19-114 | 56,54±2,97 | 47 | 93 | 60 | 2,07±0,05 | 5,75±0,52 |
| | | 0,20 | 1187,50 | 17-131 | 66,88±4,86 | 79 | 93 | 28 | 1,76±0,05 | 5,10±0,49 |
| | | 0,20 | 2375,00 | 22-102 | 49,94±2,36* | 80 | 79 | 41 | 1,81±0,05 | 5,40±0,51 |
| | | 0,20 | 4750,00 | 27-88 | 51,42±2,27* | 83 | 96 | 21 | 1,69±0,05 | 6,15±0,54˚ |
| | | 0,20 | 9500,00 | 28-75 | 45,68±1,62* | 56 | 88 | 56 | 2,00±0,05 | 6,15±0,54˚ |

[a]Negatif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)
* Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)
˚Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

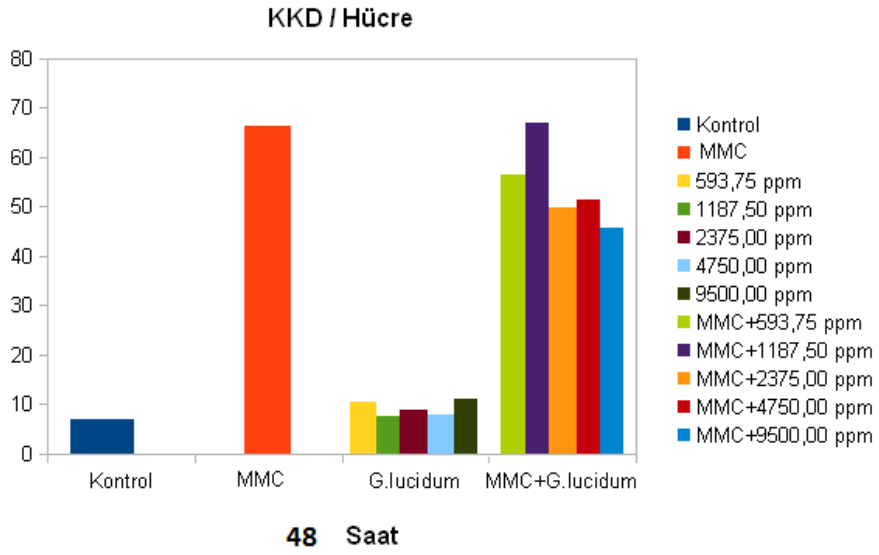



(a)

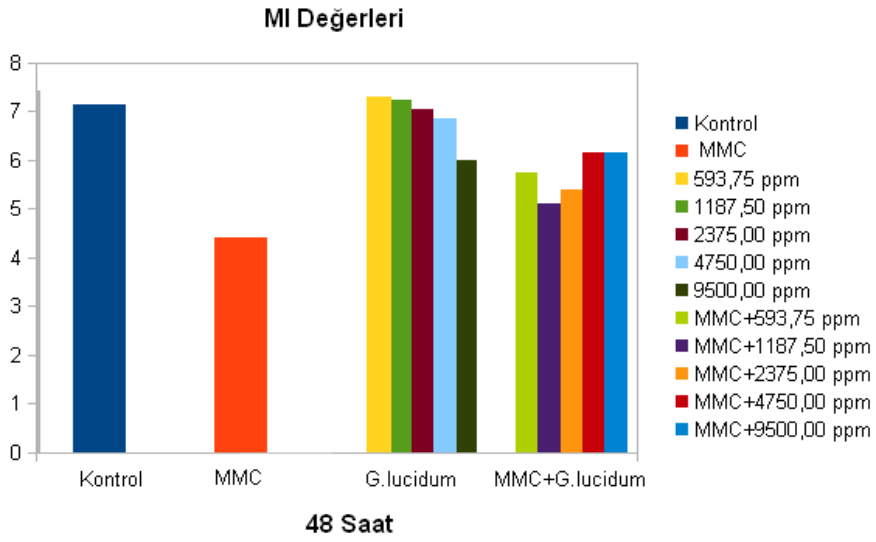



(b)

Şekil 4.5. *G. lucidum* ve MMC+G. lucidum'un (24 saatlik uygulama) insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen KKD miktarı (a) MI değerleri (b) üzerine etkisi

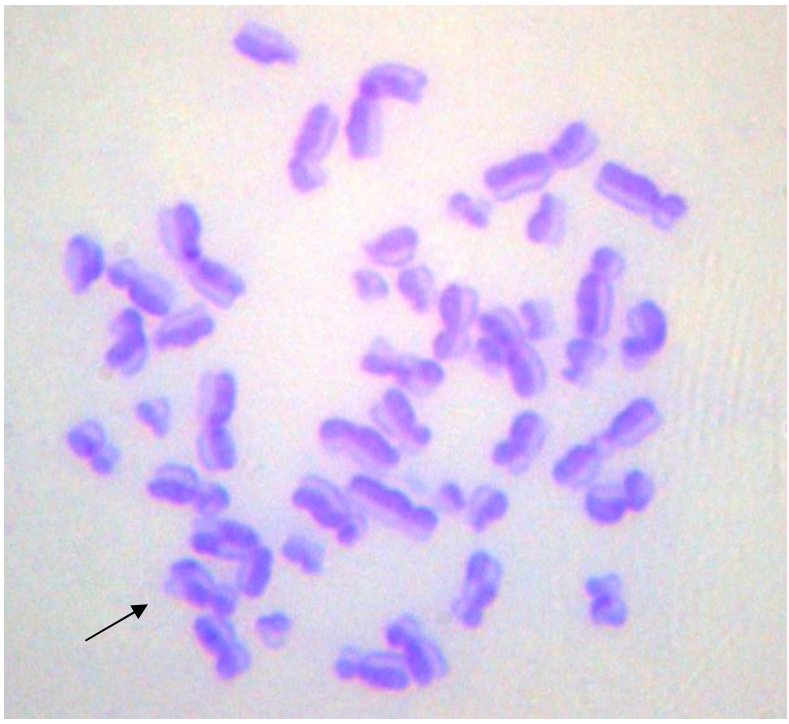



(a)




(b)

Şekil 4.6. *G. lucidum* ve MMC+*G. lucidum*'un (48 saatlik uygulama) insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen KKD miktarı (a) MI değerleri (b) üzerine etkisi



Resim 4.2. *G.lucidum* ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimleri

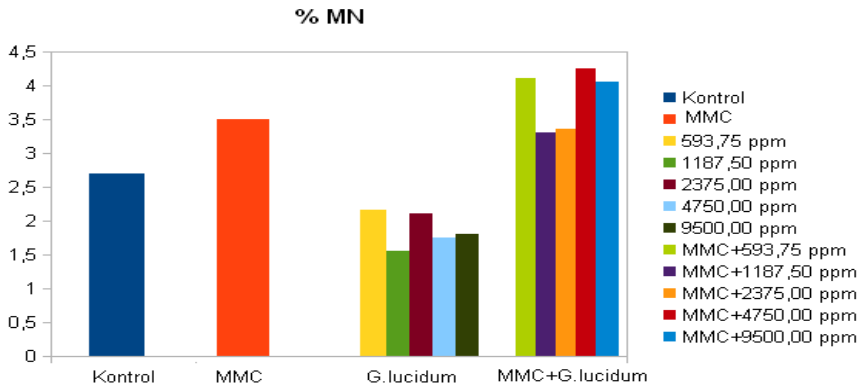
### 4.3. Mikronükleus testi sonuçları

*Ganoderma lucidum* mantarının mikronükleus frekansı üzerine etkileri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Değerlendirilen binükleatlarda 1'li, 2'li, 3'lü ve 3'den fazla sayıda mikronükleus tespit edilmiştir (Resim 4.3). Mantar ekstraktının genotoksik etkilerinin araştırıldığı grupta negatif kontrole göre tüm konsantrasyonlarda mikronükleus frekansında düşüş gözlenmiştir. Ancak bu düşüş 9500, 4750 ve 1187,5 µg/ml konsantrasyonlar da anlamlı düzeydedir ($p<0,05$) (Şekil 4.7). Mantar ekstraktının antigenotoksik etkilerinin araştırıldığı grupta ise pozitif kontrolle kıyaslandığında hiçbir konsantrasyonda anlamlı bir değişim oluşmamıştır. Gerek mantar ekstraktının genotoksik etkilerinin araştırıldığı grupta gerekse de antigenotoksik etkilerinin araştırıldığı grupta zayıf olmakla birlikte konsantrasyona bağlı bir değişim vardır (r değerleri sırasıyla 0,695; 0,577). Aynı zamanda mantarın genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırıldığı her iki grupta da nükleer bölünme indeksinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

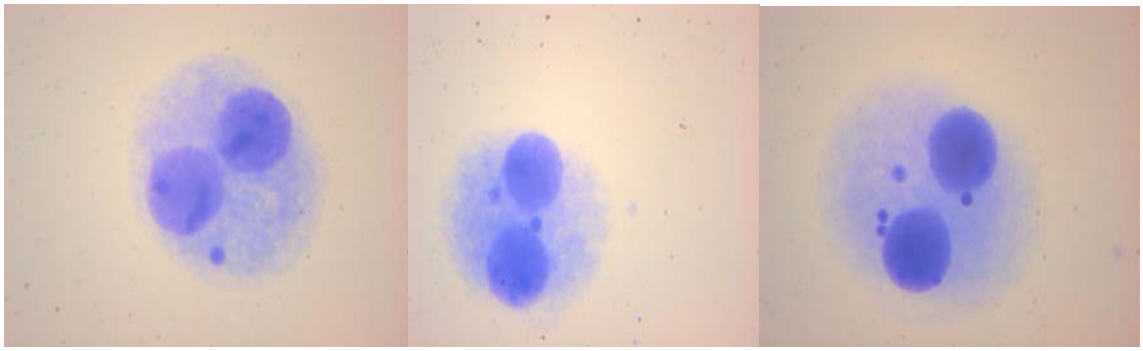
Çizelge 4.5 *G. lucidum* ve MMC+*G.lucidum* mantar ekstraktı uygulanan insan periferal lenfositlerinde mikronükleus ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri

| Test maddesi | Uygulama | | | BN Hücre Sayısı | MN'un sayısına göre BN hücrelerinin tanımlanması | | | | % MN | Nükleer Bölünme İndeksi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Süre (Saat) | Doz | | | (1) | (2) | (3) | (4) | | |
| | | MMC (µg/ml) | *G.lucidum* (µg/ml) | | | | | | | |
| Kontrol | 48 | - | - | 2000 | 44 | 1 | - | 2 | 2,70±0,36 | 1,51±0,39 |
| MMC | 48 | 0,20 | - | 2000 | 68 | 1 | - | - | 3,50±0,41 | 1,23±0,35 |
| *G.lucidum* | 48 | - | 593,75 | 2000 | 39 | 2 | - | - | 2,15±0,32 | 1,38±0,37 |
| | | - | 1187,50 | 2000 | 23 | 2 | - | 1 | 1,55±0,28[a] | 1,52±0,39 |
| | | - | 2375,00 | 2000 | 32 | 2 | 2 | - | 2,10±0,32 | 1,54±0,39 |
| | | - | 4750,00 | 2000 | 27 | - | - | 2 | 1,75±0,29[a] | 1,53±0,39 |
| | | - | 9500,00 | 2000 | 28 | 2 | - | 1 | 1,80±0,30[a] | 1,47±0,38 |
| MMC+*G.lucidum* | 48 | 0,20 | 593,75 | 2000 | 67 | 4 | 1 | 1 | 4,10±0,44 | 1,36±0,37 |
| | | 0,20 | 1187,50 | 2000 | 60 | 3 | - | - | 3,30±0,40 | 1,28±0,36 |
| | | 0,20 | 2375,00 | 2000 | 59 | 2 | - | 1 | 3.35±0,40 | 1,24±0,35 |
| | | 0,20 | 4750,00 | 2000 | 79 | 3 | - | - | 4,25±0,45 | 1,26±0,35 |
| | | 0,20 | 9500,00 | 2000 | 69 | 4 | - | 1 | 4,05±0,44 | 1,31±0,36 |

[a]Negatif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)




Şekil 4.7 *G.lucidum* ve MMC+*G.lucidum*'un insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu mikronükleus frekansı



(a) (b) (c)

Resim 4.3.*G.lucidum* uygulanan insan periferal lenfositlerinde mikronükleusa sahip binükleat hücreler a)bir nükleuslu binükleat b)iki mikronükleuslu binükleat c) dört mikronükleuslu binükleat hücre

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılımı olarak karakterize edilen kanser hastalığı dünyanın birçok yerinde önemli bir sağlık sorunudur [Pezzuto ve ark., 2005]. Kanser nedeniyle dünyada her yıl yaklaşık 8 milyon insan ölmekte ve bu rakamın 2030'da 12 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [Jemal ve ark., 2008]. Mevcut eğilimler devam ederse her 4 erkekden biri ve her 5 kadından da biri kanser nedeniyle hayatını kaybedecektir [Guilford ve Pezzuto, 2008]. Kanser tedavisinde ön aşamalarda kanserin belirlenmesi tedavinin başarısı ve hastanın hayatta kalması açısından son derece önemlidir [Luqman ve Pezzuto, 2010]. Kemoprevasyon da ümit verici bir antikanser yaklaşım olarak görülmektedir. Kemoprevasyon karsinogenez sürecini erteleyerek kanser hastalığını ve oluşan ölümleri azaltmaktadır [Nobili ve ark., 2009].

Doğal ürünler yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Doğal ürünlerden elde edilen ilaçların kaynakları bitkiler, mantarlar, mikroorganizmalar ve hayvanlar olabilmektedir. Biyolojik olarak aktif olan bu doğal maddeler çok fazla yapısal ve kimyasal çeşitliliğe sahiptirler [Mahajna ve ark., 2008].

Dünya üzerindeki fungus sayısının 500 bin ile 10 milyon tür arasında olduğu tahmin edilmektedir. Ancak günümüzde tanımlanmış 100 000 fungus türü bulunmaktadır (bu sayının içerisinde cıvık mantarlar, mayalar, liken formundaki mantarlar vs. de bulunmaktadır) [Kirk ve ak., 2008; Wasser 2011]. Basidiomycetes mantarları barındırdıkları aktif bileşenler yüzünden oldukça fazla ilgi toplamaktadırlar. Mantarların meyveleri, miselyumları biyolojik aktiviteleri yönünden araştırılmaktadır. Yüksek Basidiomycetes'lerin yaklaşık 650 türünün antitümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [Wasser, 2002; Mahajna ve ark., 2008].

Fungal metabolitlerin belirli kanserlerde kötü huylu hücrelerin moleküler hedeflerini durdurucu etkilere sahip olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fungal antikanser özellikli bileşenleri düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı moleküller olmak üzere 2 gruba

ayırabiliriz. Bu iki grup arasındaki temel fark etki mekanizmalarıdır [Mahajna ve ark., 2008]. Yüksek moleküler ağırlığa sahip bileşenlerin çoğunu polisakkaritler ve protein bağlı polisakkaritler oluşturmaktadır [Kidd, 2000]. Bu bileşenler immün sistemle ilişkiye geçmeye ve konakçı cevabı uyarmaya uygundurlar [Lull ve ark., 2005]. Düşük moleküler ağırlığa sahip 2. grup ise hücre membranını geçerek sinyal iletim yollarına etki ederler [Zaidman, 2005]. Bu bileşenlere sesquiterpenler (Basidiomyceteslerin baskın ikincil metabolitleridir), triterpenler, steroidler, steroller örnek olarak verilebilir [Mahijna ve ark., 2008]. Ayrıca mantarlar eser elementlerin de zengin kaynaklarıdırlar [Zaidman ve ark., 2005].

Yüksek moleküler ağırlığa sahip olan bileşiklerden olan polisakkaritler mantarların en iyi bilinen ve en fazla antitümör ve immünomodülatör etkilere sahip bileşenleridir [Patel, 2012]. İkincil metabolitler çeşitli mantarlarda bulunan terapötik etkilere sahip bir diğer önemli bileşen grubudur. Bu bileşenlerin çoğu 5 ana metabolik kaynağa göre sınıflandırılabilirler: aminoasit-türevleri yolu, aromatik aminoasitlerin biyosentezi için shikimik asit yolu, asetil koenzim A'dan asetat-melonat yolu, asetil koenzim-A'dan mevalonik asit yolu, polisakkaritler ve peptidopolisakkaritler. Bunlardan mevalonik asit yolu, diğer yollardan daha fazla çeşitlilikte bileşen üretebilirler [Zaidman ve ark., 2005; Mahajna ve ark., 2008]. Mantarlar ayrıca az bulunan minerallerin, aminoasitlerin ve iz elementlerin zengin kaynaklarıdırlar. Bu elementlere pek çok biyokimyasal süreç için gerekli olan bakır, çinko, selenyum, demir ve molibden örnek olarak verilebilir. Pek çok mantar türü bitkilerden çok daha fazla miktarda iz element biriktirebilir. Günümüze kadar 40 tane trans element literatürde bildirilmiştir [Zaidman ve ark., 2005].

Kanserle mücadele tıbbın ve immünolojinin en önemli araştırma alanlarındandır. Kanser hücrelerinin değişime uğrama ve mevcut ilaçlara karşı dirençli hale gelme özelliğinden dolayı karsinogenezisin moleküler mekanizmaları üzerine yoğunlaşan yeni bilimsel yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Kanser tedavisinde, geleneksel kemoterapide doğal biyoaktif bileşenlerin yardımcı olarak kullanımı gibi yeni bir yönelim ortaya çıkmıştır. Bu tarz araştırma konuları giderek daha fazla ilgi toplamaktadır [Petrova ve ark., 2008].

Yaptığımız çalışmada *Ganoderma lucidum*'un tek başına ve MMC ile eşzamanlı insan periferal lenfositlerine uygulanması sonucunda kromozomlarda meydana gelen hasar kromozomal aberasyon (KA) testi, kardeş kromatid değişim testi (KKD) ve mikronükleus testi (MN) ile belirlenmiştir. Çalışmamızda *Ganoderma lucidum*'un %30'luk sulu ekstraktı kullanılmıştır. Uygulamalar KA ve KKD testi için 24 ve 48 saatlik süreyle MN testi için ise 48 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

İnsan periferal lenfositlerinde artan kromozomal aberasyon sıklığı kanserin öngörücüsüdür. Kromozomal aberasyonlar 20-30 yıldır çevresel ve iş kaynaklı maruz kalınan genotoksik karsinojenlerin belirlenmesinde bir araç olarak kullanılmaktadır [Rossner ve ark., 2005]. Kimyasal maddeler ve iyonize radyasyon DNA'da çift iplik kırıklarına sebep olmakta ve şayet bu hasarlar tamir edilmezse kromozom hasarları şeklinde görülmektedirler [Obe ve ark, 2002]. Hücrelerde meydana gelen kromozomal aberasyonlar yüksek miktarda ise hücre yaşamına devam edememekte ve hızlı bir şekilde apoptozis sürecine girmektedir. Kromozomlarda meydana gelen hasar daha düşük miktarda ise hücreler yaşamlarına devam etmekte ancak sonraki jenerasyonda olası mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu da daha sonraki süreçlerde tümör oluşumuna neden olmaktadır. Bu test çok fazla zaman ve emek yoğunluğu gerektirmesine rağmen kimyasalların mutajenitesinin, klastojenitesinin ve potansiyel kanserojenitesinin belirlenmesinde oldukça hassas bir testtir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Kardeş kromatid değişimi (KKD), DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin kırılıp tekrar birbiri yerine geçmesiyle gerçekleşen bir süreçtir. Bu sürecin korunumlu ve hatasız olarak gerçekleştiği düşünülmekteydi. Ancak KKD'nin belirlenmesindeki tekniklerin gelişimi ile birlikte aslında bu olayın olası mutajenlerin ve genotoksinlerin belirlenmesinde genetik bir belirleyici olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur [Wilson III ve Thompson, 2007]. Mikronükleus testi ise muamele yapılan hücrelerdeki mikronükleus sayısının belirlenmesine dayanan bir testtir. Mikronükleuslar (MN) hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozoma ait bir parçanın ya da tüm bir kromozomun geride kalmasıyla oluşmaktadırlar. Hücrelere sitokalasin-B ilave edilmesiyle hücrelerin sitokinezi bloke edilmekte ve hücreler binükleat şeklinde görülmektedirler. Sitokalasin-B ilavesi bölünen

hücrelerle (bu hücreler yapılarında MN bulundurabilirler) bölünmeyen hücreleri birbirinden en doğru bir şekilde ayırmamızı sağlamaktadır. MN testi, kromozom kırıklarının, tamir edilemeyen DNA hasarlarının, kromozom kayıplarının, ayrılmamanın, nekrozun, apoptozisin, hücre gelişiminin durdurulmasının belirlenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır [Ng ve ark., 2010].

Çalışmamızda *Ganoderma lucidum*'un %30'luk sulu ekstraktı kullanılmıştır. Mantarla yapılan farklı çalışmalarda hem sulu ekstratlar hemde organik ekstratlar kullanılmıştır. Bellini ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada tıbbi kulanıma sahip bir mantar olan *Agaricus blazei*'nin metanolik, hekzanik ve n-bütanolik olmak üzere üç farklı organik ekstratı ve sulu ekstratı çalışılmıştır. Bu çalışmada CHO-k1 hücre hattı kullanılmıştır. Kromozomal aberasyon testi ile genotoksik etkileri belirlenmiştir. Kromozomal aberasyon testinde pozitif kontrolle kıyaslandığında en fazla düşüşe sulu ekstraktın neden olduğu ortaya konulmuştur [Bellini ve ark., 2006]. Jumes ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada *Agaricus brasiliensis* mantarının meyvelerinden elde edilen tozlar ve sulu, asidli, alkalin ekstraktlar olmak üzere üç farklı ekstrat tümör taşıyan ratlara uygulamıştır. Tümöre bağlı beden zayıflığı bulunan bu ratlar sonda ile 14 gün boyunca (136 mg/kg) beslenmiştir. Çalışma sonunda mantarın dört farklı uygulamasının da (meyvenin toz şeklinde, sulu, asid ve alkalin ekstratları şeklinde verilmesi) tümör boyutunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca mantar ratlarda kilo alınımını da sağlamıştır [Jumes ve ark., 2010]. Guterrez ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Agaricus blazei* Murill mantarının meyvelerine dehidrasyon işlemi uygulanmış ve meyveler öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bu mantar tozu (1,25 g) distile suda çözülerek (50 ml) sulu solüsyon hazırlanmıştır. Bu sulu solüsyon 4, 25 ve 60 ˚C'de sırasıyla 1 saat, 2 saat ve 15 dk bekletilmiştir. Mantarın genotoksisitesi mikronükleus ve comet testi ile belirlenmiştir. Her iki test içinde mantarın sulu ekstratının herhangi bir genotoksik etkisi saptanmamıştır [Guterrez ve ark., 2004].

Çalışmamızda antitümör ajan olan mitomisin C kullanılmıştır. Antitümör antibiyotik olan mitomisin C (MMC) 1950'li yıllarda Japon mikrobiyologlar tarafından *Streptomyces*

*caespitosus* mikroorganizmalarının fermantasyon kültürlerinde keşfedilmiştir. Yakın yapısal varyantta olan mitomisinler izole edilmektedir. Mitomisin C memeli hücrelerinde çeşitli spesifik biyolojik etkilere sahiptir. DNA sentezini seçici olarak inhibe etme, mutagenez, genetik rekombinasyonun düzenlenmesi, kromozom kırıkları ve kardeş kromatid değişimleri ve bakterilerde DNA tamir tepkisi indüksiyonu bu etkilere örnek olarak verilebilir. Bu nedenle yaygın olarak bu tür olayları incelemek için bir araç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca MMC önemli bir antitümör ilaç olarak geniş bir klinik kullanıma sahiptir [Tomasz, 1995].

Kromozomal anormallik testinde *G. lucidum* mantarının genotoksik özelliklerinin incelendiği deney sonuçlarına göre mantar ekstraktı 24 saatlik uygulamada kromozomal hasara neden olmamıştır. 48 saatlik uygulamada ise yalnızca 9500 μg/ml'lik konsantrasyonda kromozomal anormallik oranı anlamlı düzeyde artmıştır. Bu nedenle *G.lucidum* klastojenik etki göstermemiştir.

*G. lucidum* ile MMC'nin eş zamanlı 24 saatlik uygulamasında en düşük konsantrasyon (593,75 μg/ml) MMC'nin oluşturduğu kromozomal anormallik oranını anlamlı düzeyde azaltmıştır. *G. lucidum* ve MMC'nin eş zamanlı 48 saatlik uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar (4750 μg/ml hariç) kromozomal anormallik oranını anlamlı ölçüde azaltmıştır. Mantar ekstraktı KA testinde MMC'nin oluşturduğu hasarı düzelten bir etki göstermiştir. Dolayısıyla antigenotoksik özellik sergilemiştir.

Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi sonuçlarına göre, 24 saatlik uygulamada *G. lucidum* en yüksek konsantrasyonda (9500 μg/ml) KKD oranının anlamlı artışına neden olmuştur. 48 saatlik uygulamada ise mantar ekstraktı 593,75; 2375 ve 9500 μg/ml'lik konsantrasyonlarda KKD frekansını önemli ölçüde artırmıştır. MMC ile eş zamanlı uygulamada ise, 24 saatlik uygulamada anlamlı bir fark gözlenmezken 48 saatlik uygulamada en yüksek üç konsantrasyonda (2375, 4750, 9500 μg/ml) KKD oranı önemli ölçüde azalmıştır. MMC tarafından oluşturulan kardeş kromatid değişimlerinin düzeltilmesinde yüksek konsantrasyonların daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak

mantarın yüksek konsantrasyonlarının da KKD oranını artırdığı belirlenmiştir.

Çalışmada *G. lucidum*'un mitotik indeks üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu mantarın tek başına uygulanan hiçbir konsantrasyonu 24 ve 48 saatlik muamelelerde mitotik indeksi etkilememiştir. Bununla birlikte *G. lucidum* ve MMC'nin eş zamanlı uygulamalarında 24 saatlik muamelede 593,75 ve 2375 µg/ml'lik konsantrasyonlar mitotik indeksi pozitif kontrole göre önemli düzeyde artırmışlardır. 48 saatlik uygulamada ise en yüksek iki konsantrasyon (4750 ve 9500 µg/ml) mitotik indeksi anlamlı oranda artırmıştır. Bu nedenle *G. lucidum*'un mitozu teşvik edebileceği düşünülmektedir. Kino ve arkadaşlarının1989 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *G.lucidum*'un miselyumundan izole edilen Ling-Zhi-8 proteininin in vitro koşullarda mitojenik (mitozu uyarıcı) etki gösterdiği belirlenmiştir [Kino ve ark., 1989]. Mitotik indeks sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir. Dolayısıyla *in vitro* insan lenfosit kültüründe *G. lucidum*'un sitotoksik etkiye değil mitojenik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. *G. lucidum*'un pek çok kanser hücre hattı ile yapılan çalışmalarda sitotoksik etkiye sahip olduğu açıklanmıştır [Min ve ark., 2000; Liu ve Zhang, 2005]. Ancak sitotoksik etkiyi yalnızca tümör hücrelerine karşıseçici olarak gerçekleştiriyor olabilir.

*G. lucidum*'un tek başına ve MMC ile eş zamanlı uygulamalarının hiçbirinde replikasyon indeksinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Replikasyon indeksi hücre poliferasyon kinetiğinin ölçümünde kullanılmaktadır. *G. lucidum* her ne kadar MMC tarafından düşürülen RI değerlerini, bir miktar yükseltse de bu istatiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu nedenle uygulanan konsantrasyonların insan lenfositlerinde hücre çoğalması ve poliferasyonu üzerinde etkili olmadıkları belirlenmiştir.

Mikronükleus testi sonuçlarına göre, *G. lucidum* üç konsantrasyonda (1187,50; 4750 ve 9500 µg/ml) kontrole göre MN frekansını anlamlı oranda azaltmıştır. *G. lucidum* ve MMC'nin eş zamanlı uygulamasında ise MMC tarafından artırılan MN oranını *G. lucidum* anlamlı düzeyde azaltmamıştır. Başka bir ifade ile *G. lucidum* antigenotoksik etki göstermemiştir. Benzer şekilde Nükleer bölünme indeksinde her iki uygulama şeklinde de

anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Tüm sonuçlar özetlendiğinde, *G. lucidum*'un insan lenfosit kültüründe anojenik etkilere sahip olmadığı, kromozomal hasarı ve DNA hasarını düzeltici etkiler gösterebileceği söylenebilir. Aynı zamanda bu mantar *in vitro* koşullarda mitojenik etki gösterebilmektedir. Başka çalışmalarda da *in vitro* koşullarda mitojenik etki gösterdiği açıklanmıştır [Shi ve ark., 2002; Chen ve ark., 2009].

*G. lucidum* ile insan lenfosit kültüründe yapılmış kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testi çalışmalarına rastlanmamıştır. Ancak bu mantar ile farklı test sistemlerinde yapılmış birkaç genotoksisite-antigenotoksisite çalışması mevcuttur.

Zhou ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada farelerde $^{60}$Co gama ışınlamasının meydana getirdiği hasara karşı *G. lucidum* polisakkaritlerinin (GLP) koruyucu etkisini incelemişlerdir. Fareler günde 0,67; 1,33 ve 2,00 g/kg dozlarda *G. lucidum* sporlarından elde edilen tozların sulu solüsyonlarıyla intragastrik olarak beslenmişlerdir. Comet testi kullanılarak GLP uygulamasının $^{60}$Co gama ışınlarının DNA'da oluşturduğu hasarı azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi gerçekleştirilmiştir. Mikronükleus frekansı GLP uygulanan grupta pozitif kontrole göre anlamlı oranda azalmıştır. Çalışmanın sonunda GLP'nin güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu vurgulanmıştır [Zhou ve ark., 2012].

Fare dalak lenfositlerinde *in vitro* koşullarda *G. lucidum*'dan izole edilen total triterpenlerin koruyucu etkileri incelenmiştir. Total triterpenlerin farklı konsantrasyonları (10, 25, 50, 100, 200 μg/ml) kullanılarak MTT testi gerçekleştirilmiş ve bu triterpenlerin dalak lenfositlerine sitotoksik etki göstermediği açıklanmıştır. Aynı çalışmada fare splenositleri triterpenlerin üç farklı konsantrasyonu ile 30 dk inkübe edilmiş ve ardından 2 Gy γ-radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Yapılan comet testi sonuçlarına göre, ışınlama DNA hasarını artırırken, triterpen uygulaması etkili bir şekilde DNA hasarını azaltmıştır.

Çalışmada ayrıca fare dalak lenfositleri 25 ve 100 μg/ml konsantrasyondaki triterpenlerle 4 saat inkübe edilmiş ve ardından 2 Gy γ-ışımasına maruz bırakılmıştır. Triterpen uygulamasının apoptotik hücre oranında önemli azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise bu triterpenlerin ROS miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Triterpenlerin tek başına uygulaması ROS seviyesinde azalmaya neden olmuş ve en fazla azalmanın 100 ve 200 μg/ml'lik konsantrasyonlarda ortaya çıktığı açıklanmıştır. Tüm sonuçların *G. lucidum*'un radyasyonun zararlı etkilerine karşı koruyucu etki gösterdiği açıklanmıştır [Smina ve ark., 2011].

*G. lucidum*'un kanser hücre hatlarında yapılmış çeşitli çalışmaları bulunmaktadır [Lu ve ark., 2006; Chen ve Zhang, 2011; Lee ve ark., 2011]. Bu çalışmalar genotoksik-antigenotoksik etkilerden ziyade kanseri önleyici farklı mekanizmalarını açıklamaya yöneliktir.

*G. lucidum* ile yapılmış başka herhangi bir genotoksisite-antigenotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak farklı mantarlarla yapılmış çalışmalar mevcuttur.

*Agaricus blazei* tıbbi özellikleriyle bilinen bir diğer mantardır. Bellini ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada bu mantarın farklı organik ekstraktları (metanolik, hekzanik ve n-bütanolik ekstraktlar) ve sulu ekstraktı çalışılmıştır. Ekstraktlar (herbir ekstrattan 100 μg/mL) tek başlarına ve etil metan sülfanat (EMS) ile birlikte uygulanmıştır. Genetik hasarın belirlenmesinde kromozomal aberasyon testi (CHO-k1 hücre hattında, tüm ekstraktlar) ve sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi (CHO-1 ve HTC hücre hattına yalnızca bütanolik ekstrakt) kullanılmıştır. KA testinde mantarın tek başına uygulandığı grupta kontrole kıyasla önemli bir değişim gözlenmemiştir. Ancak EMS ve mantarın birlikte uygulandığı grupta, EMS ile kıyaslandığında kromozomal aberasyon miktarında önemli bir düşüş gözlenmiştir. En önemli azalma ise sulu ekstrakta gerçekleşmiştir. KA testinde hiçbir ekstrakt klastojenik bulunmamıştır. MN testinde kullanılan bütanolik ekstrakt CHO-1 hücre hattında genotoksik etki göstermezken, HTC hücre hattında genotoksik etki göstermiştir [Bellini ve ark., 2006].

Ünyayar ve arkadaşları 2006 yılında *Coriolus versicolor* ve *Fundalia trogii* mantarının HeLa servikal kanser hücre hattı ve normal insan fibroblast hücreleri üzerindeki antitümör ve sitotoksik etkilerini MMT testiyle belirlenmişlerdir. Bu etkiler, genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkilere sahip antikanser bir ajan olan MM-C'nin oluşturduğu hasar ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ayrıca insan kan lenfositlerinde (*Fundalia trogii* mantarı için) sitotoksititenin belirlenmesinde mitotik indeks (MI), mutajenitenin belirlenmesinde kardeş kromatid değişimi testi, sitostatik etkilerin oluşumunun belirlenmesinde replikasyon indeksi (RI) de incelenmiştir. MI değerlerinin belirlenmesi için, *Funalia trogii*'nin ısıtılmamış (1µL ve 3 µL) ve 65˚C (3 µL) ve 85 ˚C (3 µL)'ye ısıtılmış dört farklı ekstraktı ve pozitif kontrol olarak MM-C (4 µg/mL ve 8 µg/mL) kullanılmıştır. Kardeş kromatid değişimi frekansının ve replikasyon indeksinin belirlenmesi için ise *Funalia trogii* ekstratı 3 µL ve MM-C ise 4 µg/mL konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda gerek *Funalia trogii*'nin gerekse *Coriolus versicolor*'un kanser hücre hattı üzerinde durdurucu bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ekstraklar ≥ 3 µL olduğunda ise HeLa hücre hatttında *F. trogii*'nin *C. versicolar*'dan daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. *Funalia trogii* uygulanan lenfositlerde MI değeri negatif kontrole göre azalırken kardeş kromatid değişimi frekansında ve RI'da negatif kontrolle kıyaslandığında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Çalışmada *Funalia trogii*'nin HeLa kanser hücre hattında güçlü bir sitotoksik ve çoğalmayı durdurucu etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Mantarın sitotoksik aktivitesi ekstraktta bulunan lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca bu ekstrakt insan lenfositlerinde herhangi bir mutajenik etki oluşturmamıştır.

Angeli ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Agaricus blazei* mantarından ekstre edilen bir polisakkarit olan β-glukanın antigenotoksik etkisi çalışılmıştır. Bir prokarsinojenik bileşen olan benzo [a] pirenin (B[a]P) DNA'da neden olduğu hasara karşı *A. blazei*'nin kemoprotektif etkisi comet ve sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi ile belirlenmiştir. Çalışmada Hep-G2 hücre hattı kullanılmıştır. β-glukanın 7, 21, 63 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonu seçilmiştir. Negatif kontrol olarakta DMSO uygulanmıştır. Bu çalışmada 3 farklı uygulama gerçekleşmiştir. Birincisi hücre hattı β-

glukan ve karsinojene 24 saat boyunca maruz bırakılarak eş zamanlı bir uygulama yapılmıştır. İkinci uygulamada ise karsinojen maruziyetinden önce 24 saat boyunca β-glukan uygulanıp karsinojen ilavesinden sonra 24 saat daha inkübasyon gerçekleşmiştir. Son uygulamada ise β-glukan hücre hattına 24 saat boyunca muamele edilmiş ve kültür ortamının değiştirilmesini takiben B[a]P ilavesi yapılmıştır. Bu uygulama bir önceki uygulamaya benzememektedir. Bu uygulamada β-glukan B[a]P ile kültüre tekrar ilave edilmiştir. Ayrıca β-glukanın tek başına uygulandığı bir grupta oluşturulmuştur. Polisakkaritin tek başına uygulama yapıldığı grupta β-glukanın hiçbir genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olmadığı ortaya koyulmuştur. Eş zamanlı uygulamanın yapıldığı grupta β-glukanın her üç konsantrasyonu da doza bağımlı bir koruyucu etki göstermiştir. Comet değerleri ve mikronükleus frekansı B[a]P'nin uygulanmasıyla artarken, B[a]P ve mantarın en yüksek konsantrasyonla birlikte uygulanmasıyla bu değerler önemli ölçüde düşüş göstermiştir. İkinci uygulama grubunda ise eş zamanlı uygulamadan farklı olarak yalnızca en yüksek konsantrasyon comet değerlerinde ve mikronükleus frekansında azalmaya neden olurken diğer iki konsantrasyon pozitif kontrolle kıyaslandığında önemli bir değişime neden olmamıştır. Son uygulama grubunda da gerek comet değerlerinin gerekse mikronükleus frekansının pozitif kontrolle kıyaslandığında doza bağımlı olarak düşüş gösterdiği saptanmıştır [Angeli ve ark., 2009].

*Agaricus blazei* ile yapılan bir diğer çalışmada mikronükleus ve comet testleri kullanılarak mantarın genotoksik ve/veya antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Mantarın 5 gr'lık tozu 200 ml distile suya eklenmiş ve 10 dk karıştırılmıştır. Bu sulu solüsyon üç farklı ekstrakt elde etmek için filtrelemeden önce farklı sıcaklıklarda bekletilmişitr. Bekleme filtreleme işlemi yapılmadan önce, 2-8 ˚C'de 1 saat, 20-25 ˚C'de 2 saat, 60 ˚C'de 5 dk olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işleminden sonra bu ekstraktlar dondurulmuş ve daha sonra oda sıcaklığında kullanılmıştır. %2,5'luk sulu solüsyondan hazırlanan çayların üç farklı konsantrasyonu (%0,05; %0,1 ve %0,15) her iki test içinde Çin hamsteri V79 hücre hattına uygulanmıştır. Hazırlanan çaylar bu çalışmada mutajen olarak kullanılan metil metansülfanat ile önce, eş zamanlı ve sonra olmak üzere üç farklı şekilde uygulanmışlardır. Sonuçlar mantarın kendi başına mutajenik olmadığını

göstermiştir. Ayrıca bu mantarın metil metansülfanat tarafından oluşturulan mikronükleuslara karşı antimutajenik etkilere sahip olduğu da bildirilmiştir. Comet testinde antimutajenik etki yalnızca ön muamelenin yapıldığı 60 ˚C'de %0,1 ve %0,15, oda sıcaklığında %0,05 ve 2-8 ˚C'de %0,1 konsantrasyonlarında tespit edilmiştir [Menoli ve ark., 2001].

Miyaji ve arkdaşlarının yapmış olduğu çalışmada *Lentinus edodes*'in sulu ekstraktlarının üç farklı konsantrasyonunun (0,5; 1,0; 1,5 mg/ml) üç farklı sıcaklıkta (4, 22 ve 60 ºC) *in vitro* koşularda genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada Comet testi ve Hep-2 hücre hattı kullanılmıştır. Uygulamalar önce, sonra ve eşzamanlı yapılmıştır. Bu çalışmada 22±2 ºC, 1,0 mg/mL, eş zamanlı uygulama ve 4ºC'de 0,5 mg/mL sonra yapılan uygulamada antigenotoksik aktivite gözlenmiştir [Miyaji ve ark., 2004].

Bellini ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi CHO-K1 hücre hattında uygulanmıştır. *Agaricus blazei*'nin metanolik ekstratları (5 farklı fraksiyon) hücre kültürlerine 100 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir. Çalışmada DNA hasarlarını indüke etmek için alkilleyici bir ajan olan etil metansülfanat kullanılmıştır. Etil metansülfanat mikronükleus frekansını gerek mutagenik gerekse antimutajenik testte kontrole göre önemli derecede artırmıştır. Ancak *A. blazei*'nin metanolik ekstrat fraksiyonları gerek tek başlarına gerekse etil metansülfanat ile birlikte uygulamaları sonucunda mikronükleus frekansında kontrol ve pozitif konrole göre önemli bir değişim göstermemiştir. Bu fraksiyonların önemli bir mutajenik yada antimutajenik etkiye sahip olmadığı ortaya konulmuştur.

Guterres ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları bir diğer çalışmada farklı bölgelerden elde edilmiş *Agaricus blazei* mantarlarının V79 hücre hattında genotoksik ve metil metan sülfanat tarafından oluşturulmuş hasara karşı antigenotoksik etkileri mikronükleus ve comet testi kullanılarak belirlenmiştir. Mantarlardan elde edilen ekstratların 20, 40, 80 µg/ml'lik konsantrasyonu mikronükleus testinde, 60 µg/ml'lik

konsantrasyonu ise comet testinde kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak metilmetan sülfanat kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak MN testinde DMSO+PBS kullanılırken comet testinde sadece PBS kullanılmıştır. Sadece mantar ekstraktlarının uygulandığı bir grup, önce mantar ekstraktlarının ardından MMS'nin uygulandığı grup, Mantar ekstratları ve MMS'nin birlikte uygulandığı grup, MMS uygulamasının ardından mantar ekstratlarının uygulandığı grup olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur. *A. blazei*'den elde edilen organik ekstraktların hiçbir konsantrasyonunda mutagenik etki görülmemiştir. Mikronükleus frekansının tüm organik ekstraktların tüm konsantrasyonlarında pozitif kontrolle kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Tüm azalma oranları % 50'den daha fazladır. En fazla azalma ise tüm organik ekstraktların en yüksek konsantrasyonu olan 80 µg/ml'de ve MMS ile ekstraktların eş zamanlı uygulamasında meydana gelmiştir. Comet testinde de bu ekstratların genotoksik olmadığı ortaya konmuştur [Guterres ve ark., 2005].

Çalışmamızda *G. lucidum* KKD testi haricinde genotoksik etki göstermemiştir. KA oranını ve mikronükleus frekansını artırmadığı için klastojenik ve anojenik etkili olmadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda *G. lucidum* mitotik indeks, replikasyon indeksi, ve nükleer bölünme indeksinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Bu nedenle sitotoksik etkili değildir.

*G. lucidum*'un antigenotoksik etkili olup olmadığını belirlemek amacıyla alkilleyici ve oksitleyici ajan olan MMC ile eş zamanlı uygulaması kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *G.lucidum* MMC'nin oluşturduğu kromozomal anormallik oranını tüm uygulamalarda azaltmıştır. MN testinde ise herhangi bir iyileştirici etkisi gözlenmemiştir. RI ve NBI üzerine anlamlı bir etki göstermezken MI'te bazı konsantrasyonlarda anlamlı artışa neden olmuştur. MMC tarafından azaltılan mitotik bölünme *G. lucidum* ekstraktı tarafından artırılmıştır. MMC varlığında *G. lucidum* mitojenik etki göstermiştir. KKD testinde ise *G.lucidum* tek başına uygulandığında uzun süreli uygulamalarda bazı konsantrasyonlarda KKD oranı artmıştır. Ancak aynı uygulama MMC varlığında yapıldığında ise bu kez mantar ekstraktı KKD frekansında azalmaya neden olmuştur. *G.*

*lucidum'*un KKD testindeki sonuçlarının seçici prooksidan aktivitesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Bir bileşik *in vitro* koşullarda prooksidan aktivite gösterebilir. Çünkü çevre *in vivo* koşullara göre daha fazla oksijen bulundurmaktadır [Krisnoja ve Shorma, 2003]. Seçici prooksidan aktivitenin kemoprevasyon için önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Çünkü genomik kararsızlığa sahip hücreler apoptozis ile elimine edilmektedir. *G. lucidum*'un etanolik ekstraktlarının insan kolon kanseri hücre hattında (HT-29) apoptozisi indüklediği açıklanmıştır [Hong ve ark., 2004]. Aynı zamanda *Ganoderma*'dan izole edilen bileşenlerin antioksitatif ve radikal süpürücü etkileri olduğu da belirlenmiştir [Lee ve ark., 2001; Shieh ve ark., 2001; Shi ve ark., 2002].

Elde edilen sonuçların ışığında *G. lucidum in vitro* koşullarda genotoksik olmadığı ve antigenotoksik etki gösterebileceği ortaya konulmuştur. *Ganoderma*'nın aydınlatılmamış moleküler hedeflerinin, *Ganoderma* alınımı ile kanser riski arasındaki ilişkinin çözülebilmesi, optimum doz, etki ve güvenliği tek başına mı yoksa kemoterapi/radyoterapi ile birlikte mi kullanılacağının araştırılması için daha fazla deneysel, epidemiyolojik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır [Gao ve Zhou, 2003]. Ayrıca *G. lucidum'* un antikanser özellikli bileşenlerinin sinerjik bir şekilde mi yoksa tek başına mı etki ettiğinin de araştırılması gerekmektedir [Liu ve Zhang, 2005].

# KAYNAKLAR


Allgayer, H., "Molecular regulation of an invasion-related molecule-options for tumour staging and clinical strategies", ***Eur. J. Cancer***., 42: 811-819 (2006).

Angeli, J.P.F., Ribeiro, L.R., Camelini, C.M., Mendonça, M.M., Mantovani, M.S., "Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and b-glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay", ***Journal of Food Composition and Analysis***, 22:699–703(2009).

Appelbaum, J. W., "The role of the immune system in the pathogenesis of cancer", ***Semin. Oncol. Nurs.*** 8:51–62 (1992).

Bao, X. F., Liu, C. P., Fang, J. N., Li, X. Y., "Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of Ganoderma lucidum (Fr.) Karst.", ***Carbohydr. Res***. 332:67–74 (2001a).

Bao, X. F., Duan, J. Y., Fang, X. Y., Fang, J. N., "Chemical modifications of the (1→3)-alpha-D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity", ***Carbohydr. Res.***,336: 127–140 (2001b).

Bao, X. F., Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N., Li, X. Y., "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", ***Phytochemistry***, ***59***:175–181 (2002).

Battle, J., Ha, T. Z., Li, C. F., Dellabeffa, V., Rice, P., Kalbfleisch, J., Browder, W., Williams, D., "Ligand binding to the (1→3)-beta-D-glucan receptor stimulates NF-kappa B activation, but not apoptosis in U937 cells", ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 249:499–504 (1998).

Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Matuo, R., Terezan, A.P., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., "Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells", ***Toxicol. In Vitro***, 20:355–360 (2006).

Bold, R.J., Termuhlen, P.M., McConkey, D.J., "Apoptosis, cancer and cancer therapy", ***Surg. Oncol.***, 6: 133–142 (1997).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", ***Mutat. Res.***, 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi C., Fenech, M., "Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies", ***Mutagen.***, 26 (1): 93–100 (2011).

Boyle, P., Ferlay, J., "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004", ***Ann.Oncol***. 16:481-488 (2005).

Camargo, M. R., Kaneno, R., "Antitumor properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and terpenoids", ***Annu. Rev. Biomed. Sci.***, 13:1-8 (2011)

Cao, Q-Z., Lin, Z-B., "Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide", ***Acta Pharmacol. Sin.***, 25 (6): 833-838 (2004).

Carmeliet, P., "Angiogenesis in life, disease and medicine", ***Nature***, 438:932–936, (2005).

Casson, A.G., Zheng, Z., Chiasson, D., MacDonald, K., Riddell, D.C., Guernsey, J.R., Guernsey, D.L., McLaughlin, J., "Associations between genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma", ***Cancer Detect. Prev***., 27:139-146 (2003).

Chen, A.W., Miles, Ph., "Biomedical research and the application of mushroom nutriceuticals from *Ganoderma lucidum*", In Mushroom Biology and Mushroom Products; ***Royse, Ed.,*** 161–175 (1996).

Chen, N-H., Zhang, J-J., "p53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells", ***Phytomedicine***, 18:719–725 (2011).

Chen, R. C., Su, J. H., Gao-Liang, O. Y., Cai, K. X., Li, J. Q., Xie, X. G., "Induction of differentiation in human hepatocarcinoma cells by isoverbascoside", ***Planta Med***., 68:370–372 (2002).

Chen, S.N., Nan, F.H., Chen, S., Wu, J.F., Lu, C.L., Soni, M.G., "Safety assessment of mushroom b-glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies", ***Food. Chem. Toxicol***., 49:2890–2898 (2011).

Chen, X., Chen, Y., Li, S-B., Chen, Y-G., Lan, J-Y., Liu, L-P., "Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats", ***Carbohydr. Polymer***., 77:389–393 (2009).

Chen, Y. J., Shiao, M. S., Lee, S. S., Wang, S. Y., "Effect of Cordyceps sinensis on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells", ***Life Sci.***, 60:2349–2359 (1997).

Chen, Y., Xie, M.Y., Gong, X.F.J., "Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*", ***J. Food Eng.*** 81:162–170 (2007).

Cheong, J., Jung, W., Park, W., "Characterization of an alkali-extracted peptidoglycan from Korean *Ganoderma lucidum*", ***Arch. Pharm. Res***., 22:515–519 (1999).

Cheung, W. M. W., Hui, W. S., Chu, P. W. K., Chiu, S. W., Ip, N. Y., "*Ganoderma* extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells", ***FEBS Lett***., 486:291–296 (2000).

Cheung, P.C.K., "Mushrooms As Functional Foods", ***John Wiley & Sons, Inc***., Hoboken, NJ (2008).

Chiu, S.W., Wang, Z.M., Leung, T.M., Moore, D., "Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes", ***Food. Chem. Toxicol***., 38:173-178 (2000).

Cilloni, D., Martinelli, G., Messa, F., Baccarani, M., Saglio, G., Nuclear factor-κB as a target for new drug development in myeloid malignancies", ***Haematol***., 92: 1224–1229 (2007).

Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparys, P., "ECVAM retrospective validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT)", ***Mutagenesis***, 23:271–283 (2008).

Çelik, A., Akbaş, E., "Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants", ***Ecotoxicol. Environ. Saf.***, 60:106–112 (2005).

Dai, Y-Ch., Yang, Z-L., Ui, B-K., Yu, Ch-J., Zhou, L-W., "Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review)", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 11:287–302 (2009).

Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D., Beliveau, R., "Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins", ***Biochim. Biophys. Acta***, 1478:51–60 (2000).

Dotan, N., Wasser, S.P., Mahajna, J., "The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator", ***Integr. Cancer Ther***. XX:1–12 (2010).

Dusinska, M., Runden-Pran, E., Carreira, S. C., Saunders, M., "Critical evaluation of toxicity tests", Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology and impact on human health, ***Elsevier***, London, 63-80 (2012).

Dudhgoankor, S., Thyagarajan, A., Sliva D., "Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*", ***Int. Immunopharm***. 9:1272–1280 (2009).

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufman, S.H., "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis", ***Annu. Rev. Biochem.*** 68: 383−424 (1999).

Eferl, R. and Wagner, E.F., "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis", ***Nat. Rev. Cancer***, 3: 859-868 (2003).

Evans, HJ., In, Kilbey, BJ., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds. "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd ed., ***Elsevier Sciences***, Amsterdam, 405-427 (1984).

Fenech, M., "The in vitro micronucleus technique", ***Mutat. Res.***, 455(1-2): 81-95 (2000).

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrales, J., Croft, J., Parry, J., Norppa, H., "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in human cells", ***Mutagenesis***, 26:125–132 (2011).

Fisher, M., Yang, L. X., "Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy", ***Anticancer Res***., 22:1737–1754 (2002).

Gao, J.J., Min, B.S., Ahn, E.M., Nakamura, N., Lee, H.K., Hattori, M., " New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells", ***Chem. Pharm. Bull***, 50:837–840 (2002).

Gao, X. X., Fei, X. F., Wang, B. X., Zhang, J., Gong, Y. J., Minami, M., Nagata, T., Ikejima, T., "Effects of polysaccharides (FI0-b) from mycelium of *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cells and human PBMC (I)", ***Acta Pharmacol. Sin***., 21:1179–1185 (2000).

Gao, Y., Zhou, Sh., Chen, G., Dai, X., Ye, J., "A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. extract (ganopoly) in patients with advanced cancer", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 4 (3), 207–214 (2002).

Gao, Y., Zhou S., "Cancer Prevention and Treatment by *Ganoderma*, a Mushroom with Medicinal Properties", ***Food Rev. Int.***, 19(3):275-325 (2003).

Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., Zhou, Sh., "A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum*. (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) extract in patients with type II diabetes mellitus", ***Int. J. Med.Mushrooms***, 6 (1) (2004).

Gao, Y., Wenbo, T., Gao, H., Lan, T., & Zhou, S., "Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *G. lucidum*. Preclinical and clinical studies", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 4:95–106 (2004).

Gao, Y.H., Zhou, S.F., Jiang, W.Q., Huang, M., Dai, X.H., "Effects of Ganopoly(R) (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients", ***Immunol. Invest***., 32:201–215 (2003).

Gao, Y.H., Zhou, S.F., "Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae). II. Mechanism considerations", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 6:219–230 (2004).

Gibbs, J.B., "Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research", ***Science***, 287:1969–1973 (2000).

Gong, Y. J., Fei, X. F., Gao, X. X., Zhang, J., Wang, B. X., Minami, M., Nagata, T., Ikejima, T., "Effect of polysaccharide F III-2 from *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cells and human peripheral blood mononuclear cells", ***Chin. J. Pharmacol. Toxicol.*** 15:401–407(2001).

Guilford, J.M., Pezzuto, J.M., "Natural products as inhibitors of carcinogenesis.", ***Expert Opin Investig Drugs***, 17: 1341–1352 (2008)**.**

Guterrez, Z.R., Mantovani, M.S., Eira, A.F., Ribeiro, L.R., Jordao, B.Q., "Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro", ***Toxicol. Vitro***, 18:301–309 (2004).

Guterres, Z. R., Mantovani, M. S., Eira, A. F., Ribeiro, L. R., Jordao, B. Q., "Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells", ***Genet. Mol. Biol.***, 28, 3, 458-463 (2005)

Ha, T.B.T., Gerhauser, C., Zhang, W.D., Ho-Chong-Line, N., Fouraste, I., "New lanostanoids from *Ganoderma lucidum* that induce NAD(P)H: quinone oxidoreductase in cultured HEPALCLC7 murine hepatoma cells", ***Planta. Med***., 66:681–684 (2000).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)", ***Cancer Research***, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Han, M. D., Lee, E. S., Kim, Y. K., Lee, J. W., Jeong, H., Yoon, K. H., "Production of nitric oxide in raw 264.7 macrophages treated with ganoderan, the beta-glucan of *Ganoderma lucidum*", ***Korean J. Mycol.***, 26:246–255 (1998).

Han, S.I., Kim, Y.S., Kim, T.H., "Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions", ***BMB Rep.***, 41:1-10 (2008).

Harhaji Trajkovic, L.M., Mijatovic, S.A., Maksimovic-Ivanic, D.D., Stojanovic, I.D., Momcilovic, M.B., Tufegdzic, S.J., Maksimovic, V.M., Marjanovic, Z.S., Stosic-Grujicic, S.D., "Anticancer properties of *Ganoderma lucidum* methanol extracts *in vitro* and *in vivo*", ***Nutr. Cancer***., 61:696-707 (2009).

Hobbs, Ch., "Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing, and Culture, 2nd.Ed.", ***Botanica Press, Inc***., Santa Cruz, CA, USA, (1995).

Hoerauf, K. H., Schrögendorfer, K. F., Wiesner, G., Gruber, M., Spacek, A., Kress, H. G., Rudiger, H. W., "Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to isoflurane and nitrous oxide in vitro", ***Br. J. Anaesth***., 82:268–270 (1999).

Holz, O., Scherar, G., Brodtmeier, S., Koops, F., Warnke, K., Krause, T., Austen, A., Angerer, J., Tricker, A. R., Adlkofer, F. et al., "Determination of low level exposure to volatile aromatic hydrocarbons and genotoxic effects in workers at a styrene plant", ***Occup. Environ. Med***., 52: 420–428 (1995).

Hong, K.J., Dumn, D.M., Shen, C.L. and Pence, B.C., "Effects of *Ganoderma lucidum* on apoptotic and anti-inflammatory function in HT-29 human colonic carcinoma cells", ***Phytother. Res.***, 18: 768–770 (2004).

Hsu, H.Y., Chen, Y.P., Shen, S.J., Hsu, C.S., Chen, C.C., Chang, H.C., Eds., "Oriental Materia Medica: A Concise Guide", ***Oriental Healing Arts Institute***, Long Beach, CA, USA, 640–641 (1985).

Hu, H., Ahn, N.S., Yang, X., Lee, Y.S. and Kang, K.S., "*Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell", ***Int. J. Cancer***, 102: 250–253 (2002).

Hughes, D. A., "Effects of dietary antioxidants on the immune function of middleaged adults", ***Proc. Nutr. Soc.***, 58: 79–84 (1999).

IARC, "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Overall Evaluation of Carcinogenicity", ***International Agency for Research on Cancer***., Lyon, France, Vol. 42 (1987).

Ichinohe, T., Ainai, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H., "Induction of crossprotective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia", ***J. Med. Virol.*** 82: 128–137 (2010).

Jacobson, J. S., Workman, S. B., Kronenberg, F., "Research on complementary/alternative medicine for patients with breast cancer: a review of the biomedical literature", ***J. Clin. Oncol***. 18: 668–683 (2000).

Jang, K-J., Han, M-H., Lee, B-H., Kim, B-W., Kim, C-H., Yoon, H-M., Choi, Y-H., "Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells", ***J. Acupunct. Meridian Stud.***, 3(1): 24-31 (2010).

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., et al., "Cancer Statistics, 2008", ***CA Cancer J. Clin.***, 58: 71–96 (2008).

Jiang, J., Slivova, V., Harvey, K., Valachovicova, T. and Sliva, D., "*Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer through the inhibition of Akt/NF-κB signaling", ***Nutr. Cancer.,*** 49, 209–216 (2004a).

Jiang, J., Slivova, V., Valachovicova, T., Harvey, K., and Sliva, D., "*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3", ***Int. J. Oncol***., 24: 1093–1099 (2004b).

Jiang, J., Grieb, B., Thyarojan, A., Sliva, D., "Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-κB signaling", ***Int. J. Mol. Med.***, 21: 577-584 (2008).

Joseph, S., Sabulal, B., Goerge, V., Smina, T.P., Janardhanan, K.K., "Antioxidative and antiinflammatory activities of the chloroform extract of *Ganoderma lucidum* found in south India", ***Sci Pharm***., 77:111–121 (2009).

Jost, P.J., Ruland, J., "Aberrant NFκB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications", ***Blood***, 109: 2700–2707 (2007).
Jumes, F. M. D., Lugarini, D., Pereira, A. L. B., Oliveira, A., Christoff, A.O., Linde, G.A., Valle, J.S., Colauto, N.B., Accoa A., "Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats", ***Can. J. Physiol. Pharmacol***, 88(1): 21-27 (2010).

Karin, M. and Ben-Neriah, Y., "Phosphorylation meet subiquitination: The control of NF-[k]B activity"., ***Ann. Rev.Immunol***., 18: 621-663 (2000).

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. and Li, Z.W., "NF-kB in cancer: from innocent bystander to major culprit", ***Nat. Rev. Cancer***. 2: 301-310 (2002).

Karin, M.," Nuclear factor-κB in cancer development and progression", ***Nature***, 441: 431–436 (2006).

Kaya, F.F., Topaktaş, M., "Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*", ***Mutat. Res***., 626:48–52(2007).

Kerb, R. S., "Tumor angiogenesis: past, present and the near future", ***Carcinogenesis,*** 21:505–515 (2000).

Kidd, P.M., "The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment", ***Altern. Med. Rev***., 5:4–27(2000).

Kim, H. W., Kim, B. K., "Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae)", ***Int. J. Med. Mushroom*** 1: 121–138 (1999).

Kim, H.S., Kacew, S., Lee, B.M., "*In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*)", ***Carcinogenesis***, 20: 1637–1640 (1999).

Kimura, Y., Taniguchi, M., Baba, K., "Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: Mechanism of action and isolation of an active substance", ***Anticancer Res***., 22: 3309–3318 (2002).

Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., Tsunoo, H., "Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*", ***J. Biol. Chem.*** 264: 472–478 (1989).

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., "Ainsworth &Brisby's dictionary of the fungi, 10th edn", ***CAB International***, Wallingford, (2008).

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, I., "Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations", ***Mutat. Res.*** 504: 137–148 (2002).

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, Loock, K. V., Decordier, I., "The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance", ***Arch. Toxicol***, 8: 873-899 (2011).

Klug, S.W., Cummings, M.R., Spencer, A.C., " Hücre döngüsünün durdurulması ve kanser", Genetik Kavramlar, Öner, C., ***Palme Yayınevi***, Ankara, 434-456 (2006).

Kocaman, A.Y., Istifli, E. S., Büyükleyle M., Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., "In vitro evaluation of the protective effects of 4-thujanol against mitomycin-C and cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human peripheral lymphocytes", ***Toxicol. Ind. Health***, 1–15 (2012).

Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M., Kohda, H., Yamasaki, K. "Structure of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. (Polyporaceae)", ***Chem. Pharm. Bull***., 33: 4829–4835 (1985).

Larrosa, M., Espin, J.C., Tomas-Barberan F.A., "The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway", ***J. Nutr***. ***Biochem.***, 17: 611-625 (2006).

Lee, S. S., Wei, Y. H., Chen, C. F., Wang, S. Y., Chen, K. Y., "Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*", ***J. Chin. Med***., 6: 1–12 (1995).

Lee, J. M., Kwon, H., Jeong, H., Lee, J. W., Lee, S. Y., Baek, S. J., Surh, Y. J., "Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*", ***Phytother. Res***. 15: 245–249 (2001).

Lee, K. W., & Lee, H. J., "Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis", ***Mechanisms of Ageing and Development***, 127(5): 424–431 (2006).

Lee, M.K., Hung, T.M.,Coung, T.D., Na MK., Kim, J.C., Kim, E-J., Park, H-S., Choi, J.S., Lee, IS., Bae, KH., Hattari M., Min, B.S., "Ergosta-7,22-diene-2β,3α,9α-triol from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* induces apoptosis in human myelocytic HL-60 cells", ***Phytother. Res***. 25: 1579–1585 (2011).

Li, F., Xu, J., Zhou, J., Zhao, L., Sheng, J., Sun, G., Hu, Q., "Inhibition of mitomycin C-induced chromosomal aberrations by micrometer powder of selenium-enriched green tea in mice spermatocytes", ***Mutat. Res***., 675:11–16 (2009).

Li, M. C., Lei, L. S., Liang, D. S., Xu, Z. M., Yuan, J. H., Yang, S. Q., Sun, L. S., "Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on oxygen free radicals in murine peritoneal macrophages", ***Chin. J. Pharmacol. Toxicol.***, 14: 65–68 (2000).

Lieu, C. W., Lee, S. S., Wang, S. Y., "The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells", ***Anticancer Res***. 12: 1211–1215 (1992).

Lin, Z.B., "Progress of studies on the antitumor activity and immunomodulating effect of *Ganoderma*", ***J. Peking Univ. (Health Sci)***, 34: 493-8 (2002).

Lin, W. H., Hung, C. H., Hsu, C. I., Lin, J. Y., "Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis", ***J. Biol. Chem***. 272: 20044–20048 (1997).

Lin, Z.B., "Progress of studies on the anti-tumor activity and immunomodulating effects of *Ganoderma*", ***J. Peking Univ. (Health Sci)***, 34: 493–498 (2002).

Lin, Z.B., Zhang, H.N., "Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms", ***Acta Pharmacol. Sin***. 25: 1387–1395 (2004).

Lin, Y-L., Liang, Y-C., Tseng, Y-S., Huang, H-Y., Chou, S-Y., Hseu, R-S., Huang, C-T., Chiang, B-L., An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kB and MAPK pathways", ***J. Leukoc. Biol***. 86: 877–889 (2009).

Liu, F., Ooi, V.E.C., Fung, M.C., "Analysis of immunomodulating cytokines mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides", ***Life Sci.*** 64(12): 1005-1011 (1999).

Liu, G-Q., Zhang, K-C., "Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.: a new understanding", ***J. Integr. Plant Biol.***, 47 (2): 129-135 (2005).

Liu, G-Q., Ding, C-Y., Wang, X-L., "Mechanisms of anticancer action of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*: A review of recent researches", ***Mycosystema***, 26(3):470-476 (2007).

Liu, T. L., Wang, S. H., Chang, Q. H., "Isolation, purification and analysis of polysaccharides and proteoglycan of *Ganoderma*", ***Chin. J. Biochem***. 5: 33–37 (1989).

Liu, W. B., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A. A., Fan, F., Ahmad, S. A., Jung, Y. D., Ellis, L. M., "Antiangiogenic therapy targeting factors that enhance endothelial cell survival", ***Semin. Oncol***., 29: 96–103 (2002).

Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., Gao, X., "Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*", ***International Journal of Biological Macromolecules***, 46: 451–457 (2010).

Lopez-Nigro, M. M., Palermo, A. M., Mudry, M. D., Carballo, M. A., "Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivative", **Toxicol. in vitro**, 17: 35–40 (2003).

Lowell, J. A., Parnes, H. L., Blackburn, G. L., "Dietary immunomodulation: beneficial effects on oncogenesis and tumor growth", ***Crit. Care Med***., 18: 145–148 (1990).

Lu, H., Li, J., Zhang, D., Stoner, G.D. and Huang, C., "Molecular mechanisms involved in chemoprevention of black raspberry extracts: from transcription factors to their target genes", ***Nutr. Cancer***, 54: 69-78 (2006).

Lull, C., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. J., "Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites", ***Mediat. Inflamm***. 2: 63–80 (2005).

Luqman, S., Pezzuto, J. M., "NFκB: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention", ***Phytother. Res***., 24: 949–963 (2010)

Ma, J. Y., Ye, Q., Hua, Y. J., Zhang, D. C., Cooper, R., Chang, M. N., Chang, J. Y., Sun, H. H., "New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*", ***J. Nat. Prod***., 65: 72–75 (2002).

Mahajna, J., Dotan, N., Zaidman, B-Z., Petrova, R.D., Wasser, S.P., "Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Ganoderma lucidum*", ***Nutr. Canc.*** 61: 1, 16-26 (2008).

Mahajna, J., Dotan, N., Zaidman, B-Z., Petrova, R.D., Wasser, S.P., "Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: the case of *Ganoderma lucidum*", ***Nutr. Canc.*** 61: 16–26 (2010).

Masso-Welch, P. A., Zangani, D., Ip, C., Vaughan, M. M., Shoemaker, S., Ramirez, R. A., Ip, M. M., "Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid", ***Cancer Res.***, 62:4383–4389 (2002).

Mattila, P., Konko, K., Eurola, M., *et al*., "Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms", ***J. Agric. Food Chem***. 49: 2343-2348 (2001)

Mazar, A.P., "The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer", ***Anticancer Drugs***, 12:387–400 (2001).

McKenna, D.J., Jones, K., Hughes, K., "Reishi Botanical Medicines. The Desk reference for major herbal supplements, 2nd Ed.", ***The Haworth Herbal Press***., New York, London, Oxford, 825–855 (2002).

Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Speit, G., Jordao, B.Q., "Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells", ***Mut. Res.***, 496: 5–13 (2001).

Milner, J. A., "Strategies for cancer prevention: the role of diet", ***Br. J. Nutr***., 87: 265–272 (2002).

Min, B.S., Gao, J.J., Nakamura, N., Hattori, M., "Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells", ***Chem. Pharm. Bull***., 48: 1026–1033 (2000).

Miyaji, C.K., Jordao, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Colus, I.M.S., "Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay", ***Genet. Mol. Biol.*** 27(1): 108-114 (2004).

Mizuno, T., "Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects", ***Food Rev. Int***., 11 (1): 151–166 (1995).

Moncalvo, J.M., "Systematics of *Ganoderma*. In: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops", Flood, J., Bridge, P.D. and Holderness, M., ***CAB International*** Wallingford,United Kingdom, (2000).

Mueller, A., Raptis, J., Rice, P. J., Kalbfleisch, J. H., Stout, R. D., Ensley, H. E., Browder, W., Williams, D. L., "The influence of glucan polymer structure and

solution conformation on binding to (1→3)-beta-D-glucan receptors in a human monocytelike cell line", ***Glycobiology***,10: 339–346 (2000).

Nakamura, T., Akiyama, Y., Matsugo, S., et al., "Purification of caffeic acid as an anti-oxidant from submerged culture mycelia of *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (Aphyllophoromycetidae)", ***Int. J. Med. Mushr***., 5: 163-167 (2003).

Natarajan, A.T., "Chromosome aberrations: past, present and future", ***Mut. Res.***, 504: 3–16 (2002).

Ng, C.T., Li, J.J., Bay, B.H., Yung, L.Y., "Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials", ***J. Nucl. Acids***., pii: 947859 (2010).

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S., "Natural compounds for cancer treatment and prevention", ***Pharmacol. Res.,*** 59:365–378 (2009).

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folloe, G.A., Drets, M.E., "Chromosomal aberrations:formation, identification and distribution", ***Mutat. Res.***, this volume(2002).

Odekon, L.E., Sato, Y., Rifkin, D., "Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity", ***J. Cell. Physiol***. 150: 258–263 (1992).

Ooi, V.E.C., Liu, F., "Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide–protein complexes", ***Curr. Med. Chem.***, 7: 715–729 (2000).

Ortega-Gutie´rrez, S., Lo´pez-Vicente, M., Lostale´, F., Fuentes-Broto, L., Martı´nez-Balları´n, E., Garcı´a, J.J., "Protective effect of melatonin against mitomycin C-induced genotoxic damage in peripheral blood of rats", ***J Biomed Biotechnol***, 2009:791432, (2009).

Pahl, H., "Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors", ***Oncogene***, 18: 6853–6866,(1999).

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan AT., Nilsson R., "Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium" Mutation Research, 540: 19–28 (2003).

Pan, S. M., Jr-Shin, Y., Hseu, R. S., "Purification and characterization of manganese superoxide dismutase from *Ganoderma microsporum*", ***Biochem. Mol. Biol. Int.***, 42: 1035–1043 (1997).

Patel, S., Goyal, A., "Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics:a review", *3 Biotech.*, 2: 1–15 (2012).

Paterson, R. R., "*Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory", ***Phytochem***., 67:1985–2001 (2006)

Perry, P.E., Thompson, E.J., In, Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., "The methodology of sister chromatid exchanges", Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd ed., ***Elsevier Sciences***, Amsterdam, 495–529 (1984).

Petrova, R.D., Wasser, S.P., Mahajna, J.A., Denchev, C.M. and Nevo, E., "Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 7: 141–156 (2005).

Petrova, R.D., Mahajna, J., Reznick, A.Z., et al., "Fungal substances as modulators of NF-κB activation pathway", ***Mol. Biol. Rep***., 34: 145-154 (2007).

Petrova, R.D., Reznick, A.Z., Wasser, S.P., Denchew, C.M., Nevo, E., Mahajna, J., "Fungal metabolites modulating NF-κB activity: An approach to cancer therapy and chemoprevention (Review)", ***Oncology Reports***. 19: 299-308 (2008).

Petrova, R.D, Mahajna, J., Wasser, S.P., Ruimi, N., Denchev, C.M., Sussan, S., Nevo, E., Reznick, A.Z., "*Marasmius oreades* substances block NF-kappaB activity through interference with IKK activation pathway", ***Mol. Biol. Rep.***, 36: 737–744 (2009).

Pezzuto, J.M., Kosmeder, J.W., Park, E.J., et al., "Characterization of natural product as chemopreventive agents. In Cancer Chemoprevention", Kelloff GJ, Hawk ET, Sigman CC (eds). ***Humana Press Inc***., Totowa, NJ, 2: 3–37 (2005).

Pillai, T.G., Nair, C.K.K., Janardhanan, K.K., "Enhancement of repair of radiation induced DNA strand breaks in human cells by *Ganoderma* mushroom polysaccharides", ***Food Chem.*** 119: 1040–1043 (2010).

Radic, N., Jevnikar, Z., Obermajer, N., Kristl, J., Kos, J., Pohleven, F., Strukelj, B., "Influence of culinary-medicinal maitake mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks:Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetideae) polysaccharides on gene expression in Jurkat T Lymphocytes", ***Int. J. Med. Mushrooms,*** 12: 245–256 (2010).

Rajagopalan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C., "Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability", ***Nature***, 428: 77–81 (2004).

Ratain, M. J., "Pharmacology of cancer chemotherapy", Principles and Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., ***Lippincott-Raven Publishers***, Philadelphia, 375–509 (1997).

Rossner, P., Boffetta, P., Ceppi, M., Bonassi, S., Smerhovsky, Z., Landa, K., Juzova, D., Srám, R. J., "Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer", ***Environ. Health Perspect***., 113:517–520 (2005).

Saunders, F. R., Wallace H. M., "On the natural chemoprevention of cancer", ***Plant Physiol. Biochem.***, 48: 621-626 (2010).

Shi, Y. I., James, A. E., Benzie, I. F. F., Buswell, J. A., "Mushroom-derived preparations in the prevention of H2O2-induced oxidative damage to cellular DNA", ***Teratog. Carcinog. Mutagen***., 22: 103–111 (2002).

Shieh, Y. H., Liu, C. F., Huang, Y. K., Yang, J. Y., Wu, I. L., Lin, C. H., Lin, S. C., "Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice", ***Am. J. Chin. Med.***, 29: 501–507 (2001).

Sliva, D., Labarrere, C.,Slivava, V., Sedlak, M., Lloyd, F.P., Ho, N.W.Y., "*Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells", ***Biochem. Biophys. Res. Comm.***, 298: 603–612 (2002).

Sliva, D., "*Ganoderma Lucidum*(Reishi) in Cancer Treatment", ***Integr. Canc. Ther.***, 2(4): 358-364 (2003).

Sliva, D., "Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi). Mini Rev.", ***Med. Chem***., 4: 873-879 (2004).

Sliva, D., "*Ganoderma lucidum* in cancer research", ***Leuk. Res***., 30: 767–768 (2006).

Smina, T.P., De, S., Devasagayam, T.P.A., Adhikari, S., Janardhanan, K.K., "*Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes in vitro", Mutation Research 726:188– 194 (2011).

Son, C., Shin, J., Cho, J., et al., "Induction of murine interleukin-1 beta expression by water-soluble components from *Hericium erinaceum*", ***Acta. Pharmacol. Sin***., 27: 1058-1064 (2006).

Song, Y.S., Kim, S.H., Sa, J.H., Jin, C., Lim, C.H., Park, E.H., "Antiangiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*", ***J. Ethnophamacol.***, 90: 17–20 (2004).

Sorsa, M., Hemminki, K., Vainio, H., "Occupational exposure to anti-cancer drugs: potential and hazard", ***Mut. Res***., 154: 135–149 (1985).

Speit G., Houpter S., "On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substitute chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns", ***Hum. Genet.***, 70:126–129 (1985).

Speit, G., Henderson, L., "Review of the in vivo genotoxicity tests performed with styrene", ***Mutat. Res.***, 589(1): 67-79 (2005).

Sporn, M.B., Suh, N., "Chemoprevention of cancer", ***Carcinogenesis***, 21(3):525-530 (2000).

Stamets, P., "Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3rd Ed.", ***Ten Speed Press***, CA-USA, (2000).

Sullivan, R., Smith, J.E., Rowan, N.J., "Medicinal mushrooms and cancer therapy. Translating a traditional practice into Western medicine", ***Perspect. Biol. Med***. 49: 159–170 (2006).

Tamimi, R. M., Lagiou, P., Adami, H. O., Trichopoulos, D., "Prospects for chemoprevention of cancer", ***J. Int. Med.***, 251: 286–300 (2002).

Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., Tsunoo, H., "Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidium*, having similarity to immunoglobulin variable regions", ***J. Biol. Chem.*** 264:16372–16377 (1989).

Thomas, T., Thomas, T. J., "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications", ***Cell. Mol. Life Sci.***, 58: 244–258 (2001).

Thyagarajan, A., Jiang, J., Hopf, A., Adamec, J. and Sliva, D., "Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion", ***Int. J. Mol. Med.*** 18: 657-664 (2006).

Tomasz, M., "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)", ***Chem. & Biol.***, 2:575-579 (1995).

Tosetti, F., Ferrari, N., De Flora, S., Albini, A., "Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents", ***FASEB J.***, 16: 2–14 (2002).

Toth, J.O., Luu, B., Ourission, G., "Les acides ganoderiques T & Z: triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma* lucidum (Polyporacee)", ***Tetrahedron Lett.*** 24(10):1081-1084 (1983).

Turkez, H., Aydin, E., Aslan, A., "*Xanthoria elegans* (Link) (lichen) extract counteracts DNA damage and oxidative stress of mitomycin C in human lymphocytes", ***Cytotechnology***, (2012).

Ünyayar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A., Ünyayar,S., Cekic, Ö., Atacag, H., "Evaluation of Cytotoxic and Mutagenic

Effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* Extracts on Mammalian Cells", ***Drug Chem. Toxicol.***, 29:69–83, (2006).

Wachtel-Galor, S., Choi, S-W., Benzie, I., "Effect of *Ganoderma lucidum* on human DNA is dose dependent and mediated by hydrogen peroxide", ***Redox Rep.***, 10(3):145-149 (2005).

Walczak, J., Wood, H., Wilding, G., Williams, T., Bishop, C. W., Carducci, M., "Prostate cancer prevention strategies using antiproliferative or differentiating agents", ***Urology***, 57: 81–85 (2001).

Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., et al., "The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes", ***Int J.Cancer***, 70: 699–705 (1997).

Wang, Y.Y., Khoo, K.H., Chen, S.T., Lin, C.C., Wong, C.H., Lin, C.H., "Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities", ***Bioorg. Med. Chem***., 10: 1057–1062 (2002).

Wargovich, M. J., Woods, C., Hollis, D. M., Zander, M. E., "Herbals, cancer prevention and health", ***J. Nutr***., 131: 3034–3036 (2001).

Wasser, S.P., "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides", ***Appl. Environ. Microbiol***. 60:258–274 (2002).

Wasser, S.P., "Reishi or Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)", Encyclopedia of Dietary Supplements, ***Marcel Dekker***, Germany, 603–622 (2005).

Wasser, S.P., "Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems", ***Int. J. Med. Mushrooms***, 12(1): 1–16 (2010).

Wasser, S.P., "Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms", ***Appl. Microbiol. Biotechnol***., 89: 1323–1332 (2011).

Wasser, S.P., Weis, A.L., "Medicinal Mushrooms. *Ganoderma lucidum*, (Curtis: Fr.), P. Karst", Nevo E., ***Peledfus Publ. House***, Haifa, Israel, 39 (1997).

Wasser, S. P., Weis, A. L., "Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective", ***Crit. Rev. Immunol***. 19: 65–96 (1999).

Wasser, S.P., Zmitrovich, IV., Didukh, M.Y., Spirin, W.A. and Malysheva, V.F., "Morphological traits of *Ganoderma lucidum* complex highlighting G. *tsugae* var.

jannieae: The current generalization", Ruggell, Liechtenstein, ***ARA Gantner Verlag***, K-G, (2006).

Weng, C-J, Chau, C.F., Hsieh, Y.S., "Lucidenic acid inhibit PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kB and AP-1", ***Carcinogenesis*** 29:147–156 (2008).

Weng, C-J., Yen, G-C., "The *in vitro* and *in vivo* experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis", ***Clin. Exp. Metastasis***, 27: 361–369 (2010).

Werner, G. H., Jolles, P., "Immunostimulating agents—what next—a review of their present and potential medical applications", ***Eur. J. Biochem***., 242: 1–19 (1996).

Willard, T., "Reishi Mushroom. Herbal of Spiritual Potency and Medical Wonder", ***Issaquah Sylvan Press***, Vancouver, (1990).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., "Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange", ***Mutat. Res.***, 616:11–23 (2007).

Won, S. J., Lee, S. S., Ke, Y. H., Lin, M. T., "Enhancement of splenic NK cytotoxic activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* mycelium in mice", ***J. Biomed. Lab. Sci.***, 2: 201–213 (1989).

Wojcik, A., Obe, G., "Sister Chromatid Excange", Chromosomal Alterations, Gunter Obe and Vijayalaxmi eds., ***Springer-Verlag***, Heidelberg, 271-283 (2007).

Wu, T.S., Shi, L.S., Kuo, S.C., "Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes", ***J. Nat. Prod***., 64: 1121–1122 (2001).

Xie, J.T., Wang, C.Z., Wicks, S. et.al. "*Ganoderma lucidum* extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells", ***Exp. Oncol***., 28: 25–29 (2006).

Xu, J., Liu, W., Yao, W., Pang, X., Yin, D., Gao, X., "Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro", ***Carbohydr. Polymer.***, 78: 227–234 (2009).

Yang, C. S., Prabhu, S., Landau, J., "Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols", ***Drug. Metab. Rev***., 33: 237–253 (2001).

Young, R. C., Wilson, C. M., "Cancer prevention: past, present, and future", ***Clin.Cancer Res.***, 8:11–16 (2002).

Zaidman, B-Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S.P., "Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics", ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 67: 453–468 (2005).

Zandi, E. and Karin, M., "Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkB kinase complex", ***Mol. Cell. Biol***., 19: 4547–4551 (1999).

Zhang, L. X., Mong, H., Zhou, X. B., "Effect of Japanese *Ganoderma lucidum* on production of interleukin-2 from murine splenocytes", ***Zhonghua Zhongxiyi Jehe Zazhi—Chin. J. Integr. Traditional West. Med.***, 13: 613–615 (1993).

Zhang, Q.H., Lin, Z.B., "Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on TNF-α and IFN-γ production and their mRNA expression", ***J. Beijing Med. Univ.*** 31: 179–183 (1999).

Zhang, J. S., Tang, Q. J., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W., Fan, H., "Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*", ***Life Sci.***, 71: 623–638 (2002).

Zhou, L., Shi, P., Chen, N-H., Zhong, J-J., "Ganoderic acid Me induces apoptosis through mitochondria dysfunctions in human colon carcinoma cells", ***Process Biochemistry***, 46: 219–225 (2011).

Zhou, S. F., Kestell, P., Baguley, B. C., Paxton, J. W., "5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid: a novel biological response modifier for cancer therapy", ***Investig. New Drugs***, 20: 281–295 (2002).

Zhou, W., Jiang, W., Deng, W., Lai, Y., Wu, M., Zhang, Z., "Antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their role on DNA damage in mice induced by cobalt-60 gamma-irradiation", ***Food Chem. Toxicol***., 50:303−309 (2012).

Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X., et. al., "Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions", ***Am. J. Chin Med***. 35: 559–574 (2007).

Zhu, H.S., Yang, X.L., Wang, L.B., Zhao, D.X., Chen, L., "Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells", ***Cell Biol. Toxicol***. 16: 201–206 (2000).

Zjawiony, J.K., "Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi", ***J. Nat. Prod***. 67:300–310 (2004).

# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : ÇAYIR, Ülkü
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02.11.1985-Ankara
Medeni hali : Bekar
e-mail : n.ulku_84@hotmail.com

| Derece | Eğitim Birimi | Mezuniyet tarihi |
|---|---|---|
| Yüksek Lisans | G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. (Genetik) | Devam |
| Lisans | Fırat Üniversitesi/Biyoloji Bölümü | 2009 |
| Lise | Tevfik İleri İ.H.L. | 2002 |

Yabancı Dil İngilizce

Yayınlar