T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEREK DNA HASARI OLUŞTURULMUŞ CİVCİV EMBRİYOLARINDA *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst (ÖLÜMSÜZLÜK MANTARI)'IN *Xpf* GEN İFADESİNİN ÜZERİNE ETKİSİ

İlkyaz YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Emine ARSLAN

KONYA-2017

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEREK DNA HASARI OLUŞTURULMUŞ CİVCİV EMBRİYOLARINDA *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst (ÖLÜMSÜZLÜK MANTARI)'IN *Xpf* GEN İFADESİNİN ÜZERİNE ETKİSİ

İlkyaz YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Emine ARSLAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202032 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Siklofosfamid İle İndüklenerek DNA Hasarı Oluşturulmuş Civciv Embriyolarında *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst (Ölümsüzlük Mantarı)'ın *Xpf* Gen İfadesinin Üzerine Etkisi

İlkyaz YILMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2017

"Ölümsüzlük Mantarı" olarak da bilinen *Ganoderma lucidum* özütlerinin terapötik yararlarından dolayı üzerinde klinik araştırmalar yapılmaktadır ve geniş bir kullanıma sahiptir. Alkilleyici ajanlardan biri olan siklofosfamid kovalent bağlarla DNA'ya bağlanıp DNA'yı zedeleyerek çift zincir kırığına neden olmaktadır. Tamir edilmeyen çift zincir kırıkları hücre ölümüne neden olabilmektedir, bu nedenle tamiri önemlidir. *Xpf* (Xeroderma Pigmentosum F) geni, tamir mekanizmaları arasında bilinen en genel ve etkili gendir. Bu çalışmada civciv embriyolarında *G. lucidum*'un sulu özütlerinin siklofosfamidin neden olduğu DNA hasarının tamirinde görev aldığı düşünülen *Xpf* geninin ifadesinin üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda eşit ağırlıklarda, aynı ırk anaçlardan elde edilen, 12 grupta sınıflandılan, 76 adet döllü tavuk yumurtaları kullanılmıştır. Türkiye'deki wild grown *G. lucidium*'un 3 farklı dozdaki sulu özütü genotoksik etkisi bilinen siklofosfamid ile birlikte ve anti-genotoksik etkisi bilinen askorbik asit ile birlikte kuluçkanın 8. Gününde uygulanmıştır. Kuluçkanın 11. Günü civciv embriyolarından alınan karaciğer dokuları -80°'de RNA izole edilene kadar muhafaza edilmiştir. Elde edilen RNA'dan cDNA sentezlenip, *Xpf* geninin ifade düzeyi kantitatif olarak Real Time PCR ile belirlenmiştir. Kontrol grubu ve siklofosfamid grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için t-testi ile analiz edilmiştir.

Siklofosfamid uygulanan grup kontrole göre ($p<0,05$) anlamlı bir fark göstermiştir. *G. lucidum* özütü ile birlikte siklofosfamid uygulanması sonucu, genin ifadesinde anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Mantar özütlerinin ikinci dozu (875 µg/y) tek başına tamir geninin ifadesini arttıran siklofosfamidi baskılayarak *Xpf* geninin ifadesini tetiklememiştir. Bu durum mantar ektraktının siklofosfomide karşı DNA'yı koruduğunu göstermekte ve genin tamir için uyarılmadığını düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Civciv; *Ganoderma lucidum;* real time PCR; siklofosfamid; *Xpf* gen.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst (Reishi) on *Xpf* Gene Expression in Chicken Embryos Occured DNA Damage by Inducing via Cyclophosphamide

İlkyaz YILMAZ

Department of Medicine Biology

MASTER THESIS / KONYA-2017

Due to the therapeutic benefits of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, also known as "reishi mushroom" and have a wide use, clinical investigations have been carried out on it. Cyclophosphamide (CP), one of the alkaline agents, binds to DNA via covalent bonds and damages DNA, causing double chain breakage. Unrepaired double chain fractures can cause cell death, so repair is important. The *Xpf* (Xeroderma Pigmentosum F) gene is the most common and effective known among repair mechanisms. In this study, it was aimed to determine the effect of the aqueous extract of *G. lucidum* on the expression of the *Xpf* gene, which is thought to be related to the repair of DNA damage caused by cyclophosphamide in chick embryos.

In this study, 76 fertilized hen's eggs, obtained from the same rootstock and classified in 12 groups were used. The aqueous extract of wild-grown *G. lucidium* from Turkey at three different doses was injected into eggs on day 8 of incubation together with CP as genotoxic agent. Also ascorbic acid (AsA) as anti-genotoxic agent was used. Liver tissues of chick embryos on day 11 of the incubation were stored at -80°C until RNA was isolated. cDNA was synthesized from the obtained RNA and expression level of *Xpf* gene was quantitatively determined by Real Time PCR. The data were analyzed by the t-test to determine the differences between the control group and CP group or the other groups.

The CP group showed a significant difference ($p<0.05$) compared to the control group. The result of CP administration together with *G. lucidum* extract did not show a significant difference in gene expression ($p>0.05$). The mushroom extract (875 µg/y) did not induce the expression of the *Xpf* gene by suppressing CP. This suggests that mushroom extract protects DNA against CP and the gene is not stimulated for repair.

Key Words: Chicken; cyclophosphamide; *Ganoderma lucidum;* real time PCR; *Xpf* gene.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda desteğini bir an olsun esirgemeyen, tecrübesiyle yol gösteren, akademik hayata ilk adımım olan yüksek lisansımda bana kattıkları için danışmanım Sayın Prof. Dr. Emine ARSLAN'a, deneyimin ilk basamaklarının gerçekleştirilmesi ve istatistiki verilerin değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a, araştırmada kullanılan doğal mantar örneklerinin temin edilmesi ve teşhis edilmesindeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gıyasettin KAŞIK ve Sayın Uzm. Dr. Sinan ALKAN'a,

Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarından dolayı Araş. Gör. Elif GÜLBAHÇE MUTLU'ya, Dr. Ayfer EŞREF'e, Biyolog Merve KILIÇ'a, ve Ziraat Mühendisi Ayşe Nur ÇETİN'e, TÜBİTAK projelerinde bursiyer olarak yer almamı sağlayan Tıbbi Biyoloji ABD. Başkanı Sayın Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

16202032 nolu projeye maddi destek sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne,

Son olarak, hayatım boyunca her hedefimde beni destekleyen ve asla yalnız bırakmayan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli annem Filiz YILMAZ ve babam Cengiz YILMAZ'a bana duydukları güven ve fedakarlıkları için sonsuz teşekkür ediyorum. Çalışmamı aileme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....i

ÖZET.....ii

SUMMARY iii

ÖNSÖZ.....iv

SİMGELER VE KISALTMALAR vii

1.GİRİŞ 1

1.1. *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.....3

1.1.1. Habitat.....3

1.1.2. Tarihi ve Geleneksel Kullanım Alanları.....4

1.1.3. *G. lucidum*'un Besin İçeriği.....4

1.1.3.1. Polisakkaritler ve Peptidoglikanlar.....5

1.1.3.2. Triterpenler 6

1.1.3.3. Diğer Bileşikler.....7

1.1.4. Terapötik Uygulamalar.....8

1.2. Kanser ve Kemoterapötikler.....11

1.2.1. Hücre Siklusuna Bağımlı İlaçlar.....12

1.2.2. Hücre Siklusuna Bağımsız İlaçlar 12

1.2.3. Kemoterapötik İlaçların Kimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....13

1.2.4. Siklofosfamid.....14

1.3. DNA Onarım Mekanizmaları.....17

1.3.1. Doğrudan Onarım Mekanizmaları.....19

1.3.2. Dolaylı Onarım Mekanizmaları.....20

1.3.3. *Xpf (Ercc4)* Geni.....21

1.3.4. *Xpf* Geninin Biyolojik İşlevleri.....22

1.3.4.1. XPF'nin NER'deki Rolü.....22

1.3.4.2. XPF'nin Çift İplik Kırıklarının Onarımındaki Rolü 25

1.3.4.3. XPF'nin Zincirler Arası Çapraz Bağ (ICL) Onarımındaki Rolü 25

1.3.4.4. XPF'nin BER'deki Rolü.....26

1.3.4.5. XPF'nin Telomerlerin Bakımındaki Rolü 26

2.GEREÇ VE YÖNTEM 31

2.1. Gereç 31

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Dokuları 31

2.1.2. Kimyasal Maddeler 33

2.1.2.1.Hayvan Dokusundan Total RNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler 33

2.1.2.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi İçin Gerekli Çözeltiler 33

2.2. Yöntem 34

2.2.1. Dokudan Total RNA İzolasyonu 34

2.2.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi 37

2.2.3. *Xpf* ve *Gapdh* Genlerinin PZR'de Optimizasyonu 37

2.2.3.1. PZR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi 38

2.2.4. Gerçek Zamanlı - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 39

2.2.5. İstatiksel Analiz 40

3.BULGULAR 41

4.TARTIŞMA 45

5.SONUÇ ve ÖNERİLER 48

6.KAYNAKLAR 49

7.EKLER 62

EK A: Etik Kurul Kararı 62

EK B: Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası 64

EK C: Tezden üretilmiş yayınlar 65

8.ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGELER VE KISALTMALAR

CP	**:**	Siklofosfamid
DNA	**:**	Deoksiribonükleik Asit
RNA	**:**	Ribonükleik Asit
HR	**:**	Homolog Rekombinasyon
NHEJ	**:**	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NER	**:**	Nükleotid Ekzisyon Tamiri
GG-NER	**:**	Global Genom NER
TC-NER	**:**	Transkripsiyona Kenetlenmiş NER
Xpf	**:**	Xeroderma Pigmentosum F
Gapdh	**:**	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
GLÖ	**:**	*Ganoderma lucidum* özütü
AsA	**:**	Askorbik Asit
RT-PCR	**:**	Gerçek Zamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time – Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

1. GİRİŞ

Tıbbi olarak kullanılan mantarlar, çeşitli hastalıkların ve belirli sağlık problemlerinin tedavisi için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Terapötik yararlarından dolayı üzerinde klinik araştırmaların yapıldığı ve geniş bir kullanıma sahip olan, ülkemizde "Ölümsüzlük Mantarı" olarak bilinen, Japonya'da Reishi, Çin'de Ling Zhi olarak adlandırılan *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst da bu mantarlardan biridir (Huie ve Di 2004). *G. lucidum* vücutta biriken toksinlerin atılması, güneş yanığı ve cilt hastalıklarına iyi gelmesi, güneşin zararlı ışınlarına karşı koruma özelliğinin olması, kas sistemini güçlendirmesi, bağışıklık sistemini güçlendirmesi, radyoterapi ve kemoterapinin yan etkilerinin azaltılması, mantar enfeksiyonlarının azaltılması, grip, soğuk algınlığı, hepatit, antibiyotiklerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmasında, tümör oluşumunu engellemede, diyabet tedavisinde, kolesterol düzenlemesinde ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Çelik 2016).

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 (Jong ve Birmingham 1992, Kim ve Kim 2002), bu bileşiklerin de immünomodülatör, analjezik, hipoglisemik, anti-fibrotik, anti-ülser, anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-bakteriyel, anti-viral, anti-oksidatif, radikal temizleyici ve anti-aging gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Jones ve Janardhanan 2000, Lin 2002, Lin ve Zhang 2004, Joseph ve ark 2011, Kwon ve Kim 2011). Ayrıca *Ganoderma* özütlerinin faydalarına bakıldığında, DNA sarmalının yapı bütünlüğünü koruyarak özellikle UV radyasyonu kökenli kırılmalara karşı da DNA'yı koruyucu etkisinin olduğu birçok araştırıcı tarafından gösterilmiştir (Shi ve ark 2002).

Siklofosfamid (Cyclophosphamide; CP) klinik uygulamalarda en çok kullanılan anti-kanser ajanlarından birisidir (Salvadori ve ark 1992). Lösemi, lenfoma, meme, akciğer, prostat ve yumurtalık kanseri gibi malignlere karşı etkili bir şekilde tedavi amacıyla kullanılan alkilleyici ajanlar arasında yer almaktadır (Khan ve ark 2004). Alkilleyici ajanlar içerdikleri alkil grubuyla DNA ile kovalent bağ oluşturmak üzere reaksiyona giren ve böylece DNA'ya hasar vererek hücre ölümünü indükleyen kimyasallardır (Corrie 2008). CP kullanımının hepatotoksisite, nefrotoksisite, kardiyotoksisite gibi ciddi fizyolojik yan etkileri bulunmaktadır

(Motawi ve ark 2010, Lameire ve ark 2011, Newton 2012). Diğer etkileri arasında mikronükleus oluşumu, apopitozis, serbest radikal üretilmesi, gen mutasyonları, kromozom anomalisi, kardeş kromatid değişimi ve DNA çift zincir kırığı oluşumu sayılabilir (Dursun ve ark 2013).

Çift zincir kırıkları; iyonize radyasyon ve genotoksik bileşenler gibi ekzojen kaynaklarla indüklenebildiği gibi hücresel metabolizmanın yan ürünleri olan reaktif oksijen türlerinin etkisiyle de oluşabilen kromozomal kırıklardır (Slupphaug ve ark 2003, Jeppesen ve ark 2011). Tamir edilemeyen çift zincir kırıkları hücre ölümüne neden olabilmektedir, bu nedenle tamiri önemlidir (Riemenschneider ve ark 2010). İnsanda çift zincir kırıklarının tamiri iki majör mekanizma ile sağlanmaktadır: Homolog rekombinasyon (HR) ve Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) (Jeppesen ve ark 2011, Iyama ve Wilson 2013). HR ve NHEJ çok farklı mekanizmalardır ve çok farklı protein faktörlerini gerektirmektedir. Çift zincir kırıklarının tamirinde hangi mekanizmanın seçileceği, hücre döngüsüne ya da her iki mekanizmanın kullanılabilir spesifik bileşenlerinin seviyesine bağlı olabilir (Slupphaug ve ark 2003, Jeppesen ve ark 2011).

HR kardeş kromatid ipliğini kalıp olarak kullanarak çift zincir kırık onarımının hatasız olarak yapılmasına izin verir. HR bölünen hücrelerde, homolog kardeş kromatide ulaşılabildiği zaman yani hücre döngüsünün S, G_2/M fazlarında gerçekleşmektedir (Slupphaug ve ark 2003, Jeppesen ve ark 2011).

NHEJ, hücre döngüsünden bağımsız olarak, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde görülebilirken, en aktif olduğu aşama G_1 fazıdır (Iyama ve Wilson 2013). NHEJ çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Bu tamir sistemi ile hasarlanmamış DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hataya meyilli olarak, birkaç nükleotid kaybı ile DNA onarımı gerçekleşmektedir (Slupphaug ve ark 2003, Jeppesen ve ark 2011).

XRCC3, RAD51, XPA, BRCA1, PARP1, MLH1 gibi genlerin başta geldiği, 84 adet genin DNA'nın tamirinde rol aldığı bilinmektedir. Bunlar arasında *Xpf* geni, tamir mekanizmaları arasında nükleotid eksizyon tamirinde (NER) görev aldığı bilinen en genel ve etkili gendir (Ferreira ve ark 2013). NER, ultraviyole (UV) ışığın neden olduğu deri kanserinden sorumlu DNA hasarlarının onarımı, sigara içenlerde akciğer kanserine yol açan benzo[a]piren guaninin oluşturduğu DNA hasarları, polisiklik karsinojenler, karaciğer kanserine neden olduğu belirtilen asetilaminofluoren guaninin oluşturduğu DNA hasarları, kanser tedavisinde

kullanılan bazı ajanların oluşturduğu DNA hasarları da bu mekanizma ile onarılmaktadır (de Boer ve Hoeijmakers 2000, Sancar ve ark 2004, Friedberg ve ark 2005).

Eksizyon tamir mekanizmasının aynı zamanda okside edici ve alkilleyici ajanlarla oluşan küçük baz lezyonlarının tamirinde, baz eksizyon onarım mekanizmasının yeterli olmadığı hallerde de etkili olduğu belirlenmiştir (Sancar 1996, Reardon ve ark 1997).

1.1. *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst

G. lucidum özellikle Uzak Doğu ülkelerinde 2000 yıldan fazladır (Wasser 2005) ekonomik öneme sahip olan önemli bir türdür (Çin, Japonya, Kore gibi). Çin ve Kore'de "Ling Zhi", Japonya'da "Reishi", ülkemizde ise "Ölümsüzlük Mantarı" olarak adlandırılmaktadır (Mushrooms 1995, Vasser ve ark 1997, Huie ve Di 2004). Yüzeyi parlak ve odunsu bir dokuya sahip olan, büyük ve koyu renkli bir mantardır. Latince "lucidus" sözcüğü "parlak" anlamına gelir ve mantar yüzeyinin vernikli görünümünü ifade etmektedir. Çince'de lingzhi, spiritüel güç ve ölümsüzlüğü temsil eder ve "ruhsal gücün otu" olarak kabul edilir. Yetiştirilen mantarlar arasında *G. lucidum*, farmasötik olarak benzersizdir. *G. lucidum* ürünleri tozlar, diyet takviyeleri ve çay gibi çeşitli ticari formlarda bulunur. Bunlar mantar, misel, sporlar ve meyve gövdesi gibi farklı bölgelerden üretilir (Wachtel-Galor ve ark 2011).

1.1.1. Habitat

Ganodermataceae familyası, çift duvarlı bir basidiospora sahip olan poliporlu mantar olarak tanımlanmaktadır (Moncalvo 2000). Ganoderma türleri ve meyve gövdesinin şekli ve rengi (kırmızı, siyah, mavi / yeşil, beyaz, sarı ve mor), konak spesifitesi ve coğrafi kökeni gibi farklı özelliklerde tüm dünya üzerinde bulunmaktadır (Zhao ve Zhang 1994, Woo ve ark 1999, Upton 2000). Bu yıllık mantar ölü ağaçlar üzerinde, özellikle Meşe, Elma, Karaağaç, Söğüt, Manolya gibi yaprak döken ağaçlar üzerinde geniş bir varyetede büyüme göstermektedir (Wasser 2005). Dünya genelinde 250'den fazla Ganoderma türü tanımlanmıştır (Moncalvo ve Ryvarden 1997, Vasser ve ark 1997). Ancak, terapötik uygulamada ve literatürde Ganoderma, genellikle *G. lucidum* türünü ifade etmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Yabani *G. lucidum*'un görünümü (Çelik 2016).

1.1.2. Tarihi ve Geleneksel Kullanım Alanları

G. lucidum Uzak Doğu ülkelerindeki halk tıbbında özellikle hepatopati, kronik hepatit, nefrit, hipertansiyon, artrit, nevrasteni, uykusuzluk, bronşit, astım ve gastrik ülser, koroner kalp rahatsızlığı, karsinoma, mantar zehirlenmesi (antidot) tedavisinde kullanılmaktadır (Ying ve ark 1987, Jong ve Birmingham 1992, Vasser ve ark 1997, Chang ve Buswell 1999, Gao ve Zhou 2002, McKenna ve ark 2002). Çin araştırmaları geçtiğimiz on yıl içerisinde yukarıdaki benzer kullanımlara ek olarak, yaşlanma karşıtı (anti-aging), beyin iskemi/reperfüzyon hasarı, kronik viral hepatit, hiperkolesterolemi, yaşlılıkta immünolojik fonksiyon, kemoterapi ile uyarılan toksisite, narkotik madde ile uyarılan immunasüpresyon, antikarsinojik ve antitümör aktivite, immünostimülasyon gibi alanlara odaklanmıştır (Ying ve ark 1987, Chang ve Buswell 1999, Liu 1999, Smith ve ark 2002, Gao ve ark 2004). *G. lucidum* renkleri temel alınarak, her biri farklı kullanım alanlarında olmak üzere, farklı tiplerde sınıflandırılmıştır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *G. lucidum'*un 6 tipi (Hsu HY 1985).

Renk	Tat	Japonca Adı	Kullanımı
Mavi	Ekşi	Aoshiba	Görme yeteneğini ve karaciğer fonksiyonunu arttırmada, sinirleri sakinleştirmede
Kırmızı	Acı	Akashiba	Hafızayı güçlendirmede, canlılığı arttırmada
Sarı	Tatlı	Kishiba	Dalak fonksiyonunu güçlendirmede
Beyaz	Acı	Shiroshiba	Karaciğer fonksiyonu arttırmada
Siyah	Tuzlu	Kuroshiba	Böbrekleri korumada
Mor	Tatlı	Murasakishiba	Kulak, eklem ve kasları güçlendirmede

1.1.3. *G. lucidum*'un Besin İçeriği

Mantarın ağırlığının yaklaşık %90'ı sudan oluşur. Geriye kalan %10'unun, %10-40'ı proteinden, %2-8'i yağdan, %3-28'i karbohidrattan, %3-32'i liften, %8-

10’u külden ve bazı vitaminler ve potasyum, kalsiyum, fosfor, magnezyum, selenyum, demir, çinko ve bakır gibi minerallerden oluşmaktadır (Borchers ve ark 1999). *G. lucidum* başlıca protein, yağ, karbohidrat ve lif içermektedir. Mizuno *G. lucidum*’un kuru ağırlığının %68,9‘unun folin - pozitif maddeden, %11’inin glukozdan, %7,3’ünün proteinden ve %10,2’sinin de Kalsiyum, Potasyum, Magnezyum gibi metallerden oluştuğunu bildirmiştir (Mizuno ve ark 1995). Bu sonuçlar diğer yazarlar tarafından da onaylanmaktadır (Mushrooms 1995, Chen 1999, Stamets 2000). *G. lucidum*’un kimyasal bileşenleri hakkında 300’ün üzerinde bildiri yayınlanmıştır. Ancak *G. lucidum* ürünlerinin kimyasal bileşiklerindeki nitel ve nicel farklılıklar kökenine, ekstraksiyon sürecine ve yetiştirme şartlarına bağlıdır (Mizuno ve ark 1995, Mushrooms 1995, Vasser ve ark 1997, Stamets 2000, McKenna ve ark 2002). Bunlara ek olarak mantarlar, terpenoidler, steroidler, fenoller, nükleotidler ve türevleri, glikoproteinler ve polisakaritler gibi çok çeşitli biyoaktif moleküller içerir. Mantar proteinleri gerekli olan tüm amino asitleri içerir ve özellikle lisin ve lösin açısından zengindir. Mantarların düşük yağ içeriği ve çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek oranı, mantarların sağlık değerine önemli katkı sağladığı düşünülmektedir (Chang ve Buswell 1996, Borchers ve ark 1999, Sanodiya ve ark 2009). Polisakaritler, peptidoglikanlar ve triterpenler, *G. lucidum’*da üç önemli fizyolojik olarak aktif bileşendir (Boh ve ark 2007, Zhou ve ark 2007).

1.1.3.1. Polisakkaritler ve Peptidoglikanlar

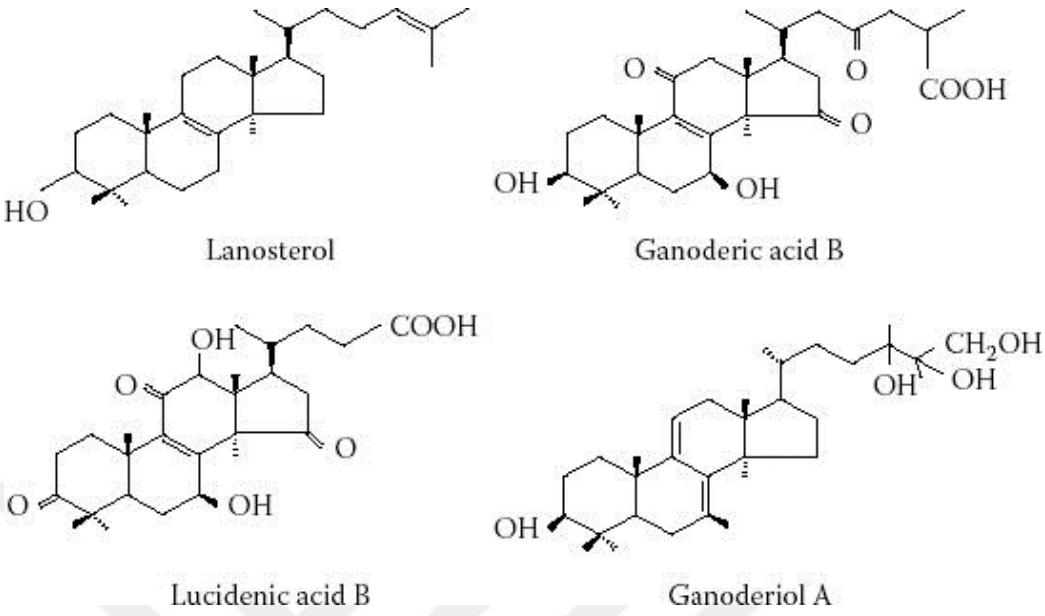
Mantarlar ürettikleri yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit yapı çeşitliliği açısından dikkat çekicidirler ve mantarın her yerinde biyoaktif poliglikanlar bulunmaktadır. Polisakkaritler, geniş kapsamlı fizikokimyasal özelliklere sahip olan yapısal olarak çeşitlilik gösteren biyolojik makromolekülleri temsil etmektedir (Zhou ve ark 2007). Çeşitli polisakkaritler *G. lucidum* özütünün meyvesinden, sporlarından ve misellerinden elde edilmiştir, şeker ve peptid kompozisyonları ile molekül ağırlığı bakımından farklılık gösterebilirler. *G. lucidum* polisakkaritlerinin (GL - PS) anti-inflamatuar, hipoglisemik, antiülser, antitümorijenik ve immünostimülasyon etkileri gibi geniş bir biyoaktiflik aralığı sergilediği bildirilmiştir (Miyazaki ve Nishijima 1981, Hikino ve ark 1985, Tomoda ve ark 1986, Bao ve ark 2001, Wachtel-Galor ve ark 2011). Polisakkaritler normalde mantardan sıcak su ile hazırlanan özütlerden, ardından etanol veya metanol ile çöktürme yoluyla elde edilir, ancak su ve alkali ile de hazırlanabilirler. GL - PS'lerin yapısal analizleri, glikozun ana şeker bileşeni

olduğuna işaret etmektedir (Bao ve ark 2001, Wang ve ark 2002). Bununla birlikte, GL-PS heteropolimerdir ve 1-3, 1-4 ve 1-6 bağlantılı β ve α-D (veya L) gibi farklı konformasyonlara sahip ksiloz, mannoz, galaktoz ve fukoz içerebilir (Lee ve ark 1999, Bao ve ark 2002). Bu polisakkaritlerin dallanma konformasyonları ve çözünürlük özellikleri antitümor özellikler gösterdiğini söylemektedir (Bao ve ark 2001, Zhang ve ark 2001). Mantar ayrıca, insan vücudu tarafından büyük ölçüde sindirilmeyen ve mantarın fiziksel sertliğinden sorumlu olan bir polisakkarit kitin kılıfından oluşur (Upton 2000). *G. lucidum*'dan elde edilen çok sayıda polisakkarit preparatları şimdi kanser ve karaciğer hastalığı da dahil olmak üzere kronik hastalıklar için reçetesiz tedavi olarak pazarlanmaktadır (Gao ve ark 2005).

1.1.3.2. Triterpenler

Terpenler, karbon iskeletleri bir ya da daha fazla izopren C5 birimlerinden meydana gelen, doğal olarak oluşan bileşiklerin bir sınıfıdır. Terpenlere örnek olarak mentol (monoterpen) ve β-karoten (tetraterpene) verilebilir. Birçoğu alkenlerdir, ancak bazıları diğer işlevsel grupları içerir ve birçoğu daireseldir. Bitki dünyasında yaygın olarak bulunan bu bileşikler ökaryotların yanı sıra prokaryotlarda da bulunur. Terpenlerin ayrıca anti-inflamatuar, antitümorijenik ve hipolipidemik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Mahato ve Sen 1997, Mashour ve ark 1998, Haralampidis ve ark 2002). Triterpenes terpenlerin bir alt sınıfıdır ve temel bir C30 iskeletine sahiptir. Birçok bitki türü normal büyüme ve gelişme programının bir parçası olarak triterpenleri sentezlemektedir (Mahato ve Sen 1997, Zhou ve ark 2007). *G. lucidum*'da, triterpenlerin kimyasal yapısı lanosteranın bir metaboliti olan lanostana dayanmakta ve biyosentezi ise skualen' in siklizasyonuna dayanmaktadır (Haralampidis ve ark 2002). Triterpenlerin eldesi genellikle metanol, etanol, aseton, kloroform, eter veya bu çözücülerin bir karışımı vasıtasıyla yapılmaktadır (Chen 1999, Su ve ark 2001). *G. lucidum*'dan izole edilen ilk triterpenler, A ve B ganoderik asitleri olup, bunlar Kubota ve ark tarafından izole edilmiştir (Kubota ve ark 1982). O zamandan beri bilinen kimyasal bileşimler ve moleküler konfigürasyonlara sahip 100'den fazla triterpenin *G. lucidum*'da olduğu bildirildi. Bunların arasındakilerden, 50'den fazlasının yeni ve bu mantar için benzersiz olduğu tespit edildi. Büyük çoğunluğunu ganoderik ve lüsidenik asit oluşturmaktadır, ancak ganoderaller, ganoderioller ve ganodermik asitler gibi diğer triterpenler de tespit edilmiştir (Şekil 1.2), (Nishitoba ve ark 1985, Sato ve ark 1986, Budavari ve ark 1989, González ve

ark 1999, Ma ve ark 2002, Akihisa ve ark 2007, Zhou ve ark 2007, Jiang ve ark 2008, Chen ve ark 2010).



Şekil 1.2. Lanosterolün kimyasal yapısı ve *G. lucidum*'dan izole edilen birkaç triterpen (Sato ve ark 1986, Budavari ve ark 1989).

G. lucidum triterpenler bakımından açıkça zengindir ve bitkinin acı tadına sahip olan bu bileşik sınıfı, lipid düşürücü ve antioksidan etkiler gibi sağlık açısından çeşitli yararlar getirdiğine inanılmaktadır. Bununla birlikte, triterpen içeriği mantarın çeşitli bölümlerinde ve büyüme aşamalarında farklılık göstermektedir. Bu farklı triterpen içeriği ayrıca çeşitli Ganoderma numunelerinin kalitesinin bir ölçümü olarak kullanılabilir (Chen 1999, Su ve ark 2001).

1.1.3.3. Diğer Bileşikler

G. lucidum'un elemental analizinde, fosfor, silika, sülfür, potasyum, kalsiyum ve magnezyumun ana mineral bileşenlerinin olduğu ortaya koyulmuştur. Bunların yanı sıra demir, sodyum, çinko, bakır, manganez ve stronsiyum düşük miktarlarda tespit edilmiştir, aynı şekilde ağır metallerden kurşun, kadmiyum ve civa da bulunmuştur (Chen ve ark 1998). *Ganoderma spp*'nin germanyum içeriği göz önünde bulundurulan bir çalışma yapılmıştır (Chiu ve ark 2000). Düşük dozlarda germanyum önemli bir unsur olmasa da, immünopentansif, antitümör, antioksidan ve antimutagenik aktivitelerle alakalı olduğu gözlenmiştir (Kolesnikova ve ark 1997).

G. lucidum'da protein ve lektin gibi rapor edilen, tıbbi etkisine katkıda bulunabilecek bazı bileşikler de içermektedir. Kurutulmuş *G. lucidum*'un protein içeriği %7-8 civarında bulunmuştur (Chang ve Buswell 1996, Mau ve ark 2001). Biyoaktif proteinlerin, miselyumdan saflaştırılmış bir bağışıklık baskılayıcı protein olan LZ-8 de dahil olmak üzere *G. lucidum*'un tıbbi özelliklerine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Van Der Hem ve ark 1995).

Kurutulmuş mantarın karbonhidrat ve lif içeriği incelenmiş ve sırasıyla %26-28 ve %59 olarak bulunmuştur (Mau ve ark 2001). Meyve gövdesinden ve mantar miselyumundan lektinler izole edilmiştir (Kawagishi ve ark 1997). Birçok hayvan, bitki türleri ve mikroorganizmalar lektin üretir ve geniş bir fonksiyon yelpazesi sergiler. Örneğin hayvanlarda, lektinler çeşitli hücresel süreçlerde bulunmakta ve bağışıklık sisteminin işleyişinde görev almaktadır (Wang ve ark 1998).

G. lucidum'dan izole edilen diğer bileşikler, metaloproteaz gibi pıhtılaşma süresini geciktiren enzimleri; Ergosterol (provitamin D2); Nükleozitler ve nükleotidleri de (adenozin ve guanozin) içermektedir (Wasser 2005, Paterson 2006). Ayrıca Kim ve Nho (2004) tarafından *G. lucidum* meyvelerinden yüksek oranda spesifik ve etkili bir geri dönüşümlü α-glukosidaz, SKG–3, inhibitörü izolasyon edilmiş ve fiziko-kimyasal özellikleri tarif edilmiştir (Fukuzawa ve ark 2008).

1.1.4. Terapötik Uygulamalar

G. lucidum'un, bağışıklık düzenleyici, antiaterosiklerotik, anti-inflamatuar, analjezik, kemopreventif, antitümör, radyoprotektif, uyku düzenleyici, antibakteriyel, antiviral (anti-HIV), hipolipidemik, antifibrotik, hepatoprotektif, diyabetik, antioksidan ve radikal temizleyici, anti-aging, hipoglisemik ve anti-ülser özelliklerinin olduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (Jong ve Birmingham 1992, Vasser ve ark 1997, Chang ve Buswell 1999, Wasser ve Weis 1999, McKenna ve ark 2002, Smith ve ark 2002, Wasser 2002, Gao ve ark 2004). Reishi lösemi, karsinom, hepatit ve diyabet tedavisinde alternatif bir adjuvan tedavi olarak tanınmaya başlamıştır (Jong ve Birmingham 1992, Wasser ve Weis 1999, Gao ve Zhou 2002, McKenna ve ark 2002, Smith ve ark 2002, Wasser 2002, Gao ve ark 2004).

G. lucidum'un hücresel DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyan biyolojik aktif bileşikler içerdiği bildirilmiştir (Shi ve ark 2002). Ganoderma özütlerinin faydalarına

bakıldığında ayrıca, DNA sarmalının yapı bütünlüğünü koruyarak özellikle UV radyasyonu kökenli kırılmalara karşı da DNA'yı koruyucu etkisinin olduğu birçok araştırıcı tarafından gösterilmiştir (Shi ve ark 2002). Aynı şekilde Kim ve Kim (1999) elde edilen özütün UV ışınları ve hidroksil radikali sonucu DNA'da oluşan kırıklara karşı koruma sağladığını bulmuşlardır.

Gama radyasyona maruz kalan insan lenfosit hücrelerinde DNA hasarına karşı sulu *G. lucidum* özütlerinin koruyucu etkisini comet testi ile test edilmiş ve sonuçta radyasyonun indüklediği DNA tek iplik kırılmalarına karşı *G. lucidum* sulu özütlerinin koruyucu etkisinin olduğunu tespit edilmiştir (Pillai ve ark 2006). Ratlarda *G. lucidium'*un katalazı artırdığı için antioksidan savunmayı sağladığı ve benzo[*a*]pyrene'nin sebep olduğu hepatik hasarı engellediği belirlenmiştir. Pillai ve ark (2008) tarafından plazmid DNA yöntemi ve fare kemik iliğinde mikronüklous yöntemiyle gama radyasyonun tetiklediği mikronükleus oluşumunun doza bağlı olarak *G. lucidum* polisakkaritleriyle azaltıldığı tespit edilmiştir. G. *lucidum* polisakkaritlerinin radyasyona karşı koruyucu yeni bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

G. lucidum özütünün farelerin karaciğer, böbrek gibi organlarında sitotoksik etki göstermediğini ve genotoksik etkiye sahip olmadığını belirlemişlerdir (Chiu ve ark 2000). Bir diğer çalışmada özüt tümörlü ve gama radyasyonla tedavi olan farelere yedirilmiş ve tümör hacminde gerileme gözlenmiştir. Ayrıca özüt verilen ve radyasyon tedavisi gören kanserli farelerin, beyin, kemik iliği ve kan hücreleri tümörlü doku hücreleri üzerinde comet testide uygulanmıştır. Tümörlü dokularla karşılaştırıldığında normal dokulardaki radyasyonun indüklediği hücresel DNA hasarlarında önemli azalma belirlenmiştir. Bu veriler ışığında *G. lucidum*'un tümörlerin küçülmesi ve normal dokularda radyasyonun tetiklediği hücresel hasarların engellenmesi için radyoterapi alanların yardımcı bir tedavi olarak bu mantarın özütlerinin kullanabileceği önerilmiştir (Gopakumar ve ark 2010).

G. lucidum'un antioksidan madde içeriği analiz edilmiş ve potansiyel antioksidan özelliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak *G. lucidum*'un etanol ile hazırlanan özütünün fark edilebilir bir oranda antioksidan bileşikler içerdiği ve bu bileşiklerin farklı serbest radikallere karşı iyi bir serbest radikal temizleyici etkileri olduğunu gösterilmiştir (Rajasekaran ve Kalaimagal 2011).

G. lucidum'dan izole elde edilen LZ-8 immunomodülatör proteini klonladıktan sonra, oluşturmuş oldukları rLZ-8'in A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. rLZ-8 hücreyi G_1 fazında durdurarak hücre büyümesini inhibe etmiştir. rLZ-8 ile muamele edilmiş A549 hücrelerinde *p53* ve *p21* gen ifadesi aktive olmuş ve her ikisi G_1 fazını durdurarak, p53'e bağlı büyümemenin gerçekleşmesine neden olduğu sonucuna varılmıştır (Xu ve ark 2011).

G. lucidum'un mevcut biyomedikal uygulamaları Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. *G. lucidum*'un mevcut biyomedikal uygulamaları (Mushrooms 1995, Vasser ve ark 1997, Chen 1999, Stamets 2000, Gao ve Zhou 2002, McKenna ve ark 2002, Gao ve ark 2004).

Uygulamalar	Gözlemlenen Etkiler
Rusya'da kozmonot tedavisi	**1.**İş kapasitesini arttır **2.**Psikolojiyi hızla iyileştirir
Kanser tedavisinde geleneksel kullanımı	**1.**Lökosit sayısını korur **2.**Bağışıklık sistemini geliştirir **3.**Kemoterapi toksisitesini azaltır ve kemoterapi ve radyasyon ile uyarılan lökopeniyi elemine eder **4.**Ameliyat sonrası iyileşmeyi hızlandırır **5.**Sakinleştirme, ağrıyı azaltma ve kanser hastalarının morfin bağımını azaltır **6.**Tekrar kötüleşmesini önler
Kardiovasküler hastalarda kullanımı	**1.**Kalbi genişletir ve kalp döngüsünü arttırır **2.**Kalp kasılmasının sıklığını arttırır **3.**Diğer ilaçlarla birlikte kalp kasılmasını düzenler **4.**Antihiperlipidemik, antihipoglisemik ve platelet kümeleşmesini önleyicidir **5.**Oksijen eksikliğinin önlenmesinde kullanılır
Bağışıklık düzenleyici etkileri	**1.**Antikanser **2.**Antiviral (anti-HIV) **3.**Antibakteriyal **4.**Anti inflamatuar **5.**Otoimmün hastalığı tedavisi **6.**Alerjik durumda histamin salınımını inhibe etme ve anafilaktik şoku önleme **7.**Kanserin hafifletilmesi ve hepatit B tedavisi
Oksijen kullanımı arttırma	**1.**Aşırı stresten, baş ağrısından, baş dönmesinden, mide bulantısından ve uykusuzluktan kurtarma **2.**Koroner arterlerin spazm sonucu bloke olmasını önlemede **3.**Düşük basınç koşullarını toleransında
Diğer örnekler	**1.**Diğer ilaçların kombinasyonu ile kullanımı **2.**Anti-aging, antioksidant **3.**Antidiabetik

1.2. Kanser ve Kemoterapötikler

Kanser, organizmanın savunma mekanizmalarının kesilmesi ve dengesinin bozulması durumunda, başlangıçta sağlıklı olan hücrelerin bedenin denetiminden çıkarak önü alınamaz bir büyüme ve yayılmasıyla karakterize olan ölümcül bir hastalıktır (Kearsley 1986, Murray ve Lopez 1997). Günümüzde dünya çapında kanser 7 ila 8 milyon arasında ölüm oluşturmaktadır ve Türkiye'de kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (Onkoloji Hemşire Derneği 2009).

Kanser tedavisi cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve biyolojik tedavi olmak üzere dört ana gruba ayrılır (Braunwald ve ark 2004). Kanser tedavisi büyük oranda kanser hücrelerini ortadan kaldırmak, tümör büyümesini azaltmak ve ağrı hafifletmek için kemoterapötik ilaçların kullanımına dayanmaktadır. İlk yaygın olarak kullanılan kanser ilaçları, I. ve II. Dünya Savaşı sırasında kimyasal savaş mağdurlarının incelenmesi sonucu 1940'larda keşfedilmiştir (Chabner ve Roberts Jr 2005).

Kanserojen etkenler ya doğrudan DNA hasarı yaparak (genotoksik etki) ya hücre proliferasyonunu artırarak ya da her ikisine birden neden olarak kanser riskini artırırlar (Manson ve ark 2000). Bugüne kadar insanda kanserojen olduğu tanımlanan ekzojen etkenlerin büyük kısmı genotoksik etkilidir (Ames ve Gold 1997). Genotoksik veya DNA reaktif karsinojenlerin oluşturduğu reaktif elektrofilik türevler ve serbest radikaller doğrudan DNA hasarı yaparlar. Bu lezyonların DNA onarım enzimleri tarafından uzaklaştırılması ve tamiri söz konusudur. Ancak onarım mekanizması tamamlanmadan hücrenin bölünmesi DNA hasarının kalıcı hale gelmesine ve mutasyona neden olur (Farber 1982, Ames ve Gold 1997).

Karşılaşılan temel sorunlardan birisi ise kemoterapötiklerin normal dokular üzerine de olan toksik etkileridir (Calabresi ve Welch 1962, Kızılcı 1999). Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların bazılarının kansere neden olduğu gerek insanlar üzerinde yapılan gözlemler gerekse hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Fairchild ve ark 1979, Kinlen ve ark 1981, Ehrenfried ve ark 1997, Furuta ve ark 2000, Watanabe ve ark 2001). Aslında kanser hücreleri ve normal hücreler benzer hücre sikluslarına sahiptirler. Kanser hücresiyle normal hücre arasındaki en önemli fark, kanser hücrelerinde proliferasyonu frenleyen mekanizmanın bulunmaması ve organizmayı ölüme götüren duraksız bir proliferasyon içinde olmasıdır (Çetik 2014).

Kemoterapötik ajanlar en fazla hücreler proliferatif dönemde iken etkilidirler. Bu bilgi, ilaçların geliştirilmesi sırasında önem taşımaktadır. Çünkü yaşam döngüsünün bir fazına spesifik etki eden ilaçlar (faz spesifik ilaçlar) ya da bütün fazlara etkili (faz spesifik olmayan) ilaçlar bu bilgiye göre geliştirilebilir. Yaşam döngüsünde faz spesifik olmayan kemoterapötik ilaçlar, özellikle alkilleyici ilaçlar türevleridir ki G_0 fazındaki hücrelere karşı da etkilidirler ve sadece aktif olarak bölünen hücrelere değil yavaş büyüyen tümörlere de kısmen etkili bulunmuşlardır (Akyol 2004).

Kemoterapötik ilaçları etkilerine göre iki grupta inceleyebiliriz:

1.2.1. Hücre siklusuna bağımlı ilaçlar

1. S fazına dönük ilaçlar (Antimetabolitler): Etkilerini hücrenin metabolizmasını ve DNA'nın sentezini bozarak göstermektediler. Bu gruba örnek olarak; 5-Flourourasil, Metotreksat, Prokarbazin, Sitarabin, 6-tiyoguanin ve 6-merkaptopürin verilebilir.

2. M fazına dönük ilaçlar (Bitki alkoloidleri): Etkilerini ana hücrenin mitoz bölünme ile iki yavru hücre oluşmasını engelleyerek göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak; Vinkristin ve Vinblastin verilebilir.

3. G_2 fazına dönük ilaçlar (Antitümör antibiyotikler): Etkilerini hücredeki DNA, RNA ve protein sentezini etkileyerek göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak; Aktinomisin-D, Bleomisin ve Daunorubisin verilebilir.

1.2.2. Hücre siklusuna bağımsız ilaçlar

1. Alkilleyici ajanlar: Etkilerini hücrenin çekirdeğini, DNA ve RNA'nın sentezini etkileyerek, yani hızlı çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarak göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak; Azotlu hardallar, Sisplatin, Prokarbazin ve Siklofosfamid verilebilir.

2. Hormonlar: Etkilerini tümörün büyüme ve çoğalma ortamını değiştirerek ve protein sentezini engelleyerek gerçekleştirmektedirler. Bu gruba örnek olarak; Estrojenler ve Kortikosteroidler verilebilir.

3. Antibiyotikler: Etkilerini DNA'nın replikasyonunu bozarak göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak; Adriamisin verilebilir (Akyol 2004).

1.2.3. Kemoterapötik İlaçların Kimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

1. Antimetabolitler: Hücre metabolitleri ile benzerlik gösterirler. Enzimler ile etkileşime girerek hücrelerdeki aktiviteyi bloke ederek, azaltarak ya da makromoleküllerin içine girerek, fonksiyonu olmayan bir makromolekül yaratarak etkilerini göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak; Cytrabine, Methoterxate, 6-Mercaptopurine ve 6-Tioguanine verilebilir.

2. Antitümör antibiyotikler: Hücrelerde gerçekleşmekte olan DNA ve RNA'nın transkripsiyonunu durdurup, dokularda uzun süre kalabilme yeteneklerinden ötürü hücrenin DNA sentezi boyunca ölümüne yol açmaktadır. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteyi artırmaktadır. Bu gruba örnek olarak; Actinomycin-D, Adriamycin, Bleomycin, Epirubicin ve İdarubicin verilebilir.

3. Kortikosteroidler: Etkilerini pasif difüzyonla hücre içine girip, glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak çekirdeğe geçerek ve orada DNA ile bağlanıp transkripsiyonunu bozarak göstermektedir.

4. Bitki alkoloidleri: Etkilerini hücreyi mitoz safhasında durdurarak göstermektedir. Bu gruba örnek olarak; Etoposide, Vinblastine, Vincristine ve Teniposide verilebilir..

5. Alkilleyici ajanlar: Sitotoksik etkilerini bünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerde yer alan nükleofilik parçasının geri dönüşsüz olarak bağlanmasıyla göstermektedir. Bu gruptaki ilaçlara örnek olarak; Busulfan, Carboplatin, Carmustine, Clorambusil, Cyclophashamide, Dacarbazine, Ifosfamide, Lomustine, Melphalan, Nitrojen mustard, Procarbazine, Tiotepa verilebilir (Akyol 2004).

Alkilleyici ilaçlar halen yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlarının en eski sınıfıdır ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde önemli bir rol oynarlar (Chaney ve Sancar 1996). Bifonksiyonel sitostatikler olarak tanımlanan bu bileşiklere, iyonize ışınların etkisini artırdıkları için "Radyomimetikler" de denir. Tıpkı iyonize ışınlarda olduğu gibi alkilleyici ajanlar bir taraftan tümör inhibisyonu yaparken diğer taraftan normal hücrede kanserojen özellik gösterirler (Kayaalp 2009). Alkilleyici antineoplastik ajanlar genel olarak hücre fonksiyonlarını amino, karboksil, sülfidril

ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak bozarlar. En sık bağlandıkları moleküller DNA, RNA ve proteinlerdir (Plowchalk ve Mattison 1991). Kemoterapötik ve sitotoksik etkileri doğrudan DNA'nın alkillenmesiyle ilgilidirler ve ipçikler arasında çapraz bağlara ve DNA sentezinin bozulmasına neden olurlar. Diğer etkiler arasında anormal baz eşleşmesi, DNA transkripsiyonunun engellenmesi, DNA iplikçiğinin kırılması ve baz çiftinin iptal edilmesi sayılabilir (Kayaalp 2009). Etkisini çoğalan hücreler üzerinde gösterirken faz spesifik etki göstermezler (Plowchalk ve Mattison 1991).

Kimyasal yapılarına göre 5 alt gruba ayrılarak incelenebilirler:

1. Azotlu hardallar (**Siklofosfamid**, ifosfamid, mekloretamin, melfalan, klorambusil),

2. Etileniminler ve metilmelaminler (Aziridin),

3. Alkil sülfonatlar (Busulfan),

4. Nitrozoüreler (Karmustin, lomustin, semustin, streptozosin),

5. Triazen ve hidrazin türevleri (Dakarbazin, prokarbazin) (Kayaalp 2009).

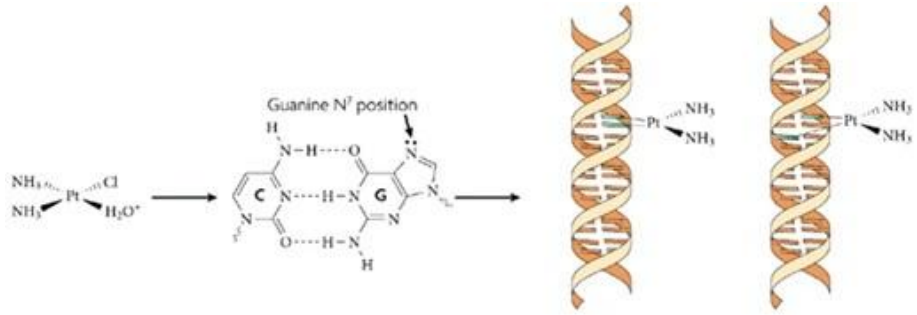
1.2.4. Siklofosfamid (Cyclophosphamide; CP)

CP, nitrojen mustard grubundan alkilleyici antineoplastik kemoterapötik bir ilaçtır. Tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine edilerek birçok neoplastik (kanser) ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde kullanılır (Levine ve Richie 1989, West 1997). Çizelge 1.3'de CP'in fiziksel ve kimyasal özellikleri özetlenmiştir (Wang ve ark 2009).

Çizelge 1.3. CP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Wang ve ark 2009).

CP'nin Fiziksel Ve Kimyasal Özellikleri	
Moleküler Formülü	$C_7H_{15}C_{l2}N_2O_2P$
Moleküler Ağırlık	261,09
Fiziksel Özellikler	Kokusuz, ince beyaz kristal toz
Erime Noktası	49,5 – 53 ºC
Kaynama Noktası	336 ºC
Yoğunluk	1,479 g/cm^3
Çözünürlük	Kloroform, dioksan ve glikoller içinde çözülür, benzen, karbon tetraklorürde hafifçe çözünür, eter ve asetonda çok az çözünür.
Bölüm Katsayısı	0,63
pKa	4,5-6,5
Stabilite	30ºC'nin üzerindeki sıcaklıklarda klor atomlarının ayrışmasıyla hidroliz meydana gelir. Oksidasyon, nem ve ışığa duyarlıdır.

CP, DNA kopyalanmasına ve DNA kopyalanmasına neden olan guanin N-7 pozisyonunun alkillenmesi vasıtasıyla etki eder ve DNA replikasyonunun inhibisyonunu sağlar (Şekil 1.3), (Chabner BA 2001).

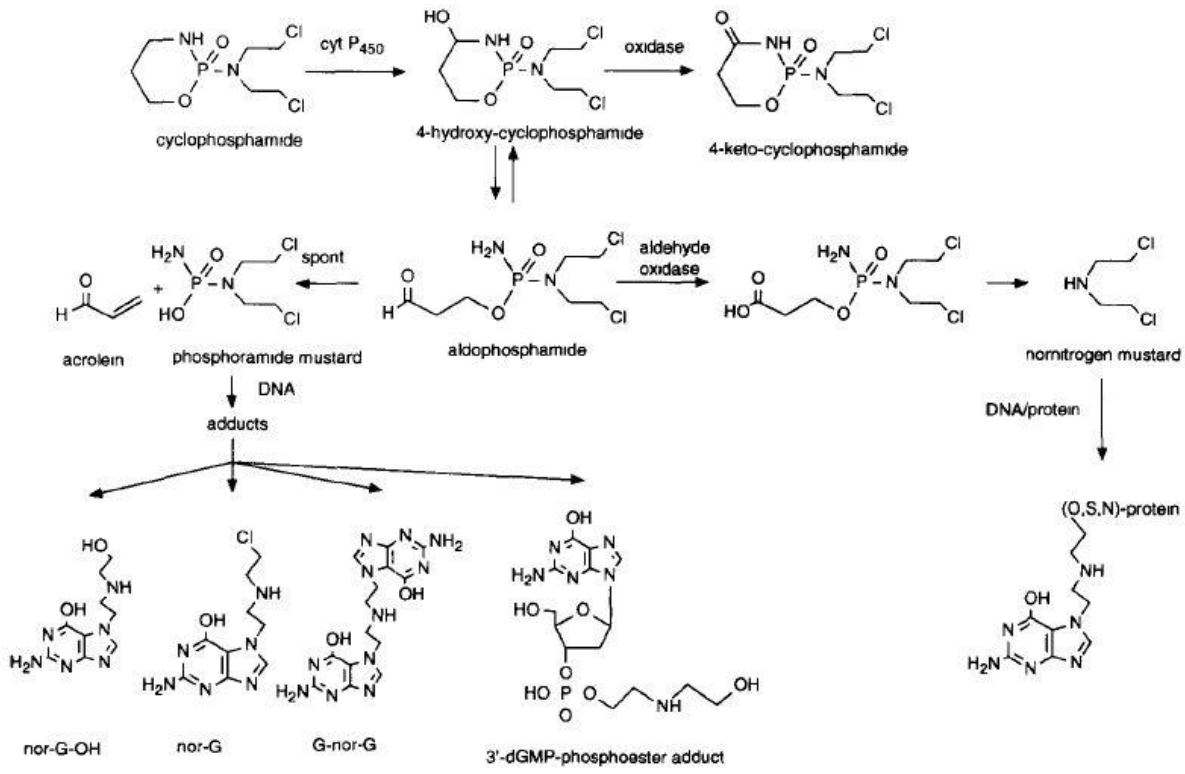


Şekil 1.3. DNA'nın alkilleyici ajanlar tarafından N7 pozisyonundan alkillenmesi (Kelland 2007).

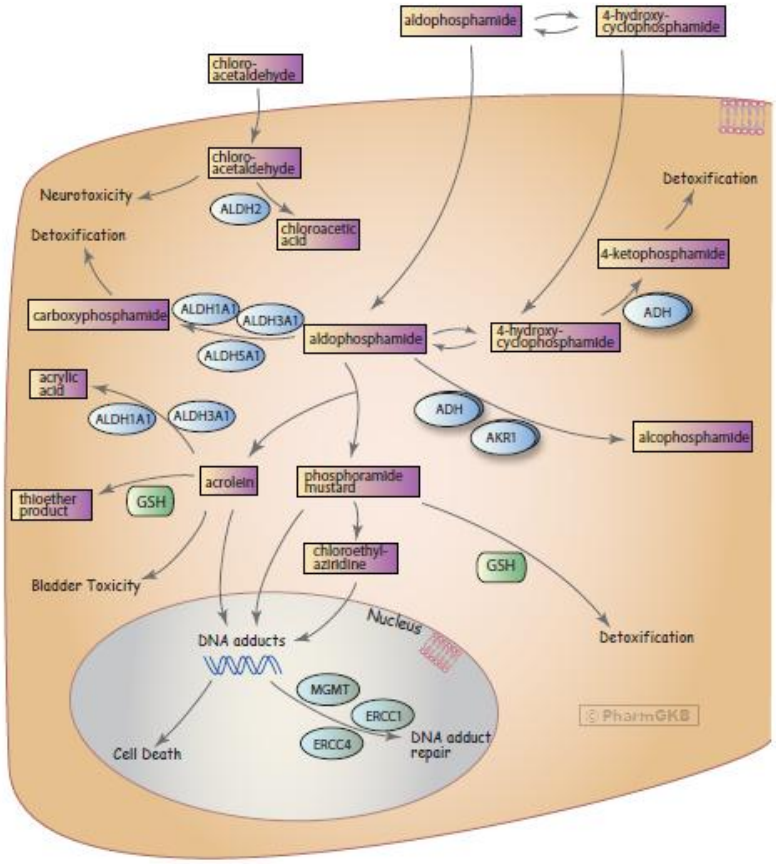
Sitofosfan olarak da bilinen CP, bir azot hardal alkile edici ajandır. Lösemi (Pass ve ark 2005), meme kanseri (Papaldo ve ark 2005), küçük hücreli akciğer kanseri (Amudha ve ark 2007), serviks kanseri (Morandi ve ark 2005), Hodgkin lenfoma (Chamorro-Cevallos ve ark 2008) tedavisinde kullanılmıştır. CP'in kullanımının geniş yan etkileri arasında mide bulantısı, kusma, alopesi, hematopoietik bastırma, karsinojenite (Papaldo ve ark 2005), nefrotoksisite (Amudha ve ark 2007), hepatotoksisite (Morandi ve ark 2005), immüno toksisite ve mutajenite (Chamorro-Cevallos ve ark 2008), ürotoksite, kardiyotoksisite görülmüştür. Bununla birlikte bazı raporlar, CP'in geçici veya kısmen kalıcı steriliteye neden olabileceğini (Meistrich ve ark 1992) ve kromozom hasarı (Franke ve ark 2005) mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi (Rehman ve ark 2012) oluşturduğunu, Zhang ve ark tarafından (2008) ise birçok fare hücresinde DNA iplikçik kırıkları ürettiği gösterilmiştir. Akut CP maruziyetinin, Aguilar-Mahecha ve ark (2001) tarafından spermatidlerdeki gen ifadesini çarpıcı biçimde etkilediği ve DNA tamir genlerinin ifadesini uyardığı gösterilmiştir.

CP gastrointestinal sistemden ve parenteral bölgeden iyi absorbe edilir. Karaciğerde metabolize olur ve 48 saat içinde böbrekler tarafından atılır (%36-99). Uygulanan dozun %3-25'i ana bileşik olarak atılır. CP en üst düzeyde serum konsantrasyonları, oral uygulama sonrası 1 saat içinde gözlenir (Chabner BA 2001) ve damar içi uygulama sonrası 2-3 saat içinde tepe düzeyindeki metabolitlere ulaşılır (Sifton 2000). CP kemoterapisinin başlıca kısıtlılığı, normal dokunun da yaralanması nedeniyle çoklu organ toksisitesine yol açmasıdır (Das ve ark 2002).

CP, karaciğerde sitokrom P-450 enzimleri ile 4-hidroksi-siklofosfamid'e aktive edilir ve bu da aldofosfamide izomerleşir. Aldophosphamid, alkilleyici ajan olan fosforamid mustardına (FAM) ve mesaneyi etkileyen sitotoksik bir parçaya dönüşen akroleine (ACR) dönüştürülür (Şekil 1.4), (Chabner BA 2001). Bu kimyasalın anti-neoplastik etkileri FAM ile ilişkiliyken, akrolein toksik yan etkileri ile bağlantılıdır (Kern ve Kehrer 2002). Bazı araştırmacılar bu metabolitlerin tercihen DNA'nın guanin kalıntısının N7 konumunu alkillediğini ve bunun, DNA zincir kırıklarına, DNA-protein çapraz bağları ve DNA adüktü (kansere neden olan kimyasal ajanların DNA'ya kovalent bağlanması) oluşumuna yol açtığı ve DNA sentezini durdurduğu rapor etmişlerdir (Şekil 1.5), (Maccubbin ve ark 1991, Selvakumar ve ark 2006). Bu toksik yan etkileri önlemek için veya ortadan kaldırmak için CP, tipik olarak çeşitli detoksifikasyon ve koruyucu ajanlarla birlikte kullanılır.



Şekil 1.4. CP'nin karaciğerde sitokrom P-450 enzimleri ile aktivasyonu (Povirk ve Shuker 1994).



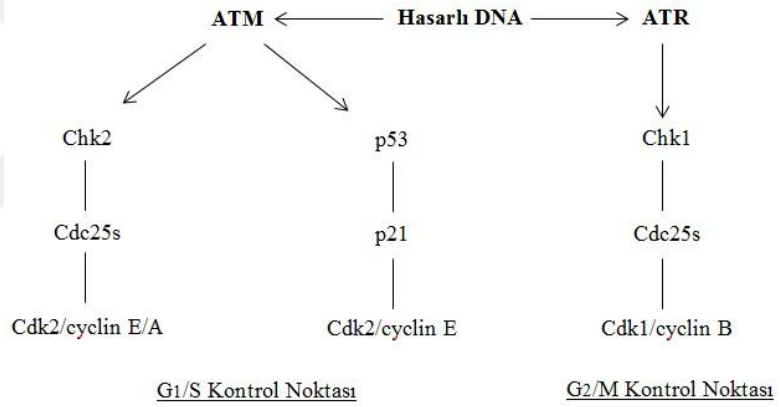
Şekil 1.5. CP'nin aktivasyonu sonrası etki yolağı (Whirl-Carrillo ve ark 2012).

1.3. DNA Onarım Mekanizmaları

İnsan genomu, yaşam için gerekli olan bilgileri taşıyan kalıtsal makromolekül olan DNA'dan oluşmaktadır. DNA, bilinen tüm canlı organizmaların gelişimi, işleyişi ve hayatta kalması için gerekli olan genetik bilgiyi kodlar (Swift ve Golsteyn 2014). Bir memeli genomunda her gün yaklaşık olarak 10^5'den fazla endojen ve ekzojen kaynaklı DNA hasarının ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Lindahl 1993). Endojen faktörler arasında; hücrenin DNA'sında spontan olarak meydana gelen hatalar, metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri, alkilasyon ajanları ile östrojen ve kolestrol metabolitleri sayılabilmektedir (De Bont ve Van Larebeke 2004, Hoeijmakers 2009, Iyama ve Wilson 2013). Ekzojen faktörler ise; UV ışığı, iyonize radyasyon, kemoterapötik ilaçlar, ağır metaller, hava kirliliği, sigara dumanı olabilmektedir (Hoeijmakers 2009, Ciccia ve Elledge 2010, Jeppesen ve ark 2011, Iyama ve Wilson 2013).

DNA'daki hasarlar; tek baz değişimi (deaminasyon, depürinasyon, baz alkilasyonu, delesyon, insersiyon gibi), tek veya çift zincir kırıkları, aynı veya farklı DNA zincirleri arasında çapraz bağlanma gibi gruplara ayrılmaktadır (Sancar ve ark

2004, Ciccia ve Elledge 2010). Hasarın yoğunluğuna ve tipine bağlı olarak DNA hasar cevabı (DDR) olarak adlandırılan sistemde görevli proteinler ile birlikte DNA'da meydana gelen lezyon algılanıp, hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değişmesi, DNA tamirinin uyarılması, programlı hücre ölümü, kanser ve yaşlanma gibi olaylar meydana gelmektedir (a] Hasarı tanımlama, b] Transdüksiyon yolakların aktivasyonu ve c] DNA hasarı onarımı) (Hopfner ve ark 2002). Hücre bölünmesi sırasında hasar gören DNA'nın yeni hücreye geçmesini önlemek için hasarlı DNA'nın onarımı hücre döngüsünü durdurmak için döngünün kontrol noktasının aktivasyonuna ve aynı zamanda onarım yolaklarına bağlıdır. Hücre döngüsü kontrol noktaları G_1/S fazında veya G_2/M fazında etkinleştirilebilir (Kastan ve Bartek 2004). Hasar gören DNA'ya verilen yanıt, Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) aile üyeleri, mutasyona uğramış ataksi telenjiektaz (ATM) ve ATM ve Rad3 ile ilişkili (ATR) uyarıcılar tarafından başlatılır (Şekil 1.6).

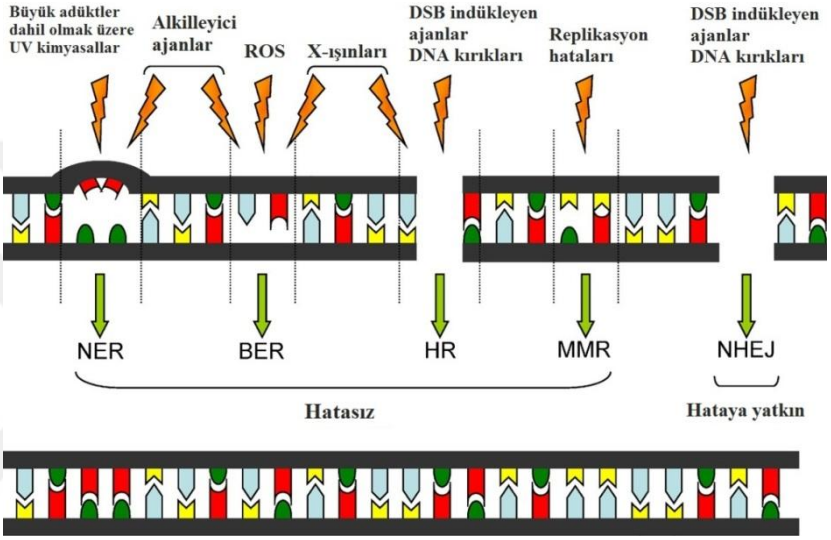


Şekil 1.6. DNA hasar yanıtına (DDR) genel bir bakış (Kastan ve Bartek 2004, Woods ve Turchi 2013).

ATR, DNA'da oluşan çapraz bağ, adükt ve kopmalar gibi DNA hasarlarına yanıt verdiği için G_2/M kontrol noktasının esas faktörü olarak kabul edilir. Çünkü durağan replikasyon çatalında veya çift zincir kırığı onarımda uç ekleme sürecinde yer alan tek iplik DNA' yi (ssDNA) belirler. ATR, UV ışığı (Smith ve ark 2010), alkilleyici ajanlar (Yoshioka ve ark 2006) ve platin ilaçları (Wagner ve Karnitz 2009) gibi DNA'ya zarar verici ajanlar tarafından aktive edilir ve ayrıca ATM ile çift zincir kırığı tamirine (DSB) cevap vererek aktive olmaktadır (Jazayeri ve ark 2006, Myers ve Cortez 2006). Hücreler bu tür zararlı sonuçları önlemek, spesifik DNA lezyonlarını gidermek ve genom bütünlüğünü korumak için çoklu-aşamalı bir süreç

ile yürütülen, doğru zamanda, doğru yerde ve en önemlisi doğru faktörleri aktive etmek için bir dizi DNA onarım yolları geliştirmişlerdir (Ghosal ve Chen 2013, Iyama ve Wilson 2013). DNA onarımını nükleaz, helikaz, polimeraz, topoizomeraz, ligaz, glikozilaz, kinaz ve fosfataz gibi çeşitli enzimler görev alarak gerçekleştirmektedir (Ciccia ve Elledge 2010, Symington ve Gautier 2011, Kamileri ve ark 2012, Dianov ve Hübscher 2013, Kottemann ve Smogorzewska 2013).

Onarım mekanizmaları doğrudan ve dolaylı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. DNA onarım mekanizmaları (Melis ve ark 2011).

1.3.1. Doğrudan Onarım Mekanizmaları

Fotoreaktivasyon İle Onarım: Bu onarım sisteminde fotoliyaz enzimleri kullanılarak UV kaynaklı siklobütan pirimidin dimerleri ve (6-4) fotoürünlerin uzaklaştırılması gerçekleştirilmektedir (Morita ve ark 2010). Fotoreaktivasyonla onarım insan dahil ökaryotların çoğunda bulunmamasına karşın, bakteri, mantar ve bitkilerde karşılaşılmaktadır (Sancar ve ark 2004).

O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz (O6-MGMT) İle Onarım: MGMT memeli hücre ve dokularında DNA alkilasyon ajanlarının (Metilasyon ajanları, kloroetilasyon ajanları) zararlı etkilerine karşı koruyucu bir rol oynamaktadır (Liu ve Gerson 2006, Hansen ve ark 2007). Klinikte yaygın kullanıma sahip olan alkilasyon ajanları hem DNA omurgası içindeki fosfodiester gruplarının oksijeni ile, nükleik

asitlerin ise nitrojen ve oksijen içeren nükleofilik bölgeleriyle reaksiyona girerek hem de RNA ve protein gibi makromoleküllere alkil gruplarını transfer ederek etkilerini göstermektedirler (Hansen ve ark 2007). MGMT molekülü, alkil eklentilerini kendi üzerindeki sistein amino asidine transfer ederek alkilasyonun mutajenik etkisini ortadan kaldırmaktadır (Slupphaug ve ark 2003, Sancar ve ark 2004, Hansen ve ark 2007).

1.3.2. Dolaylı Onarım Mekanizmaları

Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR): DNA onarım mekanizmaları içerisinde yer alan MMR, yanlış baz eşleşmeleri ile DNA'nın replikasyonu ve rekombinasyonu esnasında ortaya çıkan insersiyon veya delesyon mutasyonlarının uzaklaştırılmasında görev almaktadır. MMR sisteminde hatalar hücrenin yapısını ve fonksiyonlarını etkileyebilmekte, tümör oluşumu veya dejeneratif hastalıklar meydana gelebilmektedir (Martin ve ark 2010, Jemal ve ark 2011, Jeppesen ve ark 2011).

Rekombinasyonel Onarım:

1. Homolog Rekombinasyon (HR): HR bölünen hücrelerde, hücre döngüsünün S ve G_2/M fazlarında gerçekleşmekte ve kardeş kromatid iplikçiğini kalıp olarak kullandığı için çift zincir kırık onarımının (DSB) hatasız olarak yapılmasına izin vermektedir (Luqmani 2005). Bunların dışında replikasyon çatalının korunması, telomer bakımı ve Mayoz I'de kromozom dağılımının korunmasında da rol oynamaktadır (Slupphaug ve ark 2003, Jeppesen ve ark 2011).

2. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ): NHEJ, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde, hücre döngünün en aktif olduğu aşama olan G_1 fazında gerçekleşmektedir (Iyama ve Wilson 2013). NHEJ çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar. Bu tamir sisteminin hataya meyilli onarımı, tamir sırasında DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hücre döngüsünden bağımsız olarak gerçekleştiği içindir (Slupphaug ve ark 2003, Szakács ve ark 2006, Jeppesen ve ark 2011).

Kesip-Çıkarma Onarımı:

1. Baz Eksizyon Tamiri (BER): BER ile DNA büyük çapta olmayan modifikasyonları olarak adlandırılan alkilasyon, deaminasyon, oksidasyon ve DNA

replikasyon hatalarının neden olduğu modifikasyonlar tamir edilmektedir (Weissman ve ark 2007, Morita ve ark 2010, Jeppesen ve ark 2011). BER mekanizmasında görev alan enzimler; DNA glikozilaz, AP endonükleaz (AP DNA liyaz), DNA polimeraz ve DNA ligazdır (Robertson ve ark 2009).

2. Nükleotid Eksizyon Tamiri (NER): NER sistemi, UV ile indüklenmiş pirimidin dimerlerini ya da hem mutajenik kimyasalların hem de kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA eklentilerinden kaynaklanan çift zincirli yapısındaki hasarın onarımını gerçekleştirmektedir (Kahlem ve ark 2004, Hoeijmakers 2009, Morita ve ark 2010, Iyama ve Wilson 2013). Kemoterapötik ajan sınıfına dahil olan alkile edici maddeler, kovalent olarak alkil gruplarını DNA bazlarına aktaran elektrofillerdir (Kondo ve ark 2010). Baz alkilasyonunun etkisi alkilleyici ajanın tek işlevli (monofunctional) veya çift işlevli (bifunctional) olup olmadığına bağlıdır. Tek işlevli alkile edici ajanlar, tekli bazları genellikle adenin ve guanin N7 pozisyonundan modifiye eder ve hacimli (bulky) DNA adüktlerine neden olurken, iki işlevli alkile edici maddeler DNA'nın iki farklı bazıyla reaksiyona girerek çapraz bağlanmış DNA'ya yol açarlar (Helleday 2012). CP iki reaktif bölgeye sahiptir, guanin-guanin ve guanin-adenin bazları üzerinden DNA'yı ya proteinlerle çapraz bağlayarak ya da iki DNA bazını aynı DNA ipliğinde veya karşıt DNA iplikçiklerinde çapraz olarak bağlayarak zincirler arası çapraz bağlar (ICL) oluşturan DNA'ya zarar veren iki işlevli alkile edici ajan sınıfında yer almaktadır (O'Connor ve Kohn 1990, Frei ve Holland 2003). DNA'daki onarım basamakları bütün türlerde aynı olmakla birlikte onarımda işlev gören proteinler ve sayıları türlere göre farklılık göstermektedir (Huang ve ark 1992, Öğrünç ve ark 1998). NER yolağında, yaklaşık olarak 30 farklı protein işlev görmektedir (Aboussekhra ve ark 1995). Xeroderma Pigmentosum F (XPF) proteini bunlardan biridir.

1.3.3. *Xpf* (*Ercc4*) Geni

Ercc4 geni, iki farklı stratejiyle izole edilmiştir. İlk olarak, ERCC1 proteini *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)'den gelen RAD10 proteininin homoloğu olarak bilinmekteydi. Daha sonra Biggerstaff ve ark (1993)'nın yaptıkları bir çalışmada çin hamster ovaryumu (CHO) komplement grup 4 genindeki (*Ercc4*) mutasyonun, *Xpf* genindeki mutasyonlar ile aynı olduğu bulunmasıyla *Ercc1*'in *Ercc4 (Xpf)* ile birlikte çalıştığının ve sonrasında *Ercc4*'ün *S. cerevisiae*'deki *RAD1*'in

bir homoloğu olduğunun fark edilmesine yol açmıştır. Sonuç olarak, *RAD10*'un *S. cerevisiae'*nin NER'de rol oynayan bir nükleaz olan RAD1 proteini ile ilişkili olduğunun keşfedilmesinden ötürü önemli bir buluş olmuştur (Çizelge 1.4), (Bardwell ve ark 1993, Tomkinson ve ark 1993). *Ercc1* ve *Ercc4* genleri DNA hasarının onarımında ve genetik stabilitenin korunmasında önemli bir rol oynayan ERCC1-XPF nükleazın iki alt birimini kodlamaktadır. ERCC1-XPF kompleks halde bulunarak NER'de merkezi bir rol oynar (Friedberg ve ark 2005).

Xpf geni, *Gallus gallus* (civciv)'da 14.'üncü kromozomun üzerinde bulunur ve 12 ekzondan oluşmaktadır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/416420). XPF, NER'in dışında aynı zamanda, zincirler arasında çapraz bağlanma (ICL) onarımında, BER, HR ve NHEJ ile DSB onarımının bazı yolaklarında yedek enzim olarak ve telomer uzunluğunun düzenlemesinde rol oynamaktadır (Manandhar ve ark 2015).

Çizelge 1.4. *ERCC1* ve *ERCC4* Genin Ortologları (Manandhar ve ark 2015).

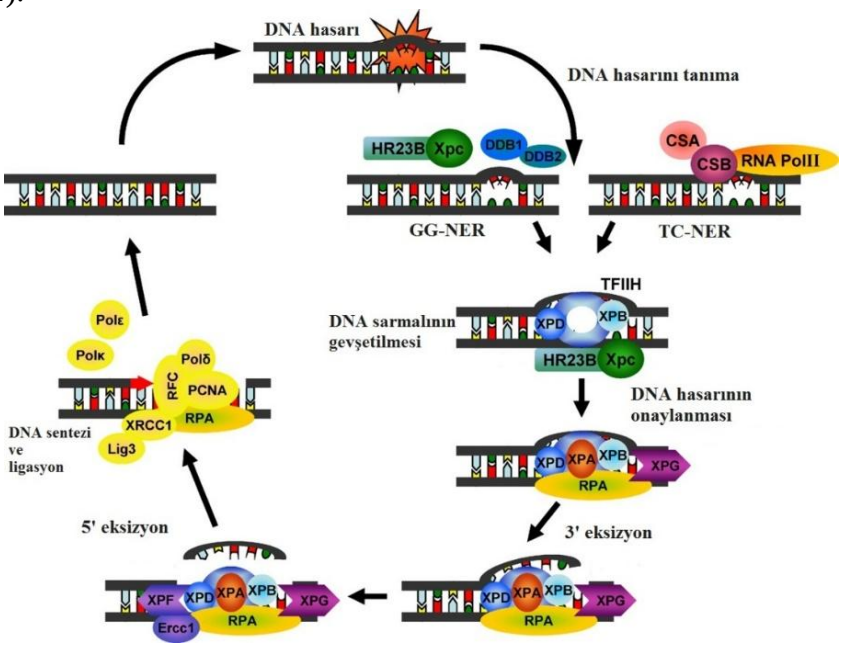
İnsan	**Fare**	***Drosophila***	***S. cerevisiae***	***Gallus gallus***
ERCC1	*Ercc1*	*Ercc1*	*RAD10*	*Ercc1*
ERCC4/XPF	*Ercc4*	*Mei-9*	*RAD1*	*Xpf*

1.3.4. *Xpf* Geninin Biyolojik İşlevleri

1.3.4.1. XPF'nin NER'deki Rolü

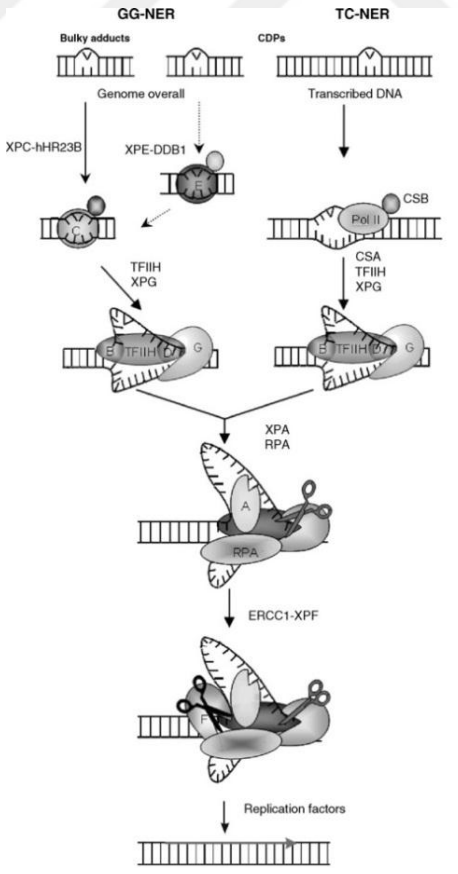
XPF proteini, UV radyasyona maruz kalmanın ve kovalent bağlanarak sarmalın yapısını bozan kimyasal ajanların neden olduğu DNA hasarını ortadan kaldırılmasında görev alan NER'de merkezi bir rol oynamaktadır (Friedberg ve ark 2005, Schärer 2013). Eksizyon onarım mekanizması; a] Hasarın tanınması, b] Ekzonükleaz enzimlerin aktivitesiyle çift yönlü kesimin gerçekleştirilmesi, c] Hasarı içeren oligonükleotid parçanın kesip çıkartılarak uzaklaştırılması, d] DNA polimeraz tarafından tamir bölgesinde oluşan boşluğun doldurulması ve e] Oluşan çentiğin ligasyonu gibi basamaklarından oluşmaktadır (Kulaksiz ve Sancar 2007). Onarım faktörleri normalde hasarlı olan veya olmayan DNA' ya bağlanma özelliği göstermektedir. Bu nedenle hasarlı olan bölgenin ayırımının yapılması önem taşımaktadır ve insan tamir mekanizmasında hasarı tanıma ve hasarlı olan bölgenin oligonükleotid parçası olarak (yaklaşık 24-32 nükleotid) çıkartılması, altı adet

onarım faktörü ile sağlanmaktadır (Sancar ve ark 2004). Bu proteinler Xeroderma Pigmentosum Grup A (XPA), Xeroderma Pigmentosum Grup C (XPC), Xeroderma Pigmentosum Grup G (XPG), Transkripsiyon Faktörü IIH (TFIIH), Replikasyon Proteini A (RPA), Xeroderma Pigmentosum Grup F ile Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency Complemantation Group 1 (ERCC1) kompleks halde (ERCC1-XPF) tanımlanmıştır (Sancar ve ark 2004, Sancar ve Reardon 2004). XPC proteinleri tamir mekanizmasındaki en önemli kısım olan hasar tanıma basamağında XPA, RPA, TFIIH ile kompleks halde bulunarak iş görmektedirler (Sancar ve ark 2004). O bölgede hasar bulunmaması durumunda ise TFIIH'nin alt üniteleri olan XPB ve XPD proteinler yardımıyla bölgeden ayrılır. Ancak DNA hasar içeriyorsa bu durumda ATP hidrolizi ve XPB ve XPD proteinleri yardımıyla çift zincir DNA'daki hasar içeren bölgedeki yaklaşık 20-25 nt'lik kısım çözülerek burada bir tamir kabarcığı oluşturur. XPC proteini bölgeden ayrılır ve yerine XPG proteini komplekse katılır, hemen ardından ERCC1-XPF proteinin de bu komplekse eklenmesiyle XPG proteini hasarın 3' yönündeki fosfodiester bağından, ERCC1-XPF proteinleri ise 5' yönündeki bağından (yaklaşık 24-32 nt'lik oligomer) iki yönlü kesilerek bölgeden ayrılır (Mu ve ark 1996). Oluşan boşluk Replikasyon Proteini C (RPC) ve DNA Polimeraz ε/δ tarafından doldurulur. Son olarak DNA ligaz I ile ligasyon gerçekleştirilir (Şekil 1.8), (Sancar ve ark 2004, Sancar ve Reardon 2004).



Şekil 1.8. DNA hasarının NER mekanizması ile onarımı, CSA; Cockayne Syndrome A, CSB; Cockayne Syndrome B (Melis ve ark 2011).

NER mekanizması yalnızca DNA'daki hasarının tanınmasında farklılık gösteren iki alt yolağa sahiptir; Transkripsiyona Kenetlenmiş NER (TC-NER) ve Global Genom NER (GG-NER) (Rocha ve ark 2013). TC-NER ile aktif olarak transkribe edilen genlerin tamiri gerçekleşmekte iken, GG-NER ile genom boyunca meydana gelen DNA hasarlarının tanınması ve uzaklaştırılması gerçekleştirilmektedir (Jeppesen ve ark 2011). TC-NER'de transkripsiyonda olan DNA sarmalındaki yapı bozukluğu RNA polimeraz II tarafından tanınır ve daha sonra CSA, CSB, TFIIH, XPA ve RPA dahil olmak üzere diğer onarım proteinleri hasar gören bölgeye yönlendirilir. GG-NER'deki fark ise bölgedeki hasarın XPC-RAD23B protein kompleksi tarafından fark edilmesidir (Hanawalt ve Spivak 2008). TC-NER mekanizması DNA transkribe olurken gerçekleştiği için daha hızlı ve daha etkili olduğu düşünülmekte iken, GG-NER genomun tamamındaki hasarı taradığı için nispeten yavaş ve daha az verimli bir işlem olarak düşünülmektedir (Guarente LP 2008). TC-NER'deki defektler, nadir görülen kalıtsal bozukluk Cockayne Sendromu (CS) ile ilişkili iken, GG-NER defekleri veya toplam NER eksiklikleri, Xeroderma Pigmentosum (XP) ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 1.9), (Bootsma 2001).



Şekil 1.9. TC-NER ile GG-NER onarım yolağı mekanizması (Wijnhoven ve ark 2007).

1.3.4.2. XPF'nin Çift İplik Kırıklarının Onarımındaki Rolü

Mutant ERCC1-XPF proteinine sahip memeli hücreleri, x-ışınları ve γ-ışınları tarafından üretilen radyasyona ve DSB'ye neden olan ajanlara karşı hem HR hem de NHEJ yolaklarında normalden daha duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Wood ve ark 1983, Murray ve Rosenberg 1996, Ahmad ve ark 2008). ERCC1-XPF proteinin kompleksinin DSB onarımındaki önemi ilk olarak, *S. cerevisiae*'deki RAD1 ve RAD10 genindeki mutasyonlarda gözlemlenmiştir (Schiestl ve Prakash 1990, Bardwell ve ark 1994). ERCC1-XPF protein eksikliği olan fareler iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra, DSB göstergesi olan histon H2AX fosforilasyonu (γH2AX) seviyesinde artış göstermenin yanı sıra zincir kırığının sonucu olarak kromozomal anormallikler de göstermiştir (Ahmad ve ark 2008). Bu veriler bize *Ercc1-Xpf* geninin bir veya daha fazla DSB onarım yolağında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. ERCC1-XPF ekzonükleazı memeli hücrelerinde, DSB'lerin homolog olmayan 3' uçlarının çıkarılmasında rol oynar. Bu uç düzenleme, klasik Ku70-Ku80 yolundan bağımsız olarak "alternatif bir uç ekleme" yolu ile ilerlemektedir (Ahmad ve ark 2008, Bennardo ve ark 2008).

1.3.4.3. XPF'nin Zincirler Arası Çapraz Bağ (ICL) Onarımındaki Rolü

ICL onarımı, DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonunu engellemesi nedeniyle zordur (Douwel ve ark 2014, Hodskinson ve ark 2014). Diğer NER proteinlerinde yapısal bozukluğu olan hücreler, ICL indükleyici ajanlara nispeten daha az duyarlı olmasına rağmen (Andersson ve ark 1996), ERCC1 ve XPF proteinlerinde eksikliği olan hücreler, ICL'leri oluşturabilen sisplatin, psoralen, mitomisin C ve CP gibi ajanlara son derece duyarlıdır (Wood 2010). ICL tamir mekanizması etkili tamir için Fanconi Anemia (FA), NER, translezyon sentezi (TLS) ve HR tamirinin kombinasyonlarını gerektiren karmaşık bir tamir mekanizmasıdır. NER proteinlerinden ERCC1-XPF'nin bu tamir mekanizmasındaki rolü, bir aralık oluşturmak için çapraz bağın her iki tarafında kesiler oluşturmaktır (Thompson ve Hinz 2009). Bu da bize ERCC1-XPF kompleksinin NER yolağından bağımsız olarak ICL onarımında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Ahmad ve ark 2008, Fisher ve ark 2008, Rahn ve ark 2010). Tüm bunlara ek olarak, ERCC1-XPF proteini ubikinleştirilmiş FANCD2 ile işbirliği içinde, ICL onarımı sırasında bir iskelet olarak

görev alan SLX4 proteini ile etkileşime girer (Douwel ve ark 2014). Hodskinson ve ark (2014) ve Douwel ve ark (2014) tarafından, ERCC1-XPF, SLX4'ün N-terminal ucuna bağlanarak ve fare hücrelerinde nükleaz kompleksinin aktivitesini arttırıldığı gösterilmiştir.

1.3.4.4. XPF'nin BER'deki Rolü

Hücrelerin reaktif oksijen ve azot türlerine maruz kalması DNA'daki bazların ve şeker fosfat omurgasının zarar görmesine neden olur. OGG1, NEIL1 ve NTH1 gibi bazı DNA glikozilazları, oksitlenmiş bazları çıkarabilir ve AP liyaz aktivitesi ile bazları parçalayarak apürinik/apirimidinik (AP) alan oluşumu ile sonuçlabilir. Bu 3' ucunu, bir deoksiriboz fosfat gibi bir hidroksil olmayan grup ile bırakır. Ancak onarımın tam olarak gerçekleşmesi için 3' grupların çıkarılması gerekmektedir. Bir AP nükleazı (memeli hücrelerinde APEX1) bu 3' uçlarını bir 3'-OH ucuna dönüştürmede rol oynamaktadır. *S. cerevisiae'*de, bu gibi 3' uçların işlenmesi AP nükleazının yokluğunda bile hala gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Guillet ve Boiteux tarafından (2002) bu işlemin RAD1-RAD10'a bağlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde ERCC1-XPF ekzonükleazı, DNA'nın 3'ucundan ROS tarafından üretilen 3'-fosfoglikolatı kaldırabilir (Fisher ve ark 2011). Bu ERCC1-XPF proteinin, memeli hücrelerinde ROS tarafından hasar gören DNA' nın onarılmasında yedek bir rol oynayabildiğini göstermektedir.

1.3.4.5. XPF'nin Telomerlerin Bakımındaki Rolü

ERCC1-XPF protein kompleksi, telomer bakım proteini TRF2 ile genetik etkileşimleri gösterir. TRF2'yi aşırı ifade eden farelerin normal farelere kıyasla UV ışınlarına aşırı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu farelerdeki kromozomlar, ERCC1-XPF ekzonükleaza bağlı olarak telomer kaybına uğramaktadırlar (Munoz ve ark 2005). Diğer yandan, TRF2 eksikliği olan hücrelerdeki *Xpf* geninin ifadesi, kromozomal uçlardaki füzyon artışına neden olmaktadır (Zhu ve ark 2003). Mekanik olarak, ERCC1-XPF ekzonükleaz 3' uçları telomerlerden ayırabilir. Bu, farelerde erken yaşlanma ile birlikte telomerlerin kısalmasına neden olmaktadır. ERCC1-XPF ve TRF2, SLX4 proteini bir etkileşim yoluyla birlikte telomer uzunluğunun düzenlenmesine katılırlar (Munoz ve ark 2005, Wu ve ark 2008, Wan ve ark 2013).

ERCC1-XPF ve *TRF2* gen ifadesi arasındaki denge, yaşam süresi ve genetik istikrar açısından kritik olabilir.

Chiu ve ark (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada ise *G. lucidum* özütlerinin farelerin karaciğer ve böbrek gibi organlarında genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Rajasekaran ve Kalaimagal (2011), *G. lucidum*'un antioksidan madde içeriğini analiz etmiş ve potansiyel antioksidan özelliğini değerlendirmiştir. Çalışma sonrasında *G. lucidum*'un etanol özütlerinin farkedilebilir bir oranda antioksidan bileşikler içerdiği ve bu bileşiklerin serbest radikallere karşı iyi bir radikal temizleyici etkileri olduğunu göstermişlerdir.

Pillai ve ark (2006) tarafından, γ-radyasyona maruz kalan insan lenfosit hücrelerinde DNA hasarına karşı sulu *G. lucidum* özütlerinin koruyucu etkisi comet testi ile test edilmiş ve sonuçta radyasyonun indüklediği DNA tek iplik kırılmalarına karşı *G. lucidum* sulu özütlerinin koruyucu etkisinin olduğunu tespit edilmiştir.

Gopakumar ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada, *G. lucidum* özütü tümörlü ve γ-radyasyonla tedavi olan farelere yedirilmiş ve tümör hacminde gerileme gözlenmiştir. Ayrıca *G. lucidum* özütü verilen ve radyasyon tedavisi gören kanserli farelerin beyin, kemik iliği ve kan hücreleri ve tümörlü doku hücreleri üzerinde comet testi de uygulanmıştır. Tümörlü dokularla karşılaştırıldığında normal dokulardaki radyasyonun indüklediği hücresel DNA hasarlarında önemli azalma belirlenmiştir. Bu veriler ışığında *G. lucidum*'un tümörlerin küçülmesi ve normal dokularda radyasyonun tetiklediği hücresel hasarların engellenmesi için radyoterapi alanların yardımcı bir tedavi olarak bu mantarın özütlerinin kullanabileceğini önerilmiştir.

Liu ve ark (2006) ,*Grifola umbellata, G. lucidum, Coriolus versicolor, Tricholoma lobayense, Volvariella volvacea, Tremella fuciformis, Schizophyllum commune, Lentinus edodes* mantarlarından phenazin methosulphate-NADH-nitroblue tetrazolium ve askorbikasit-Cu^{2+}- sitokrom $_C$ sistemleriyle elde ettikleri polisakkaritlerin superoksit ve hidroksi radikal temizleme aktiviteleri araştırılmıştır. Mantar polisakkarit özütlerinin antioksidatif aktiviteleri karaciğerin MDA içeriğinin

ölçülmesiyle belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda *G. lucidum* ve *G. umbellata*'nın güçlü radikal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Lin ve Lin (2006), Karbon tetraklorid (CCl_4) ile karaciğer fibrozu oluşturdukları sıçanlarda *G. lucidum*'un etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada kontrol, CCl_4 ve iki adet *G. lucidum* özütü (GLE) verilen grup oluşturulmuş, kontrol grubu hariç bütün gruplarda haftada iki kere olmak üzere 8 hafta boyunca gastrogavaj şeklinde %20, 0.2 mL/100 g CCl_4, iki GLE grubuna da deney boyunca günlük olarak 1600 ve 600 mg/kg şeklinde *G. lucidum* özütü verilerek bu grupların ALT, AST, albumin gibi karaciğer fonksiyon testleri kontrol edilmiş buna ek olarak karaciğer ağırlığı, hepatik protein miktarı, MDA miktarları belirlenmiştir. Sonuç olarak, oral yoldan verilen GLE'nin sıçanlarda CCl_4 ile oluşturulan hepatik fibrozisi anlamlı derecede azaltıldığı ve bu çalışmada koruyucu etkinin *G. lucidum*'un serbest radikal temizleyici olmasından kaynaklandığı saptanmıştır.

Xu ve ark (2011), *G. lucidum*'dan izole edilen LZ-8 immunomodülatör proteinini klonladıktan sonra, oluşturdukları rLZ-8'in A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. rLZ-8, p53 ve p21 genlerinin ifadelerini aktive ettiğini ve hücreyi G_1 fazında durdurarak hücre bölünmesini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Chen ve ark (2011), yapmış olduğu çalışmada *G. lucidum*'dan elde edilen β-glukanların genotoksik potansiyelleri in vitro kromozomal aberasyon testi ile belirlenmiştir. Bu testte CHO-K1 hücre hattı kullanılmıştır. Mantarın 1,250; 2,500; 5,000 mg/mL'lik dozları kısa süreli (3 saat) ve uzun süreli (18 saat) dozları kromozom kırıkları ve değişimi testi (kromozomal aberasyon) için seçilmiştir. Mantar β-glukanı uygulanan CHO-K1 hücre hattında genotoksisite gözlenmemiştir. Mantar, kromozom aberasyon testinde gerek kısa süreli gerekse uzun süreli uygulamaların hiçbirinde kontrole göre herhangi bir farklılığa sebep vermemiştir.

Epitelyal over kanser (EOC) için platin-bazlı kemoterapi alan hastaların yaklaşık %20'sinin tedaviye dirençli olduğu veya yeniden gelişim gösterdiği görülmektedir. Platin ile oluşturulan DNA hasarının onarımında önemli rol oynadığı için, tedaviye yanıtın potansiyel bir belirleyicisi olarak *ERCC1* genine DeLoia ve ark (2012) tarafından yoğun ilgi gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, platin esaslı tedavi uygulanan EOC'li hastalardaki *ERCC1* ve onun ortağı *XPF* geninin protein

düzeylerini doğru bir şekilde ölçmek ve protein düzeylerinin mRNA düzeyleri, hasta genotipleri veya klinik sonuçları ile korele olup olmadığını belirlemektir. *ERCC1* ve *XPF* mRNA ve protein düzeyleri, RT-PCR ve Western Blot metodu kullanılarak platin esaslı kemoterapi alan 41 hastanın dondurulmuş EOC örneklerinde ölçülmüştür. *ERCC1* ve *XPF* gen ifadelerine bakıldığında hem mRNA hem de protein seviyelerinin birbirleriyle sıkı bir korelasyon gösterdiği, bununla birlikte *ERCC1*'in mRNA ve protein seviyeleri pozitif olarak korelasyon sağlamadığı bulunmuştur. Benzer şekilde, analiz edilen SNP'lerin hiçbirinin *ERCC1* veya *XPF* protein seviyeleri ile korelasyon oluşturmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak mRNA düzeyleri ve hasta sonuçları arasında ters korelasyon olduğu belirtilmiştir.

Andrew ve ark (2003) New Hempshire (USA)'da bulunan içme sularındaki arsenik ile uyarılan 10'u kontrol toplam 16 bireyin lenfositlerindeki *ERCC1*, *XPF* ve *XPB* genlerinin ifade düzeylerini ölçmüşlerdir. Arsenik maruziyetinin, DNA onarım geni ifadesindeki azaltma kabiliyetini göstermişler ve bu özelliğin mevcut kanserlerin kemoterapi tedavisinde DNA hasar ajanları ile kombinasyon halinde, avantajlı bir şekilde kullanılabilir olduğunu söylemişlerdir.

Paul ve ark (2011) yaptıkları bir çalışmada ise Kahverengi Norveç (BN) ratlarının spermatositlerindeki BER ve NER genlerinin ifadelerine bakarak, yaşlanma sürecini incelemişlerdir. Genlerin ifade edilmesi ile ratların yaşı arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. qRT-PCR ile yapılan analizlerde NER genlerinin ifadesinin yaş ile birlikte artarken, BER genlerinin ifadesinin azaldığını göstermişlerdir.

Niedernhofer ve ark (2004) yaptıkları çalışmalarının sonucunda, ERCC1-XPF kompleksinin kardeş kromatidler arasındaki rekombinasyon için vazgeçilmez olmasının yanı sıra, fare embriyonik kök hücre hattındaki homolog rekombinasyon ile hedeflenen genin değiştirilmesinde de önemli bir yapıya-özgü endonükleaz olduğu gösterilmiştir.

Vinson ve Hales (2001) ratların vitellüs keselerini CP ile indükleyerek, oluşturmuş oldukları hasarın tamirinde görev aldığı düşünülen NER yolağındaki genlerin, organogenezis evresindeki ifadelerine bakmışlardır. Embriyonun 10'uncu gestasyonal gününde *Xpd* ve *Xpe* hariç, NER genlerinin çoğunun düşük seviyelerde ifade olduğu, *Xpb, Ercc1-Xpf* ve *DNA polimeraz ε* gen ifadesinin 12'nci günde

arttığını bulmuşlardır. Ancak CP ile indüklenen gruptaki genlerin ifadesinde önemli fark gözlenmemiştir. Bunun sebebinin de NER genlerinin hem transkripsiyon (Tomkinson ve Mackey 1998) ve replikasyon (Burgers 1998) gibi gen ifadelerinin düzenlenmesi aşamalarında hem de başka DNA tamir yolaklarında görev almasından ötürü olduğunu düşünmüşlerdir. Sonuç olarak ise, organogenez sırasındaki NER genlerinin ifadesinin gelişim evresinde dokuya özgü olarak ifade edildiğini bulmuşlardır.

Li ve ark (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, *XPF* geninin artan ifadesinin mesane kanseri hastalarında kullanılan Hidroksikamptotesin'e (HCPT) karşı direnç oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. Bunun için hiçbir tedavi uygulanmamış 45 mesane kanseri hastasının ve HCPT ile tedavi edilmiş 21 kanser hastalarının *XPF* gen ifade profilleri bakımından incelenmiştir. HCPT ile tedavi gören hastaların ifade düzeyleri tedavi edilmeyen gruba oranla önemli derecede yüksek bulunmuştur. *XPF* geninin ifadesinin azaltılması, mesane kanseri hastalarındaki terapötik tedavi stratejilerinde umut vaat edici olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada insanların günlük hayatlarında kullanımına sunulan *G.lucidum'*un (Ölümsüzlük Mantarı) sulu özütünün, CP ile indüklenerek DNA hasarı oluşturulmuş civciv embriyolarındaki *Xpf* gen ifadesinin üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

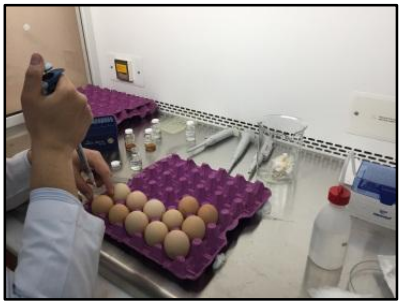
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulunun 20.10.2015 tarihli toplantı ve 2015/82 karar izniyle yapılmıştır. Çalışmada 11 günlük civciv embriyoları kullanılmıştır.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvan Dokuları

Çalışmada civciv embriyoları (11 günlük) 12 gruba ayrılarak kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan yumurta grupları ve gruplar üzerinde 8. günde uygulanan işlemler Çizelge 2.1'de belirtilmiştir. Çalışmada test edilen yabani *G. lucidum* örnekleri Karabük-Yenice (Kanyon girişi, 41º08'16K, 032º21'51D, 456 m) ilçesinden Prof. Dr. Gıyasettin KAŞIK ve Uzm. Dr. Sinan ALKAN'ın yardımlarıyla toplanmış ve teşhis edilerek laboratuvarda özel kurutma dolaplarında 40-45ºC'de kurutulmuştur. Kuru örnekler değirmende toz haline getirilmiş ve sulu özütlerinin hazırlanması için 10 g öğütülmüş mantar 300 ml kaynar bidistile suyla 15 dk karıştırılmıştır. Ardından örnekler liyofilize edilerek kullanılıncaya kadar buzdolabında 4ºC'de muhafaza edilmiştir. Deney aşamasında yumurtaların kuluçka, enjeksiyon ve preparasyon işlemleri S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Sitoloji-Histoloji ve Omurgalı Hayvanlar Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. CP'nin, *G. lucidum* özütlerinin (GLÖ), C vitaminin (Askorbik asit A; AsA) ve CP ile birlikte verilen vitamin ve mantar deney solüsyonları steril şartlar altında güvenlik kabinde steril uçlu mikropipet kullanılarak, kuluçkanın 8. gününde yumurtalara enjekte edilmiştir (Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1). Kuluçkanın 11. gününde yumurtalar açılarak canlı embriyolar zarlarından ayrılmış ve sonrasında deneyde RNA izolasyonunda kullanılmak üzere civcivlerin karaciğer dokuları çıkarılarak, -80°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. 8. günde yumurtalara uygulanan enjeksiyon aşaması

Çizelge 2.1. Kuluçkanın 8.gününde üç farklı dozda *G. lucidum* özütü ile CP ve AsA enjeksiyonu gerçekleştirilen gruplar ve uygulanan işlemler, CP; Siklofosfamid, AsA; askorbik asit, GLÖ;*G. lucidum* özütü.

Gruplar	Embriyo Sayısı	Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlemler
Kontrol	6	Hiç bir işlem uygulanmadı.
CP	8	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP enjekte edildi.
AsAI	3	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg askorbik asit enjekte edildi.
AsAII	8	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 250 µg askorbik asit enjekte edildi.
GLÖI	7	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 219 µg (düşük doz) *G. lucidum* özütü enjekte edildi.
GLÖII	6	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 875 µg (orta doz) *G. lucidum* özütü enjekte edildi.
GLÖIII	5	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 1750 µg (yüksek doz) *G. lucidum* özütü enjekte edildi.
CP + AsAI	7	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg askorbik asit enjekte edildi.
CP + AsAII	9	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 250 µg askorbik asit enjekte edildi.
CP + GLÖI	6	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 219 µg (düşük doz) *G. lucidum* özütü birlikte enjekte edildi.
CP + GLÖII	5	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 875 µg (orta doz) *G. lucidum* özütü birlikte enjekte edildi.
CP + GLÖIII	6	60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 1750 µg (yüksek doz) *G. lucidum* özütü birlikte enjekte edildi.



Şekil 2.2. 11. günde yumurtaların açılması ve embriyo ve karaciğerinin görüntüsü

2.1.2. Kimyasal Maddeler

2.1.2.1. Hayvan Dokusundan Total RNA İzolasyonu İçin Gerekli Çözeltiler

Civciv embriyolarından total RNA Qiagen RNeasy Mini Kit (Cat No:74104) kullanılarak izole edilmiştir. Kit aşağıdaki tampon ve çözeltileri içermektedir.

-Buffer RLT

-Buffer RW1

-Buffer RPE

-RNase-Free Water

-Absolute ve %70' lik EtOH

-β-Merkapto EtOH

2.1.2.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi İçin Gerekli Çözeltiler

Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1622) kullanılarak total RNA'dan cDNA elde edilmiştir. Kit aşağıdaki tampon ve çözeltileri içermektedir.

-Oligo $(dT)_{18}$ primer

-RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL)

-5X Reaction Buffer

-10 mM dNTP miks

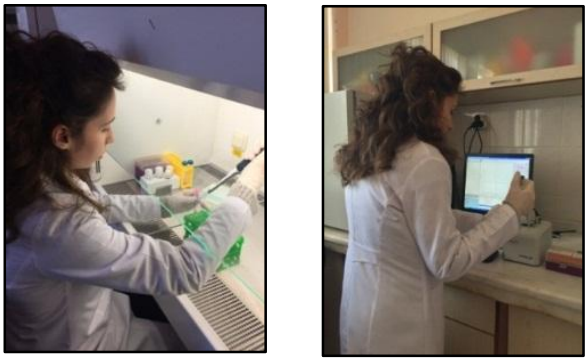
-RevertAid M-MuLV RT (200U/µL)

-Nuclease-Free Water

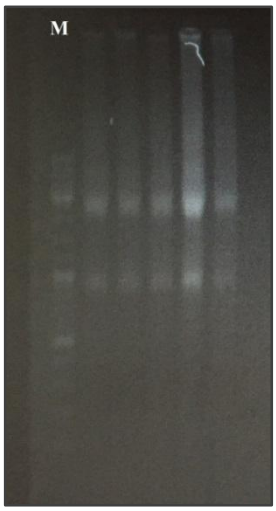
2.2. Yöntem

2.2.1. Dokudan Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için -80ºC'de muhafaza edilen ≤30µg karaciğer örnekleri havanda sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir. Ezilen doku örnekleri ependorf tüplere alınmış ve üzerine 600 µL Buffer RLT miks eklenerek mikser yardımı ile homojenize hale getirilmiştir. Daha sonra bu örnekler 15.000rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice 1.5 mL'lik yeni bir ependorf tüpüne alınıp eşit hacimde (v:v) %70'lik EtOH eklenmiştir. Her örnekten 700 µL alınıp RNase mini spin kolon tüpüne yerleştirilip, 20-25ºC'de 10.000rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Kolonun altında kalan sıvı dökülmüş, her bir örneğe 700 µL Buffer RW1 eklenip, 10.000rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Alttaki sıvı dökülüp 500 µL Buffer RPE eklenip, 10.000rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Alttaki sıvı dökülerek aynı işlem 2 dk süre tutularak uygulanır. RNase spin column kolonları 2 mL'lik collection tüplerine aktarılır. Boş bir şekilde 15.000rpm'de (max hız ile) 1 dk santrifüjlenmiştir. Koleksiyon tüpleri atılarak RNase kolonlar 1,5 mL'lik yeni bir ependorfa yerleştirilerek membranın üzerinden 50 µL RNase-sız su eklenir ve 10.000rpm'de 1 dk santrifüjlenir. Eğer >30 µg'dan fazla miktarda RNA izole edileceği düşünülüyorsa bu basamak tekrarlanmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarını ve saflığını belirlemek için nanodrop (ND-2000, Thermo Scientific) kullanılmıştır. OD 260/280 oranı ≥1,9 olan RNA'lar çalışmamızda kullanılmıştır (Şekil 2.3 ve Çizelge 2.2). Elde edilen RNA'ların 18S ve 28S bantları %1'lik jelde görüntülenip (Şekil 2.4), cDNA sentezi yapılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 2.3. Total RNA izolasyonu ve saflığının belirlenmesi



Şekil 2.4. RNA'nın agaroz jel örnekleri, M; markır (Thermo Scientific, SM0371)

Çizelge 2.2. Çalışılan RNA'ların saflığı ve miktarı

Grup No	RNA Konsantrasyonu (ng/µL)	OD 260/280
Kontrol		
E11	317	2,03
E2	825,9	2,11
E4	537,5	2,02
E7	545,3	2,06
E9	413	2,09
E6	582,1	2
CP		
SF2	545,6	2,06
SF5	493,9	2,05
SF3	397,1	2,08
SF7	493,9	2,07
SF4	312,6	2,09
SF1	546,3	2,06
SF11	745,5	2,04
SF9	596,1	2,05
AsAI		
A8	362,6	2,08
A3	223	2,11
A1	552	2,03
AsAII		
C6	702,8	2,11
C5	441,5	2,07
C9	398,7	2,06
C4	540,1	2,05
C3	752	2,07
C13	611,5	2,08
C7	691,3	2,11
C11	366,5	2,09
GLÖI		
MA7	555,5	2,06
MA12	826,9	2,11
MA3	309,7	2,1
MA1	593	1,99

MA13	414,4	2,08
MA2	632,2	1,98
MA11	836,2	2,05
GLÖII		
MB7	514,5	2,05
MB5	319,4	2,08
MB6	310,2	2,09
MB3	177,5	2,06
MB1	118,9	2,08
MB10	190,1	2,07
GLÖIII		
MX9	296,1	2,1
MX1	947	2,06
MX7	1122,8	2,09
MX3	772,4	2,03
MX12	407,3	2,07
CP + AsAI		
SFC9	601,2	2,08
SFC1	416,4	2,07
SFC7	907	2,05
SFC10	738,8	2,03
SFC3	678,8	2,09
SFC2	1343,9	2,08
SFC12	779,9	2,04
CP + AsAII		
K9	332,7	2,09
K8	640,4	2,03
K12	753,6	2,08
K6	476,9	2,08
K1	736,3	2,05
K11	283,4	2,1
K2	589,2	2
K4	600,3	2,06
K3	882,3	2,06
CP + GLÖI		
SFMA9	762,5	2,04
SFMA8	391,7	2,06
SFMA2	291,4	2,08
SFMA6	720	2,06
SFMA12	458,9	2,08
SFMA3	589,5	2,06
CP + GLÖII		
SFMB13	704,4	2,07
SFMB8	385,4	2,07
SFMB9	517,1	2,05
SFMB10	378,4	2,08
SFMB6	360,7	2,07
CP + GLÖIII		

SFMX1	384,1	2,08
SFMX11	521,5	2,02
SFMX13	461	2,05
SFMX8	475,6	2,06
SFMX5	472,5	2,07
SFMX2	632,3	2,05

2.2.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi

Elde edilmiş olan total RNA'yı cDNA'ya çevirmek için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kiti kullanıldı. Her bir örnekten eşit miktarda (100 ng/mL) 3µL RNA alındı ve daha sonra üzerine 1µL Oligo $(dT)_{18}$ primer ve 8 µL Nükleaz-sız su ilave edilip Isı Döngü Cihazında (Thermo Scientific) 65ºC'de 5 dk bekletilerek denatüre edilmiştir. Ardından 20 µL'lik cDNA sentez miks (Çizelge 2.3) buz üzerinde ilave edilip 42ºC'de 60 dk bekletilerek primer bağlanması ve cDNA sentezi, 70ºC'de 5 dk bekletilerek denatüreasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar RT-PCR yapılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.3. mRNA'dan cDNA elde etmek için kullanılan cDNA sentez miks

Bileşim	Miktar
5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor	1 µL
dNTP mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT	1 µL

2.2.3. *Xpf* ve *Gapdh* Genlerinin PZR'de Optimizasyonu

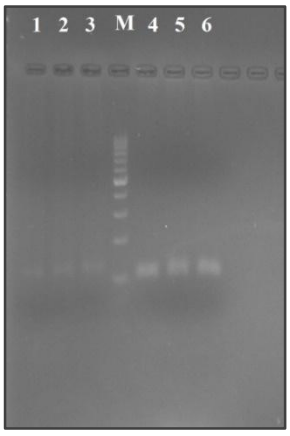
Çalışmamızdaki genlerin optimizasyonu için 10 µL'lik hazırlanan sentez miks ile (Çizelge 2.4) belirlenen örneklerin gradiyeti yapılmıştır. Her bir cDNA örneğinden (300 ng/mL) 2,7 µL alındı ve üzerine sırasıyla 1 µL 10X Buffer, 1µL 25mM $MgCl_2$, 0,2 µL 10mM dNTP, 0,3 µL 10 pmol'luk ileri ve geri primerler (*Gapdh* ve *Xpf*), 0,2 µL Taq polimeraz ve üzerine total hacim 10 µL olacak şekilde dH_2O koyuldu. Gradient koşulları başlangıç denatürasyonü: 95ºC'de 5 dk; 35 siklus, denatürasyon: 95ºC'de 40 sn, bağlanma: 51,9±5ºC'de 40 sn, uzama: 72ºC'de 40 sn; son uzama: 5ºC'de olacak şekilde Isı Döngü PZR'de (Thermo Scientific) programlanmıştır. Elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek primer için uygun sıcaklık belirlemesi yapılmıştır.

Çizelge 2.4. Genlerin optimizasyonunda kullanılan sentez miks

Bileşim	Miktar (µL)
10X Buffer	1 µL
25mM $MgCl_2$	1 µL
10mM dNTP mix	0,2 µL
İleri primer (10 pmol)	0,3 µL
Geri primer (10 pmol)	0,3 µL
Taq Polimeraz	0,2 µL
cDNA	2,7 µL
Toplam	**10 µL**

2.2.3.1. PZR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

Xpf ve *Gapdh* (housekeeping gen) gen bölgelerinin optimizasyonu PZR ile yapıldıktan sonra, ürünleri değerlendirilmek için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel için 0,6 gr agaroz tartılıp, 30 mL TAE tamponu içinde çözülüp, mikrodalga fırın yoluyla kaynatılmıştır. Kaynatıldıktan sonra 50-60 ºC'ye kadar soğutulmuş ve üzerine 30 µL EtBr eklenmiştir. Hazırlanan jel yükleme kuyucuklarının oluşması için tarağın yatay jel yatağı içine takılmasından sonra dökülerek donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra PZR ürünleri kuyucuklara yüklenmiş ve çoğaltılan bölgenin büyüklüğünü tespit etmek ve doğru bölgenin çoğaldığına karar verebilmek için 100 bç'lik markır (Vivantis, NL1405) kullanılarak 110 voltta 20 dk yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda jel UV ışık altında PZR ürünleri incelenmiş, primerlerin çoğalması için en uygun sıcaklığın 52°C olduğuna karar verilmiş ve jelin görüntüsü UV Transillüminatör düzeneğinde çekilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Optimize edilmiş PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, M; marker (100 bp, Vitantis, NL1405), 1,2,3; *Xpf* genine ait örneklerin DNA bantları, 4,5,6;*Gapdh* genine ait örneklerin DNA bantları

2.2.4. Gerçek Zamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time – Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

Xpf geninin *Gallus gallus'*taki tüm gen dizisi PubMed NCBI Gen Bankası'ndan temin edilmiştir. Bu gen dizilerine ait primerler http://www.idtdna.com adresindeki online primer dizayn programı ile tasarlanmış ve bu gen bölgesinin çoğaltımı için 1 çift primer çifti kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada kontrol olarak *GAPDH* geni (housekeeping gene) (Lin ve Redies 2012) kullanılmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. *Xpf* gen bölgesine ve *Gapdh* gen bölgesine ait kullanılan primerler, ürün büyüklüğü ve primer bağlanma sıcaklıkları Tm (ºC).

Primer	Dizi	Ürün Büyüklüğü (bç)	Tm (ºC)	Fonksiyonu
Xpf ileri	5'-AAGCCAAACTCTCTACTGGTTC-3'	115	52	Hedef gen
Xpf geri	5'-TCCACATCCAACTCCTCTCT-3'	115	52	Hedef gen
Gapdh ileri	5'-TCTCTGGCAAAGTCCAAGTG-3'	101	52	Housekeeping gen
Gapdh geri	5'-CTTGAAGTGTCCGTGTGTAGAA-3'	115	52	Housekeeping gen

Tasarlanan primer çiftlerinin en iyi çalışabilecekleri sıcaklığın ve reaksiyon koşullarının belirlenmesi için öncelikle Gradient PZR yapılmıştır. RT-PCR yöntemi ile genin ifade düzeyi belirlenmiştir.

RT-PCR için iki farklı reaksiyon hazırlanmıştır, birinci karışım *Xpf* geni için ikinci karışım ise çalışmada kontrol olarak kullanılan *GAPDH* geni için hazırlanmıştır. RT-PCR reaksiyonu için Thermo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Cat No: K0221) kullanılmıştır. RT-PCR yönteminde Çizelge 2.6'te yer alan PCR çözeltisi hazırlanarak ürün çoğaltımları gerçekleştirilmiştir.

cDNA'lardan *Xpf* geninin çoğaltımı PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak başlangıç denatürasyon: 95ºC'de 10 dk; 40 siklus, denatürasyon: 95ºC'de 20 sn, bağlanma: 52ºC'de 40 sn, uzama: 72ºC'de 10 sn; son uzama: 4ºC'de olacak şekilde programlanmıştır.

Çizelge 2.6. RT-PZR işleminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği

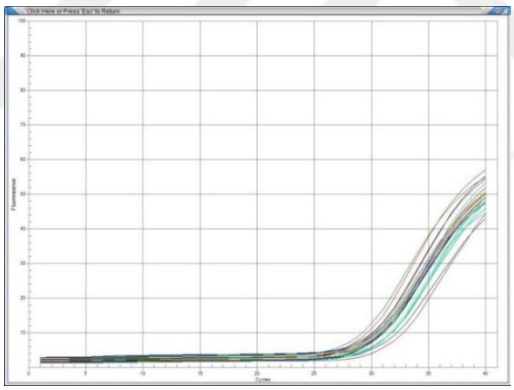
Reaksiyon Karışımının İçeriği	**Miktar (µL)**
İleri primer (10 pmol)	0,2 µL
Geri primer (10 pmol)	0,2 µL
2X SYBR Green Master Miks	5 µL
Nüklease-sız su	4,1 µL
cDNA (25 ng)	0,5 µL
Toplam	**10 µL**

2.2.5. İstatiksel Analiz

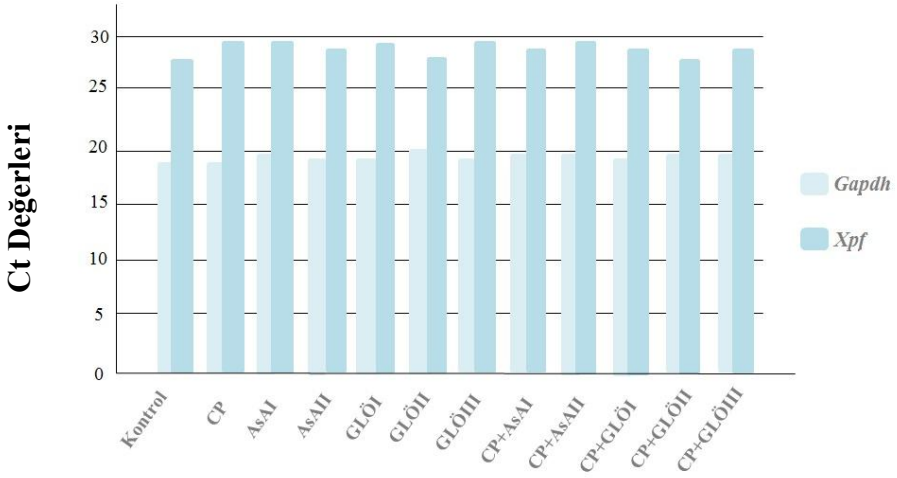
İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, New York, ABD) istatistik paket programının t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama±standart sapma (ortalama ± sd) değerleri verilmiştir. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

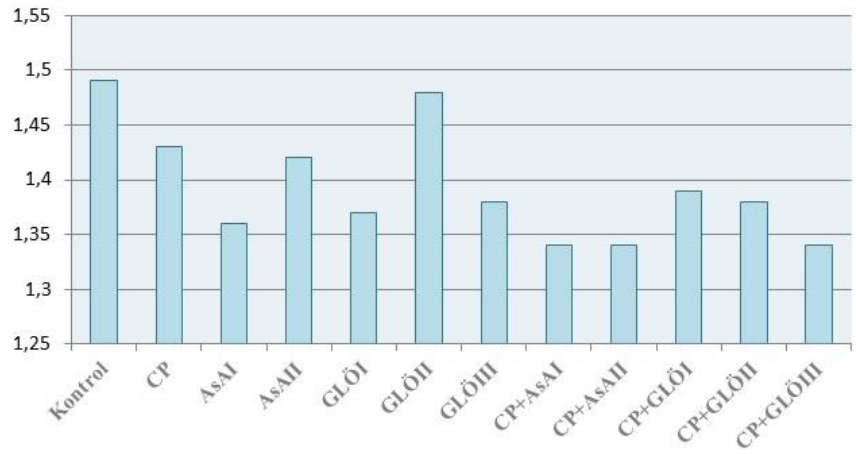
Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nin 20.10.2015 tarihli toplantı ve 2015/82 numaralı etik kurulu izni ile yapılan çalışmadaki 11 günlük civciv embriyolarının karaciğer dokularından izole edilen total RNA'ların $oligo_{(dt)}$ primerler ve ters transkriptaz enzimi ile mRNA'ları cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen cDNA'lar kullanılarak kantitatif RT-PCR yöntemi ile referans gen olarak seçilen *Gapdh* geninin ve çalışılan *Xpf* geninin ifade düzeyi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda karaciğer dokusundan elde edilen C_T değerlerinin sonuçları Çizelge 3.1'de, amplifikasyon eğrisi Şekil 3.1'de verilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre elde edilen C_T değerlerinin istatistiksel analizleri t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki genlerin C_T değerlerine göre ifade düzeyleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca *Xpf* geninin ifade düzeylerinin *Gapdh* genine oranları Şekil 3.3'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışılan örneklerin amplifikasyon eğrisi (*Xpf* geni).



Şekil 3.2. Çalışma sonuçlarının grafiği



Şekil 3.3. *Xpf* geninin CT değerlerinin *Gapdh* geninin C_T değerlerine oranı

Çizelge 3.1. Çalışılan örneklerin RT-PZR sonuçlarına göre C_T değerleri, *Kontrol (su) grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test, p<0,05). CP; Siklofosfamid, AsA; Askorbik Asit, GLÖ; *G. lucidum* özütü.

Gruplar	Embriyoların Sayısı	Doz/Volüm	C_T Değerleri (ort±SD)
Kontrol	6	Su/60 µL	27,64±1,14
CP	8	(50 µg/y)/ 60 µL	26,21±0,89*
AsAI	3	(50 µg/y)/ 60 µL	26,13±0,67
AsAII	8	(250 µg/y)/ 60 µL	26,07±0,20
GLÖI	7	(219 µg/y)/ 60 µL	26,04±0,81*
GLÖII	6	(875 µg/y)/ 60 µL	26,89±0,95
GLÖIII	5	(1750 µg/y)/ 60 µL	26,08±0,62*
CP+AsAI	7	(50 µg/y) + (50 µg/y)/60 µL + 60 µL	26,09±0,88*
CP+AsAII	9	(50 µg/y) + (250 µg/y)/60 µL + 60 µL	25,67±1,33*
CP+GLÖI	6	(50 µg/y) + (219 µg/y)/60 µL + 60 µL	26,10±1,18*
CP+GLÖII	5	(50 µg/y) + (875 µg/y)/60 µL + 60 µL	26,63±0,43
CP+GLÖIII	6	(50 µg/y) + (1750 µg/y)/60 µL + 60 µL	25,66±1,25*

CP uygulanan grupta kontrole göre *Xpf* geninin ifadesi istatistiksel açıdan önemli bir farkla artmıştır (t-test, p<0,05) . Bu bize DNA'da hasar oluşturan CP'in tamir mekanizmasını uyardığını göstermektedir.

AsA'in hem düşük hem yüksek dozajlarda uygulandığı her iki embriyo grubu (AsAI ve AsAII) kontrol ile kıyaslandığında, C_T değerine göre genin ifadesi artmış görünse de istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı görülmüştür (p>0,05).

Mantarın her 3 dozunun uygulandığı gruplar; 219µg/y (GLÖI), 875µg/y (GLÖII), 1750µg/y (GLÖIII) ile kontrol grubu kıyaslandığında 219µg/y (GLÖI) ve 1750µg/y (GLÖIII) gruplarının *Xpf* geninin ifadesini arttırdığı, bunun da istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Fakat 875µg/y (GLÖII) grubu kontrol ile kıyaslandığında gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ($p>0,05$) gözlenmiştir. Bu da bize mantarın onarım sistemini harekete geçirmediğine göre DNA üzerinde bir hasar oluşturmadığını düşündürmektedir.

CP (50µg/y) + AsAI (50µg/y) grubu ile CP grubu kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir fark olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Fakat her ne kadar istatistiksel olarak önemli bir fark görülmese de ($p>0,05$), CP (50µg/y) + AsAII (250µg/y) grubunda sadece CP grubuna göre gen ifadesini arttırdığı dikkat çekmiştir.

CP (50µg/y) + AsAI (50µg/y) ve CP (50µg/y) + AsAII (250µg/y) grupları kontrol ile kıyaslandığında her ne kadar istatistiki olarak bir fark gözlemlense de ($p<0,05$) özelikle CP + AsAII grubu *Xpf* geninin ifadesini oldukça arttırmıştır. Bu da CP'in hasarını tamir etmek için onarım sistemini tetiklediğini düşündürmektedir.

CP (50µg/y) + GLÖI (219µg/y), CP (50µg/y) + GLÖII (875µg/y), CP (50µg/y) + GLÖIII (1750µg/y) gruplarını, CP (50µg/y) grubu ile kıyasladığımızda her ne kadar istatistiki olarak önemli bir fark gözlemlenmese de ($p<0,05$) mantarın en yüksek dozunun CP (50µg/y) + GLÖIII (1750µg/y) *Xpf* geninin ifadesini arttırdığı C_T değerlerinde görülmektedir.

CP (50µg/y) + GLÖI (219µg/y) ve CP (50µg/y) + GLÖIII (1750µg/y) grupları kontrol ile kıyaslandığında, önemli bir fark olduğu gözlemlenmiş ($p<0,05$) olmasına rağmen CP (50µg/y) + GLÖIII (1750µg/y) grubunda *Xpf* gen ifadesindeki artış dikkat çekmektedir. Bu da bize CP' in meydana getirdiği hasarın tamiri için geni uyardığını göstermiştir. Fakat CP (50µg/y) + GLÖII (875µg/y) grubu kontrol ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Bu da bize mantarın 875 µg/y dozunun (CP+GLÖII) *Xpf* geninin ifadesi bakımından kontrole (27,64±1,14) yaklaştırdığını yani CP' i bir şekilde baskıladığı ve bu nedenle onarım sistemini tetiklemediğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak mantarın 875µg/y dozu (GLÖII) CP'i baskılayarak DNA üzerinde hasar oluşturmasını engellediği ve dolayısıyla en ideal dozun ikinci doz olduğunu düşündürmüştür. Zaten mantarın ikinci dozunun tek başına uygulanması sonucunda da diğer dozlardan farklı olarak [219µg/y (GLÖI) ve 1750µg/y (GL ÖIII)] kontrol ile aynı olduğu gözlenmiştir. Bu da mantarın ikinci dozunun DNA üzerinde hiçbir hasar oluşmadığı için tamir mekanizmasını kontrol gibi çalıştırma gereği duymamıştır. Fakat ikinci sırada da mantarın 1750µg/y dozu (GLÖIII) gen ifadesini artırarak CP' in meydana getirdiği hasarı tamir etmeye çalışmıştır. Bu da ikinci sırada tercih edilecek doz olarak kullanılabilir.

4. TARTIŞMA

"Ölümsüzlük Mantarı" olarak da bilinen *G. lucidum* özütlerinin (GLÖ) terapötik yararlarından dolayı üzerinde klinik araştırmalar yapılmaktadır ve geniş bir kullanıma sahiptir (Huie ve Di 2004). *Ganoderma* özütünün faydalarına bakıldığında, DNA sarmalının yapı bütünlüğünü koruyarak özellikle UV radyasyonu kökenli kırılmalara karşı da DNA'yı koruyucu etkisinin olduğu birçok araştırıcı tarafından gösterilmiştir (Shi ve ark 2002). CP'in iki aktif metabolitinden birisi fosforamid mustard (FAM) diğeri ise akroleindir (ACR). CP'in DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı antineoplastik etkilerinin FAM ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kawabata ve ark 1990). Corrie (2008)'nin yaptığı bir çalışmada CP'in içerdiği alkil gruplarının DNA ile kovalent bağ oluşturmak üzere reaksiyona girerek DNA'ya hasar verdiği ve hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Diğer etkileri arasında mikronükleus (MN) oluşumu, apopitozis, serbest radikal üretilmesi, gen mutasyonları, kromozom anomalisi, kardeş kromatit değişimi ve DNA çift zincir kırığı oluşumu sayılabilir (Dursun ve ark 2013). Tamir edilmeyen çift zincir kırıkları hücre ölümüne neden olabilmektedir, bu nedenle tamiri önemlidir (Riemenschneider ve ark 2010). *Xpf* geni, tamir mekanizmaları arasında bilinen en genel ve etkili gendir (Ferreira ve ark 2013).

Kanatlı hayvanlarda karaciğer gelişimi erken dönemde farklılaşmaktadır ve bu yüzden genotoksisite çalışmalarındaki enjeksiyon işlemleri kuluçkanın 8.gününde gerçekleştirilmektedir (Wolf ve Luepke 1997). CP, karaciğerde sitokrom P-450 enzimleri ile aktive edilmekte ve bu da alkilleyici ajan olan FAM ve ACR'e dönüştürülmektedir (Chabner BA 2001). Çalışmamızda kullandığımız civciv embriyolarının CP'i metabolize etmesini göz önünde bulundurarak biz de enjeksiyon işlemimizi kuluçkanın 8.gününde gerçekleştirdik ve karaciğer örneklerimizi embriyonun 11.gününde aldık.

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 (MN) oluşumu, DNA tamiri ve hücre döngüsü etkileşimi gibi farklı noktalar incelenmektedir (Ng ve ark 2010). MN testi de bunlardan birisidir (Tolbert ve ark 1992, Karahalil 1996).

Bu çalışma için gereç ve yöntemde anlattığımız Çelik (2016)'in deney düzeneğindeki embriyoların karaciğer dokuları kullanılmıştır. Çelik (2016)'in çalışma sonuçlarına baktığımızda ise aynı dozdaki her bir mantar özütlerinin (219µg/y, 875µg/y ve 1750µg/y) CP'in (50µg/y) oluşturduğu MN oranlarını dolayısıyla DNA kırık oranlarını azalttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda da mantarın 875µg/y dozu CP'i baskılayarak DNA üzerinde hasar oluşturmasını engellediği ve dolayısıyla en ideal dozun ikinci doz olduğunu düşündürmüştür.

Bu çalışmaya benzer şekilde yapılan birçok çalışmada (Gui ve ark 1996, Lin ve ark 2002, Sliva 2003), *G. lucidum*'un hücresel DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyan biyolojik aktif bileşikler içerdiği bildirilmiştir.

Kim ve Kim (1999) tarafından *G. lucidum*'un sıcak su özütü ile yaptıkları bir çalışmada, UV ışınları ve hidroksil radikali sonucu DNA'da oluşan kırıklara karşı radyoprotektif özellik gösterdiği bulunmuştur.

Yine benzer bir başka çalışmada Shi ve ark (2002), 8 mantar türünün sporundan yaptıkları sulu özütleri, H_2O_2 ile indüklenmiş oksidatif hücresel DNA hasarını önleyebilme yeteneklerini comet assay yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *G. lucidum*'un sıcak su özütünün (100ºC), *Agaricus bisporus*'un ise soğuk su özütünün (20ºC) yüksek genoprotektif etkiler gösterdiği ve *G. lucidum*'un hücresel DNA'yı oksidatif hasara karşı koruyan biyolojik aktif bileşikler içerdiği bildirilmiştir.

Smina ve ark (2011) tarafından γ-radyasyonuna maruz bırakılan fare dalak lenfositlerinde, meydana gelen hasara karşı *G. lucidum'*dan izole edilen triterpenlerin farklı konsantrasyonlarının (25, 50 ve 100 µg/mL) koruyucu etkisi comet testi ile ölçülmüştür. Sonuç olarak ışınlamanın neden olduğu DNA hasarında, triterpen uygulamasının hasarı etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Bizim en yüksek dozumuzun uygulanma sonucunun aksine Wachtel-Galor ve ark (2005)'nın yapmış olduğu bir çalışmada *G. lucidum*'un insan lenfosit DNA'sına olan etkilerini ex vivo comet testi sonucunda düşük konsantrasyonunun genoprotektif etkiye sahip olduğunu ancak yüksek konsantrasyonunun ise DNA'ya hasar verdiğini belirlemişlerdir.

Ferreira ve ark (2013) bizim çalışmamıza benzer şekilde oluşturmuş oldukları CP ile indüklenen DNA hasarında, melatoninin epifiz bezindeki koruyucu etkisine bakmışlardır. 20 veya 50 mg/kg CP ratlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve sonrasında 15 gün boyunca melatonin tedavisi (1 mg/kg) uygulanmıştır. Bu çalışmadaki *G. lucidum* özütünün *Xpf* geninin ifadesini arttığı gibi, melatonin uygulanan grubun rat kemik iliği hücrelerinde *Xpf* geninin ifade seviyesini arttırdığını göstermişlerdir. Araştırmacılar melatoninin CP ile indüklenerek oluşturulmuş olan kromozom aberrasyonlarını tamamen bloke edebileceğini, bu sayede kemoterapi alan hastalarda daha etkili bir tedavi için kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yukardaki çalışmalarda görülebileceği üzere *G. lucidum'*un çeşitli özütleriyle yapılan pek çok çalışmada genotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiş olmasına rağmen Wachtel-Galor ve ark (2005)'nın yaptığı çalışmada yüksek dozlarda DNA'ya hasar verdiği rapor edilmiştir. Bahsedilen veriler ışığında bizim çalışmamıza göre, mantarın 875 µg/y dozu CP' i baskılayarak DNA üzerinde hasar oluşturmasını engellediği ve dolayısıyla en ideal dozun ikinci doz olduğunu düşündürmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

G. lucidum'un biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulduğu yeterince çalışma olmasına rağmen, yapılan birçok çalışmada çeşitli radyasyonlara veya dış faktörlere maruz bırakılan deney hayvanlarında veya hücre kültürlerinde *G. lucidum*'un sulu özütünün ya DNA'yı hasara karşı koruduğu ya da bu çalışmadaki gibi tamir mekanizmalarını harekete geçirerek DNA'daki hasarları azalttığı gösterilmiştir. Fakat bu çalışma ilk kez civciv embriyosunda CP ile oluşturulan DNA hasarının tamirinde *G. lucidum* özütünün etkisinin ortaya konulması bakımından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protić M, Hübscher U, Egly J-M, Wood RD, 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. Cell, 80, 6, 859-68.

Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B, 2001. Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. Molecular reproduction and development, 60, 3, 302-11.

Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, Hasty P, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ, 2008. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. Molecular and cellular biology, 28, 16, 5082-92.

Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, Tokuda H, Yasukawa K, Uchiyama E, Suzuki T, Kimura Y, 2007. Anti-Inflammatory and Anti-Tumor-Promoting Effects of Triterpene Acids and Sterols from the Fungus Ganoderma lucidum. Chemistry & biodiversity, 4, 2, 224-31.

Akyol H, 2004. Kemoterapinin Temel İlkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı.

Ames BN, Gold LS, 1997. The causes and prevention of cancer: gaining perspective. Environmental Health Perspectives, 105, Suppl 4, 865.

Amudha G, Josephine A, Sudhahar V, Varalakshmi P, 2007. Protective effect of lipoic acid on oxidative and peroxidative damage in cyclosporine A-induced renal toxicity. International immunopharmacology, 7, 11, 1442-9.

Andersson BS, Sadeghi T, Siciliano MJ, Legerski R, Murray D, 1996. Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. Cancer chemotherapy and pharmacology, 38, 5, 406-16.

Andrew AS, Karagas MR, Hamilton JW, 2003. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. International journal of cancer, 104, 3, 263-8.

Bao X-F, Wang X-S, Dong Q, Fang J-N, Li X-Y, 2002. Structural features of immunologically active polysaccharides from Ganoderma lucidum. Phytochemistry, 59, 2, 175-81.

Bao X, Liu C, Fang J, Li X, 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of Ganoderma lucidum (Fr.) Karst. Carbohydrate research, 332, 1, 67-74.

Bardwell AJ, Bardwell L, Johnson DK, Friedberg EC, 1993. Yeast DNA recombination and repair proteins Rad 1 and Radio constitute a complex in vivo mediated by localized hydrophobic domains. Molecular microbiology, 8, 6, 1177-88.

Bardwell AJ, Bardwell L, Tomkinson AE, Friedberg EC, 1994. Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. Science, 265, 5181, 2082-6.

Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM, 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. PLoS genetics, 4, 6, e1000110.

Biggerstaff M, Szymkowski DE, Wood RD, 1993. Co-correction of the ERCC1, ERCC4 and xeroderma pigmentosum group F DNA repair defects in vitro. The EMBO journal, 12, 9, 3685.

Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L, 2007. Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology annual review, 13, 265-301.

Bootsma D, 2001. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 677-703.

Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME, 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 221, 4, 281-93.

Braunwald E, Faucı A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, 2004. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri Çev ed: Sağlıker Y. Nobel Tıp Kitabevleri, 5, 1551-66.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, 1989. The Merck Index, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 104.

Burgers PM, 1998. Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. Chromosoma, 107, 4, 218-27.

Calabresi P, Welch A, 1962. Chemotherapy of neoplastic diseases. Annual review of medicine, 13, 1, 147-202.

Chabner BA RD, Paz-Ares L, Carbonero RG, Calabresi P, 2001. Antineoplastic Agents. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, McGraw Hill Press, p. 1389-1459.

Chabner BA, Roberts Jr TG, 2005. Chemotherapy and the war on cancer. Nature reviews. Cancer, 5, 1, 65.

Chamorro-Cevallos G, Garduño-Siciliano L, Barrón B, Madrigal-Bujaidar E, Cruz-Vega D, Pages N, 2008. Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. Food and Chemical Toxicology, 46, 2, 567-74.

Chaney SG, Sancar A, 1996. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 88, 19, 1346-60.

Chang S-T, Buswell JA, 1999. Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllophoromycetideae)− A Mushrooming Medicinal Mushroom. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1, 2.

Chang S, Buswell J, 1996. Mushroom nutriceuticals. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 12, 5, 473-6.

Chen AW, 1999. Cultivation of the medicinal mushroom Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst.(Reishi) in North America. International Journal of medicinal mushrooms, 1, 3.

Chen S, Nan F, Chen S, Wu J, Lu C, Soni MG, 2011. Safety assessment of mushroom β-glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. Food and chemical toxicology, 49, 11, 2890-8.

Chen T, Li K, He X, Zhu P, Xu J. Micro-morphology, chemical components and identification of log-cultivated Ganoderma lucidum spore. Proc'98 Nanjing Intl Symp Science & Cultivation of Mushrooms.

Chen Y, Bicker W, Wu J, Xie MY, Lindner W, 2010. Ganoderma species discrimination by dual-mode chromatographic fingerprinting: A study on stationary phase effects in hydrophilic interaction chromatography and reduction of sample misclassification rate by additional use of reversed-phase chromatography. Journal of Chromatography A, 1217, 8, 1255-65.

Chiu S, Wang Z, Leung T, Moore D, 2000. Nutritional value of Ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. Food and chemical toxicology, 38, 2, 173-8.

Ciccia A, Elledge SJ, 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Molecular cell, 40, 2, 179-204.

Corrie PG, 2008. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. Medicine, 36, 1, 24-8.

Çelik B, 2016. Türkiye'deki Yabani Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst'ın Genotoksik-Antigenotoksik Etkilerinin Tavuk Yumurtası Mikronükles Testiyle Belirlenmesi, Yüksek lisans, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Çetik S, 2014. Sıçanlarda siklofosfamid nedenli kardiyotoksisitede oksidatif stres ve kalp hasarına karşı karvakrolün koruyucu etkisi, Doktora, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.

Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D, 2002. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian journal of andrology, 4, 3, 201-8.

de Boer J, Hoeijmakers JH, 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis, 21, 3, 453-60.

De Bont R, Van Larebeke N, 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis, 19, 3, 169-85.

DeLoia JA, Bhagwat NR, Darcy KM, Strange M, Tian C, Nuttall K, Krivak TC, Niedernhofer LJ, 2012. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. Gynecologic oncology, 126, 3, 448-54.

Dianov GL, Hübscher U, 2013. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. Nucleic acids research, 41, 6, 3483-90.

Douwel DK, Boonen RA, Long DT, Szypowska AA, Räschle M, Walter JC, Knipscheer P, 2014. XPF-ERCC1 acts in Unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. Molecular cell, 54, 3, 460-71.

Dursun D, Aktaş S, Erçetin AP, Altun Z, Mutafoğlu K, Olgun N, 2013. Nörofibromatozis tip 1 olgularında DNA tamir genlerinin ekspresyonunun klinik önemi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 27, 1, 15-23.

Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, Evers BM, 1997. Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. Surgery, 122, 5, 927-35.

Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD, Gangai MP, 1979. The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. The Journal of urology, 122, 2, 163-4.

Farber E, 1982. Chemical carcinogenesis: a biologic perspective. The American journal of pathology, 106, 2, 271.

Ferreira S, Peliciari-Garcia R, Takahashi-Hyodo S, Rodrigues A, Amaral F, Berra C, Bordin S, Curi R, Cipolla-Neto J, 2013. Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 46, 3, 278-86.

Fisher LA, Bessho M, Bessho T, 2008. Processing of a psoralen DNA interstrand cross-link by XPF-ERCC1 complex in vitro. Journal of Biological Chemistry, 283, 3, 1275-81.

Fisher LA, Samson L, Bessho T, 2011. Removal of reactive oxygen species-induced 3′-blocked ends by XPF-ERCC1. Chemical research in toxicology, 24, 11, 1876-81.

Franke SIR, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP, 2005. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO 4 and CuSO 4 in mouse blood cells in vivo. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 583, 1, 75-84.

Frei E, Holland JF, 2003. Cancer medicine 6, BC Decker, p.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, 2005. DNA repair and mutagenesis, American Society for Microbiology Press, p.

Fukuzawa M, Yamaguchi R, Hide I, Chen Z, Hirai Y, Sugimoto A, Yasuhara T, Nakata Y, 2008. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of Ganoderma lucidum (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 31, 10, 1933-7.

Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, Fujiwara K, 2000. Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. Hepatology Research, 17, 3, 223-36.

Gao Y, Gao H, Chan E, Tang W, Xu A, Yang H, Huang M, Lan J, Li X, Duan W, 2005. Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from Ganoderma lucidum, in mice. Immunological investigations, 34, 2, 171-98.

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

Gao Y, Zhou S, 2002. The Immunomodulating Effects of Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst.(Ling Zhi, Reishi Mushroom)(Aphyllophoromycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 4, 1.

Ghosal G, Chen J, 2013. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. Translational cancer research, 2, 3, 107.

González AG, León F, Rivera A, Muñoz CM, Bermejo J, 1999. Lanostanoid Triterpenes from Ganoderma l ucidum. Journal of natural products, 62, 12, 1700-1.

Gopakumar G, Martin F, Antony SK, Pillai TG, Nair CKK, 2010. Preclinical studies on the use of medicinal mushroom Ganoderma lucidum as an adjuvant in radiotherapy of cancer. Current Science(Bangalore), 99, 8, 1084-90.

Guarente LP PL, Wallace DC, 2008. Molecular Biology of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.

Gui X, Wang L, Yang Y, Chen X, Pei R, 1996. The study of protecting kidney cortical from radical with the use of Ganoderma lucidum injection. Chin J Biochem Pharm, 17, 188-90.

Guillet M, Boiteux S, 2002. Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in Saccharomyces cerevisiae. The EMBO journal, 21, 11, 2833-41.

Hanawalt PC, Spivak G, 2008. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. Nature reviews Molecular cell biology, 9, 12, 958-70.

Hansen RJ, Ludeman SM, Paikoff SJ, Pegg AE, Dolan ME, 2007. Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. DNA repair, 6, 8, 1145-54.

Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE, 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. In: History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation. Eds: Springer, p. 31-49.

Helleday T, 2012. DNA repair pathways as target for cancer therapy. Toxicology Letters, 211, S9.

Hikino H, Konno C, Mirin Y, Hayashi T, 1985. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of Ganoderma lucidum fruit bodies. Planta medica, 51, 04, 339-40.

Hodskinson MR, Silhan J, Crossan GP, Garaycoechea JI, Mukherjee S, Johnson CM, Schärer OD, Patel KJ, 2014. Mouse SLX4 is a tumor suppressor that stimulates the activity of the nuclease XPF-ERCC1 in DNA crosslink repair. Molecular cell, 54, 3, 472-84.

Hoeijmakers JH, 2009. DNA damage, aging, and cancer. New England Journal of Medicine, 361, 15, 1475-85.

Hopfner K-P, Putnam CD, Tainer JA, 2002. DNA double-strand break repair from head to tail. Current opinion in structural biology, 12, 1, 115-22.

Hsu HY CY, Shen SJ, Hsu CS, Chen CC, Chang HC, 1985. A Concise Guide. Eds: Oriental Materia Medica., Long Beach, CA, USA, Oriental Healing Arts Institute, p. 640-641.

Huang J-C, Svoboda DL, Reardon JT, Sancar A, 1992. Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5'and the 6th phosphodiester bond 3'to the photodimer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89, 8, 3664-8.

Huie CW, Di X, 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. Journal of Chromatography B, 812, 1, 241-57.

Iyama T, Wilson DM, 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA repair, 12, 8, 620-36.

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP, 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. Nature cell biology, 8, 1, 37.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D, 2011. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians, 61, 2, 69-90.

Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T, 2011. DNA repair deficiency in neurodegeneration. Progress in neurobiology, 94, 2, 166-200.

Jiang J, Grieb B, Thyagarajan A, Sliva D, 2008. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-κB signaling. International Journal of Oncology, 21, 5, 577-84.

Jones S, Janardhanan KK, 2000. Antioxidant and antitumor activity of Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst.—Reishi (Aphyllophoromycetideae) from South India. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2, 3.

Jong S, Birmingham J, 1992. Medicinal benefits of the mushroom Ganoderma. Advances in applied microbiology, 37, 101-34.

Joseph S, Sabulal B, George V, Antony K, Janardhanan K, 2011. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from Ganoderma lucidum. Acta pharmaceutica, 61, 3, 335-42.

Kahlem P, Dörken B, Schmitt CA, 2004. Cellular senescence in cancer treatment: friend or foe? Journal of Clinical Investigation, 113, 2, 169.

Kamileri I, Karakasilioti I, Garinis GA, 2012. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. Trends in genetics, 28, 11, 566-73.

Karahalil B, 1996. Çocuk işçilerde polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAH) maruziyetin biyoizlenmesi ve genotoksik hasarın araştırılması., Doktora, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Kastan MB, Bartek J, 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature, 432, 7015, 316.

Kawabata TT, Chapman MY, Dong-Hyun K, Stevens WD, Holsapple MP, 1990. Mechanisms of in vitro immunosuppression by hepatocyte-generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroperoxycyclophosphamide. Biochemical pharmacology, 40, 5, 927-35.

Kawagishi H, Mitsunaga S-I, Yamawaki M, Ido M, Shimada A, Kinoshita T, Murata T, Usui T, Kimura A, Chiba S, 1997. A lectin from mycelia of the fungus Ganoderma lucidum. Phytochemistry, 44, 1, 7-10.

Kayaalp S, 2009. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1, 8.

Kearsley JH, 1986. Cytotoxic chemotherapy for common adult malignancies:" the emperor's new clothes" revisited? British medical journal (Clinical research ed.), 293, 6551, 871.

Kelland L, 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature reviews. Cancer, 7, 8, 573.

Kern JC, Kehrer JP, 2002. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. Chemico-biological interactions, 139, 1, 79-95.

Khan TS, Sundin A, Juhlin C, Wilander E, Öberg K, Eriksson B, 2004. Vincristine, cisplatin, teniposide, and cyclophosphamide combination in the treatment of recurrent or metastatic adrenocortical cancer. Medical Oncology, 21, 2, 167-77.

Kim HW, Kim BK, (2002). Recent advances on the biologically active triterpenoids of Ganoderma lucidum, Beijing Medical university press, Beijing, Genet. Chem. Pharmacol. Ther**:** 10-9.

Kim KC, Kim I, 1999. Ganoderma lucidum extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. International Journal of Molecular Medicine, 4, 3, 273-80.

Kim S-D, Nho HJ, 2004. Isolation and characterization of α-glucosidase inhibitor from the fungus Ganoderma lucidum. The Journal of Microbiology, 42, 3, 223-7.

Kinlen L, Peto J, Doll R, Sheil A, 1981. Cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. British medical journal (Clinical research ed.), 282, 6262, 474.

Kızılcı S, 1999. Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler. Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 3, 2, 18-26.

Kolesnikova O, Tuzova M, Kozlov V, 1997. Screening of immunoreactive properties of alkancarbonic acids derivatives and permanium organic compounds in vivo. IMMUNOLOGIIA-MOSKVA-MEDITSINA-, 36-8.

Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T, 2010. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. Journal of nucleic acids, 2010.

Kottemann MC, Smogorzewska A, 2013. Fanconi anemia and the repair of Watson and Crick crosslinks. Nature, 493, 7432, 356.

Kubota T, Asaka Y, Miura I, Mori H, 1982. Structures of Ganoderic Acid A and B, Two New Lanostane Type Bitter Triterpenes from Ganoderma lucidum (FR.) KARST. Helvetica Chimica Acta, 65, 2, 611-9.

Kulaksiz G, Sancar A, 2007. Nucleotide excision repair and cancer. TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI, 32, 3, 104-11.

Kwon S-C, Kim Y-B, 2011. Antifibrotic activity a fermentation filtrate of Ganoderma lucidum. Laboratory animal research, 27, 4, 369-71.

Lameire N, Kruse V, Rottey S, 2011. Nephrotoxicity of anticancer drugs–an underestimated problem? Acta Clinica Belgica, 66, 5, 337-45.

Lee KM, Lee SY, Lee HY, 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of Ganoderma lucidum in an air-lift fermentor. Journal of bioscience and bioengineering, 88, 6, 646-50.

Levine LA, Richie JP, 1989. Urological complications of cyclophosphamide. The Journal of urology, 141, 5, 1063-9.

Li J, Zhang J, Liu Y, Ye G, 2012. Increased expression of DNA repair gene XPF enhances resistance to hydroxycamptothecin in bladder cancer. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 18, 4, BR156.

Lin J, Redies C, 2012. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. Development genes and evolution, 222, 6, 369-76.

Lin S, Wang S, Lin Z, Lin Y, 2002. Purification and identification of glycopeptides from Ganoderma lucidum fruit bodies cultivated with grass and wood log. Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and therapeutics. Beijing Medical University Press, Beijng, 109-14.

Lin W-C, Lin W-L, 2006. Ameliorative effect of Ganoderma lucidum on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. World Journal of Gastroenterology: WJG, 12, 2, 265.

Lin Z-b, Zhang H-n, 2004. Anti-tumor and immunoregulatory activities of Ganoderma lucidum and its possible mechanisms. Acta Pharmacologica Sinica, 25, 1387-95.

Lin Z, 2002. Progress of studies on the anti-tumor activity and immunomodulating effect of Ganoderma. J Peking Univ (Health Sci), 34, 5, 493-8.

Lindahl T, 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. nature, 362, 6422, 709-15.

Liu GT, 1999. Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of Ganoderma P. Karst. species (Aphyllophoromycetideae) in China. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1, 1.

Liu L, Gerson SL, 2006. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. Clinical cancer research, 12, 2, 328-31.

Luqmani Y, 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Medical Principles and Practice, 14, Suppl. 1, 35-48.

Ma J, Ye Q, Hua Y, Zhang D, Cooper R, Chang MN, Chang JY, Sun HH, 2002. New Lanostanoids from the Mushroom Ganoderma l ucidum. Journal of natural products, 65, 1, 72-5.

Maccubbin AE, Caballes L, Riordan JM, Huang DH, Gurtoo HL, 1991. A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. Cancer research, 51, 3, 886-92.

Mahato SB, Sen S, 1997. Advances in triterpenoid research, 1990–1994. Phytochemistry, 44, 7, 1185-236.

Manandhar M, Boulware KS, Wood RD, 2015. The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products. Gene, 569, 2, 153-61.

Manson MM, Gescher A, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent SA, 2000. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. Toxicology letters, 112, 499-505.
Martin SA, Lord CJ, Ashworth A, 2010. Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. Clinical cancer research, 16, 21, 5107-13.
Mashour NH, Lin GI, Frishman WH, 1998. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease: clinical considerations. Archives of Internal Medicine, 158, 20, 2225-34.
Mau J-L, Lin H-C, Chen C-C, 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International, 34, 6, 521-6.
McKenna DJ, Jones K, Hughes K, 2002. Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements, Psychology Press, p.
Meistrich M, Wilson G, Brown B, Da Cunha M, Lipshultz L, 1992. Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. Cancer, 70, 11, 2703-12.
Melis JP, Luijten M, Mullenders LH, van Steeg H, 2011. The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 728, 3, 107-17.
Miyazaki T, Nishijima M, 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of Ganoderma lucidum. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 29, 12, 3611-6.
Mizuno T, Wang G, Zhang J, Kawagishi H, Nishitoba T, Li J, 1995. Reishi, Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae: bioactive substances and medicinal effects. Food Reviews International, 11, 1, 151-66.
Moncalvo J-M, Ryvarden L, 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk, Fungiflora, p.
Moncalvo J, 2000. Systematics of Ganoderma. Ganoderma diseases of perennial crops, 23-45.
Morandi P, Ruffini P, Benvenuto G, Raimondi R, Fosser V, 2005. Cardiac toxicity of high-dose chemotherapy. Bone marrow transplantation, 35, 4, 323.
Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fukui K, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S, 2010. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. Journal of nucleic acids, 2010.
Motawi TM, Sadik NA, Refaat A, 2010. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. Food and Chemical Toxicology, 48, 8, 2326-36.
Mu D, Hsu DS, Sancar A, 1996. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. Journal of Biological Chemistry, 271, 14, 8285-94.
Munoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA, 2005. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. Nature genetics, 37, 10, 1063.
Murray CJ, Lopez AD, 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. The Lancet, 349, 9064, 1498-504.
Murray D, Rosenberg E, 1996. The importance of the ERCC1ERCC4 [XPF] complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its

participation in the nucleotide excision repair pathway. Mutation Research/DNA Repair, 364, 3, 217-26.
Mushrooms M, 1995. An Exploration of Tradition, Healing and Culture. Christopher Hobbs.
Myers JS, Cortez D, 2006. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. Journal of Biological Chemistry, 281, 14, 9346-50.
Newton HB, 2012. Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system. Handbook of clinical neurology, 105, 903-16.
Ng C-T, Li JJ, Bay B-H, Yung L-YL, 2010. Current studies into the genotoxic effects of nanomaterials. Journal of nucleic acids, 2010.
Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers N, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, 2004. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. Molecular and cellular biology, 24, 13, 5776-87.
Nishitoba T, Sato H, Kasai T, Kawagishi H, Sakamura S, 1985. New bitter C27 and C30 terpenoids from the fungus Ganoderma lucidum (Reishi). Agricultural and biological chemistry, 49, 6, 1793-8.
O'Connor PM, Kohn KW, 1990. Comparative pharmacokinetics of DNA lesion formation and removal following treatment of L1210 cells with nitrogen mustards. Cancer communications, 2, 12, 387-94.
Onkoloji Hemşire Derneği O, 2009. Antineoplastik ilaçların güvenli kullanım standartları rehberi, p.
Öğrünç M, Becker D, Ragsdale S, Sancar A, 1998. Nucleotide excision repair: from E. Coli to man. Biochimie, 81, 15-25.
Papaldo P, Lopez M, Marolla P, Cortesi E, Antimi M, Terzoli E, Vici P, Barone C, Ferretti G, Di Cosimo S, 2005. Impact of five prophylactic filgrastim schedules on hematologic toxicity in early breast cancer patients treated with epirubicin and cyclophosphamide. Journal of clinical oncology, 23, 28, 6908-18.
Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR, 2005. Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. Cancer Research, 65, 10, 4211-7.
Paterson RRM, 2006. Ganoderma–a therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 67, 18, 1985-2001.
Paul C, Nagano M, Robaire B, 2011. Aging results in differential regulation of DNA repair pathways in pachytene spermatocytes in the Brown Norway rat. Biology of reproduction, 85, 6, 1269-78.
Pillai TG, Nair CKK, Janardhanan K, 2008. Polysaccharides isolated from Ganoderma lucidum occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. Environmental toxicology and pharmacology, 26, 1, 80-5.
Pillai TG, Salvi VP, Maurya DK, Nair CKK, Janardhanan K, 2006. Prevention of radiation-induced damages by aqueous extract of Ganoderma lucidum occurring in southern parts of India. Current Science, 341-4.
Plowchalk DR, Mattison DR, 1991. Phosphoramide mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicology and applied pharmacology, 107, 3, 472-81.

Povirk LF, Shuker DE, 1994. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 318, 3, 205-26.
Rahn JJ, Adair GM, Nairn RS, 2010. Multiple roles of ERCC1-XPF in mammalian interstrand crosslink repair. Environmental and molecular mutagenesis, 51, 6, 567-81.
Rajasekaran M, Kalaimagal C, 2011. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, Ganoderma Lucidum. Journal of Pharmaceutical Sciences Research, 3, 1427-33.
Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A, 1997. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 17, 9463-8.
Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, Quaiyoom A, Sultana S, 2012. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. Molecular and cellular biochemistry, 365, 1-2, 119-27.
Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G, 2010. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. Targeted oncology, 5, 3, 161-5.
Robertson A, Klungland A, Rognes T, Leiros I, 2009. DNA repair in mammalian cells. Cellular and molecular life sciences, 66, 6, 981-93.
Rocha CRR, Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CFM, 2013. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 752, 1, 25-35.
Salvadori DM, Ribeiro LR, Oliveira MD, Pereira CA, Beçak W, 1992. The protective effect of ß-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 265, 2, 237-44.
Sancar A, 1996. DNA excision repair. Annual review of biochemistry, 65, 1, 43-81.
Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S, 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual review of biochemistry, 73, 1, 39-85.
Sancar A, Reardon JT, 2004. Nucleotide excision repair in E. coli and man. Advances in protein chemistry, 69, 43-71.
Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad G, Bisen P, 2009. Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus. Current pharmaceutical biotechnology, 10, 8, 717-42.
Sato H, Nishitoba T, Shirasu S, Oda K, Sakamura S, 1986. Ganoderiol A and B, new triterpenoids from the fungus Ganoderma lucidum (Reishi). Agricultural and biological chemistry, 50, 11, 2887-90.
Schärer OD, 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5, 10, a012609.
Schiestl RH, Prakash S, 1990. RAD10, an excision repair gene of Saccharomyces cerevisiae, is involved in the RAD1 pathway of mitotic recombination. Molecular and cellular biology, 10, 6, 2485-91.
Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P, 2006. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. Toxicology, 217, 1, 71-8.
Shi Yl, James AE, Benzie IF, Buswell JA, 2002. Mushroom-derived preparations in the prevention of H2O2-induced oxidative damage to cellular DNA. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, 22, 2, 103-11.

Sifton D, 2000. Physicians' Desk Reference., Montvale, New Jersey, Medical Economics Company, p. 859–861.
Sliva D, 2003. Ganoderma lucidum (Reishi) in cancer treatment. Integrative cancer therapies, 2, 4, 358-64.
Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE, 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 531, 1, 231-51.
Smina T, De S, Devasagayam T, Adhikari S, Janardhanan K, 2011. Ganoderma lucidum total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes in vitro. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 726, 2, 188-94.
Smith J, Mun Tho L, Xu N, Gillespie DA, 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Advances in cancer research, 108, C, 73-112.
Smith J, Rowan N, Sullivan R, 2002. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, Cancer Research UK London, p.
Stamets P, (2000). Growth parameters for gourmet and medicinal mushroom species, growing gourmet and medicinal mushrooms, Ten Speed Press, Berkeley, California, USA.
Su C-H, Yang Y-Z, Ho H-O, Hu C-H, Sheu M-T, 2001. High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from Ganoderma. Journal of chromatographic science, 39, 3, 93-100.
Swift LH, Golsteyn RM, 2014. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. International journal of molecular sciences, 15, 3, 3403-31.
Symington LS, Gautier J, 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. Annual review of genetics, 45, 247-71.
Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM, 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. Nature reviews. Drug discovery, 5, 3, 219.
Thompson LH, Hinz JM, 2009. Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 668, 1, 54-72.
Tolbert PE, Shy CM, Allen JW, 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 271, 1, 69-77.
Tomkinson AE, Bardwell AJ, Bardwell L, Tappe NJ, Friedberg EC, 1993. Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. Nature, 362, 6423, 860.
Tomkinson AE, Mackey ZB, 1998. Structure and function of mammalian DNA ligases. Mutation Research/DNA Repair, 407, 1, 1-9.
Tomoda M, Gonda R, Kasahara Y, Hikino H, 1986. Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of Ganoderma lucidum fruit bodies. Phytochemistry, 25, 12, 2817-20.
Upton R, 2000. American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium: Reishi Mushroom, Ganoderma lucidum. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. USA Canada: Santa Cruz.

Van Der Hem LG, Van Der Vliet JA, Bocken CFM, Kino K, Hoitsma AJ, Tax WJ, 1995. Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. Transplantation, 60, 5, 438-43.

Vasser SP, Weis AL, Nevo E, 1997. Medicinal mushrooms:'Ganoderma lucidum'(Curtis: Fr.) P. Karst: Reishi mushroom, International Centre for Cryptogamic Plants and Fungi Institute of Evolution-University of Haifa Israel; San Antonio: Int, p.

Vinson RK, Hales BF, 2001. Nucleotide excision repair gene expression in the rat conceptus during organogenesis. Mutation Research/DNA Repair, 486, 2, 113-23.

Wachtel-Galor S, Choi S-W, Benzie IF, 2005. Effect of Ganoderma lucidum on human DNA is dose dependent and mediated by hydrogen peroxide. Redox Report, 10, 3, 145-9.

Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IF, 2011. Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi).

Wagner JM, Karnitz LM, 2009. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. Molecular pharmacology, 76, 1, 208-14.

Wan B, Yin J, Horvath K, Sarkar J, Chen Y, Wu J, Wan K, Lu J, Gu P, Yu EY, 2013. SLX4 assembles a telomere maintenance toolkit by bridging multiple endonucleases with telomeres. Cell reports, 4, 5, 861-9.

Wang H, Ng TB, Ooi VE, 1998. Lectins from mushrooms. Mycological Research, 102, 8, 897-906.

Wang L, Albasi C, Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, Dorandeu C, Marion B, Causserand C, 2009. Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane. Water research, 43, 17, 4115-22.

Wang Y-Y, Khoo K-H, Chen S-T, Lin C-C, Wong C-H, Lin C-H, 2002. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of Ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorganic & medicinal chemistry, 10, 4, 1057-62.

Wasser S, 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied microbiology and biotechnology, 60, 3, 258-74.

Wasser SP, 2005. Reishi or Ling Zhi (Ganoderma lucidum). Encyclopedia of Dietary Supplements, 1, 603-22.

Wasser SP, Weis AL, 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. International Journal of medicinal mushrooms, 1, 1.

Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiiwa K, Tanaka M, 2001. FR167653 improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. Journal of Surgical Research, 101, 2, 146-51.

Weissman L, de Souza-Pinto NC, Stevnsner T, Bohr V, 2007. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. Neuroscience, 145, 4, 1318-29.

West NJ, 1997. Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 17, 4, 696-706.

Whirl-Carrillo M, McDonagh E, Hebert J, Gong L, Sangkuhl K, Thorn C, Altman R, Klein TE, 2012. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 92, 4, 414-7.

Wijnhoven SW, Hoogervorst EM, de Waard H, van der Horst GT, van Steeg H, 2007. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 614, 1, 77-94.

Wolf T, Luepke N-P, 1997. Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 394, 1, 163-75.

Woo Y-A, Kim H-J, Cho J, Chung H, 1999. Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 21, 2, 407-13.

Wood RD, 2010. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. Environmental and molecular mutagenesis, 51, 6, 520-6.

Wood RD, Burki HJ, Hughes M, Poley A, 1983. Radiation-induced lethality and mutation in a repair-deficient CHO cell line. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 43, 2, 207-13.

Woods D, Turchi JJ, 2013. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. Cancer biology & therapy, 14, 5, 379-89.

Wu Y, Mitchell TR, Zhu X-D, 2008. Human XPF controls TRF2 and telomere length maintenance through distinctive mechanisms. Mechanisms of ageing and development, 129, 10, 602-10.

Xu X, Yan H, Chen J, Zhang X, 2011. Bioactive proteins from mushrooms. Biotechnology advances, 29, 6, 667-74.

Ying J, Mao X, Mao Q, Zong Y, Wen H, 1987. Icons of medicinal mushroom from China. Science, Beijing, 151-5.

Yoshioka K-i, Yoshioka Y, Hsieh P, 2006. ATR kinase activation mediated by MutSα and MutLα in response to cytotoxic O 6-methylguanine adducts. Molecular cell, 22, 4, 501-10.

Zhang L-n, Zhang M, Chen J-h, Zeng F-b, 2001. Solution properties of antitumor carboxymethylated derivatives of α-(1→ 3)-D-Glucan from Ganoderma lucidum. 高分子科学, 19, 3, 283-9.

Zhang QH, Wu CF, Duan L, Yang JY, 2008. Protective effects of ginsenoside Rg3 against cyclophosphamide-induced DNA damage and cell apoptosis in mice. Archives of toxicology, 82, 2, 117-23.

Zhao J, Zhang X. Importance, distribution and taxonomy of Ganodermataceae in China. Proceedings of Contributed Symposium, 14-21.

Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K, 2007. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. The American journal of Chinese medicine, 35, 04, 559-74.

Zhu X-D, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T, 2003. ERCC1/XPF removes the 3′ overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. Molecular cell, 12, 6, 1489-98.

7.EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı



SELÇUK
ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
Veteriner Fakültesi Dekanlığı

05 AGU 2016

Sayı : 25859467/511
Konu :

..... / ..... /20....

Sayın;
Doç.Dr.Emine ARSLAN
S.Ü.Fen Fakültesi

Fakülteniz Etik Kurulunun 29.07.2016 tarih ve 61 Sayılı Karar örneği ekte gönderilmiştir.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr.Ahmet GÜNER
Dekan V.

Ek:2

Adres: S.Ü. Alaeddin Keykubad Kampüsü 42003 KONYA • Tel : (0332) 241 00 59 • Faks : (0332) 241 00 63
Elektronik Ağ:http://veteriner.selcuk.edu.tr • e-posta : vetfak@selcuk.edu.tr

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	29.07.2016	Toplantı Sayısı	2016/07	Karar Sayısı	2016/61

S.Ü. Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Emine ARSLAN tarafından sunulan "**Siklofosfamid ile indüklenerek DNA hasarı oluşturulmuş civciv embriyolarında Ganoderma lucidum (Ölümsüzlük Mantarı)'un Xpf gen ekspresyonu üzerine etkisi**" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Bu araştırma ile çift iplikli DNA kırıklarına neden olan siklofosfamidin indüklediği civciv embriyolarındaki DNA hasarı üzerine mantarın sulu ekstraksiyonunun tamir etkisinin veya olası bir koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılacağı ifade edilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ Başkan	Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ Üye (Katılmadı)	Doç. Dr. Serdar İZMİRLİ Raportör Üye

Doç. Dr. Mustafa GARİP Üye	Ayşegül KURTBEYOĞLU Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)	Salih Zeki ALPTEKİN Sivil Üye

KONYA

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ KONÜDAM DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ ETİK KURULU

KONÜDAM

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI



İlkyaz YILMAZ

16 - 25 Şubat 2015 tarihleri arasında araştırıcılar için düzenlenen "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı"nı başarıyla tamamlayarak bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Deney hayvanlarının anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve biyokimyası (teorik: 3 s)
Mevzuat (teorik: 2 s)
Hayvan deneyleri etiği (teorik: 2 s)
Alternatif metotlar (teorik: 4 s)
Tutuş teknikleri (teorik: 3 s)
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri (teorik: 3 s)
Kan ve örnek alma teknikleri (teorik: 3 s)
Anestezi ve ölanazi teknikleri (teorik: 3 s)
Laboratuar işletmesi (teorik: 1 s)
Temel laboratuar güvenliği ve temizlik (teorik: 6 s)
Hayvan refahı ve davranış özellikleri (teorik: 3 s)
Deney hayvanları üretimi (teorik: 2 s)
Deney hayvanlarının beslenmesi (teorik: 1 s)
Hayvan hastalıkları (teorik: 2 s)
İş sağlığı ve güvenliği (teorik: 2 s)
Laboratuar stajı (uygulama: 40 s)

Sertifika Numarası: 2015-020

Prof. Dr. Selim KUTLU
KONÜDAM Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Muzaffer ŞEKER
Necmettin Erbakan Üniversitesi Rektörü

Bu kurs, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programına Dair Genelge'sine (2007-11) uygun olarak hazırlanmıştır.

EK C: Tezden Türetilmiş Yayınlar

Yılmaz İ, Arslan E, Özparlak H. 2017. The Effect of Wild-Grown *Ganoderma lucidum* on *Xpf* Gene Expression in Chicken Embryos DNA Damage Induced by Cyclophosphamide. International DNA Day and Genome Congress. Sözlü sunum. 24-28 Nisan 2017. Kırşehir.

8.ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı	**:** YILMAZ, İlkyaz
Uyruğu	**:** T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:** Lefkoşa/KKTC, 18.01.1991
Medeni Hali	**:** Bekar
Telefon	**:** 0544 644 18 19
e-mail	**:** ilkyaz.yilmaz@yahoo.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Yüksek Lisans	Selçuk Üniversitesi	Devam ediyor
Lisans	Selçuk Üniversitesi	2013
Lise	Naciye Mumcuoğlu Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
2012	Selçuk Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2015	Novafertil IVF	Klinik Biyolog
2015	TÜBİTAK	Proje Bursiyeri

Yabancı Dil

İngilizce