

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Scloderma verrucosum, Sarcodon imbricatus ve Cantharellus cibarius
MANTARLARININ SIĞIR KARACİĞERİ ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sercan ÇADIRCI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2014

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sercan ÇADIRCI tarafından hazırlanan “*Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus* ve *Cantharellus cibarius* Mantarlarının Sığır Karaciğeri Aldoza Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 23/10/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

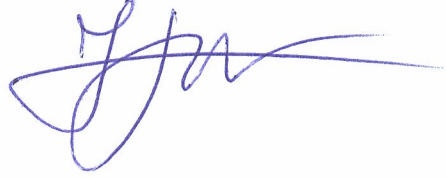
Danışman : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Biyoloji A.B.D.



Üye : Doç. Dr. Ilgaz AKATA
Ankara Üniversitesi Biyoloji A.B.D.



Üye : Doç. Dr. Gülçin SAĞDIÇIOĞLU CELEP
Gazi Üniversitesi Endüstriyel Sanatlar Eğitim Fakültesi
Aile ve Tüketici Bilimleri Bölümü
Besin ve Beslenme Teknolojisi A.B.D.



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

23.10.2014



Öğrencinin Adı Soyadı

Sercan ÇADIRCI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Scleroderma verrucosum, *Sarcodon imbricatus* ve *Cantharellus cibarius*
MANTARLARININ SIĞIR KARACİĞERİ ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sercan ÇADIRCI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr.Özlem YILDIRIM

Çalışmalarda *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus* ve *Cantharellus cibarius* mantarlarının ekstraksiyonu metanol çözgeni ile gerçekleştirilmiş, *Cantharellus cibarius* mantar özütünde çözünmeden kalan fraksiyonlar için etanol çözgeni kullanılmıştır. Mantarların toplam polifenol miktarı Folin-Ciocalteu metodu, toplam flavonoid miktarı ise Alüminyum Klorür Kolorimetrik metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Deneylerde kullanılan AR enzimi normal şartlarda yetiştirilen sığırların karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enziminin aktivitesi spektrofotometrik metodun bazı modifikasyonlarla geliştirilmesi sonucu oluşturulan analiz metodu ile tayin edilmiştir Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan DL-Gliseraldehit, AR enzimi tarafından gliserole indirgenmektedir. Aynı zamanda, AR enziminin kofaktörü olan NADPH da NADP⁺ 'ya okside edilmektedir. NADPH'ın oksidasyonu SpectraMax M2 mikropilok okuyucusu kullanılarak 340 nm dalga boyunda takip edilmiştir. *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus* ve *Cantharellus cibarius* 'dan ekstre edilen özütlerin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri *in vitro* incelenmiştir.

Ekim 2014, 45 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aldoaz redüktaz, *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius*, polifenol, flavonoid

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus* and *Cantharellus cibarius* MUSHROOMS ON THE BOVINE LIVER ALDOSE REDUCTASE ENZYME ACTIVITY

Sercan ÇADIRCI

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Özlem YILDIRIM

Scleroderma verrucosum, *Sarcodon imbricatus* and *Cantharellus cibarius* mushrooms were extracted with methanol solvent and insoluble fractions for *Cantharellus cibarius* was treated with ethanol solvent. Total polyphenol content were calculated with Folin-Ciocalteu method and total flavonoid content was determined with Aluminium-Chloride Colorimetric method. The AR enzyme was isolated from bovine liver. The aldose reductase enzyme activity was determined by spectrophotometric method which was developed with some modifical changes. In this method, DL-Glyceraldehyde, the substrate, is reduced to glycerol by aldose reductase enzyme. Also, the cofactor, NADPH is oxidised to NADP⁺. The oxidation of NADPH was followed with Spectramax M2 Microplate Reader in 340 nm wave length. The effects of the extracts of *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus* and *Cantharellus cibarius* on the bovine liver aldose reductase enzyme activity was analysed *in vitro*.

October 2014, 45 pages

Key Words: Aldose reductase, *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius*, polyphenol, flavonoid

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Araştırmalarımın her aşamasında bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, sıcacık yüreğini aralayıp akademik ortamda olduğu kadar hayatın her aşamasında yanımda olan, mesleğimin ayrıntılarını öğretip insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Araştırmalarım süresince değerli yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Belgin İŞGÖR'e (Atılım Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Uygulamalı Kimya Bölümü), örneklerimizin toplanması ve teşhisindeki emeklerinden ötürü değerli hocam Doç. Dr. Ilgaz AKATA'ya (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), bilimsel açıdan faydalandığım çok değerli yorum ve katkılarından ötürü sayın hocam Doç. Dr. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'e (Gazi Üniversitesi Besin ve Beslenme Teknolojisi Anabilim Dalı),

Beni bugünlere getiren, huzur ve mutluluk dayanağım aileme, en sıkıntılı zamanları tatlı bir tebessüme çeviren, yardımsever hocam Dr. Naznoosh SHOMALI başta olmak üzere tüm yüksek lisans ekip arkadaşlarıma ve hayatımın her anında destekçim olan, zorlu yarınlarımı umut dolu bir geleceğe çeviren yüreğimin en güzel köşesi Elif ÇAKIROĞLU 'ya tüm özverilerinden dolayı:

Teşekkürlerimi sunarım.

Sercan ÇADIRCI

Ankara, Ekim 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1 <i>Sarcodon imbricatus</i>	2
2.2 <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.....	3
2.3 <i>Scleroderma verrucosum</i> (Bull.) Pers	4
2.4 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları	5
2.5 Biyoaktif Mantar Metabolitleri	7
2.5.1 Fenolik bileşikler	7
2.5.2 Flavonoidler	9
2.6 Aldoz Redüktaz	10
2.6.1 Aldoz redüktaz enziminin yapısı ve işlevi	10
2.6.2 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi.....	12
2.6.3 Aldoz Redüktaz enziminin kanserle ilişkisi ve aldoz redüktaz inhibitörleri.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1 Materyal	19
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Mantar örneklerinin toplanması ve ekstraksiyon aşamasına hazırlanması	20
3.2.2 Mantarların ekstraksiyonu	21
3.2.3 Mantar özütlerinin polifenol miktarı tayini	22
3.2.4 Mantar özütlerinin flavonoid miktarı tayini	23
3.2.5 AR enziminin izolasyonu	24
3.2.6 Protein miktarı tayini	25
3.2.7 AR enzim aktivite tayini	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ.....	45

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
R	Radikal
OH	Hidroksi
H	Hidrojen
O	Oksijen
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
dk	Dakika
OD	Optik Dansite
%	Yüzde
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
AlCl_3	Alüminyum Klorid
Li_2SO_4	Lityum Sülfat
KP	Potasyum Fosfat
CuSO_4	Bakır Sülfat
Mg	Magnezyum

Kısaltmalar

NF-kB	Nüklear faktör kapa B
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
R	Radikal
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükelotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükelotid Fosfat
kDa	Kilodalton
ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
GSH	Glutasyon
Na/K	Sodyum/Potasyum
AR	Aldoz redüktaz
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
AP1	Aktivatör Protein 1
PKC	Protein Kinaz C
DAG	Diaçilgliserol
P13k	Fosfoinositid-3-Kinaz
HNE	4-hidroksitran 2-nonenol
DHN	1-4-dihidroksinonen

COX	Siklooksijenaz
PMSF	Fenilmetansufonilflorid
EDTA	Etilendiamin Tetraasteik Asit
Tyr	Tirozin
Trp	Triptofan
Cys	Sistein
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
DMSO	Dimetil sulfoksit
BSA	Sığır Serum Albümini
DDS	Deiyonize Distile Su
Log	Logaritma
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Sarcodon imbricatus</i> (L.) P. Karst	2
Şekil 2.2 <i>Cantharellus cibarius</i> Fr	3
Şekil 2.3 <i>Scleroderma verrucosum</i> (Bull.) Pers.....	4
Şekil 2.4 Serbest radikallerin üretiminin temel Sebepleri, Oksidatif stres ile ilişkili muhtemel hücrel hedefler ve sonuçlar	5
Şekil 2.5 Reaktif oksijen türleri ve Reaktif nitrojen türlerinin dahil olduğu temel reaksiyonlar ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarına genel bakış	6
Şekil 2.6 Mantarlardaki flavonoidlerin kimyasal yapıları.....	10
Şekil 2.7 Aldoz redüktaz enziminin üç boyutlu yapısı	11
Şekil 2.8 Polyol metabolik yolunun ilk iki basamağı	12
Şekil 2.9 Aldoz redüktaz enziminin glukoz ile ilişkisi	13
Şekil 2.10 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyonlarla ilişkisine genel bakış	14
Şekil 2.11 Oksidatif stres ile ilişkili karsinogenezde AR enziminin rolü	17
Şekil 3.1 Trabzon il haritası üzerinde mantar türlerinin toplandığı lokasyonların gösterilmesi	21
Şekil 3.2 Aldoz redüktaz % 100 enzim aktivitesi grafiği	27
Şekil 3.3 Tez Çalışmasında kullanılan metodlar.....	28
Şekil 4.1 Folin-Ciocalteu gallik asit standart grafiği	29
Şekil 4.2 Kuersetin standart grafiği.....	30
Şekil 4.3 <i>Sarcodon imbricatus</i> mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi	32
Şekil 4.4 <i>Cantharellus cibarius</i> mantar özütünün (1.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	32

Şekil 4.5	<i>Cantharellus cibarius</i> mantar özütünün (2.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi	33
Şekil 4.6	<i>Scleroderma verrucosum</i> mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi	33
Şekil 4.7	Tüm mantar özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine etkileri	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Mantarlarda bulunan bazı benzoik asit ve sinnamik asit türevlerinin kimyasal yapısı	8
Çizelge 3.1	Tez kapsamında kullanılan mantar örnekleri	20
Çizelge 3.2	Mantar özütlerinin toplam polifenol tayini çalışma şeması	22
Çizelge 3.3	Mantar özütlerinin toplam flavonoid tayini çalışma şeması	23
Çizelge 3.4	AR enziminin protein tayini çalışma şeması	26
Çizelge 4.1	Mantar özütlerinin toplam polifenol ve toplam flavonoid miktarları	30
Çizelge 4.2	Kullanılan dozlar ve doza bağlı enzim aktiviteleri	31

1. GİRİŞ

Mantarlar, çok eski çağlardan bu yana besinsel ve tıbbi etkinleri sebebiyle değer görmektedir. Özellikle Doğu Medeniyetleri ve Uzak Doğu ülkelerinde bulunan mantarların çeşitli hastalıklara karşı geleneksel metodlar kullanılması ile başlayan tarihsel geçmiş, günümüzde tüm dünyada yapılan bilimsel çalışmalarla desteklenerek geniş bir yelpazeye yayılmıştır.

Kronik hastalıklar tüm dünyada süregelen ağır bir yük olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda tedavi süreçlerinde konvensiyonel tedavilerle birlikte destekleyici terapilere ve dolayısıyla doğal besinsel kaynaklara olan ilgi artmaktadır. Mantarlar da bu doğal kaynaklardan birisi olup, kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser tipleri, diyabet gibi birçok hastalıkla oluşan komplikasyonlarda, anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör ve nöroprotektif etkileriyle tedaviye yardımcı olmaktadır. Yapılarında bulunan polisakkaritler, proteinler ve lipitler gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşikler ile, terpenoid, alkaloid, sterol ve fenolik bileşikler gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler aracılığıyla gösterdikleri terapötik aktivitelerinin yanı sıra, tedavi süreçlerinde yan etkileri azaltması ve biyolojik cevap mekanizmalarını modifiye etmesi ile de dikkat çekmektedirler.

Diyabetik rahatsızlıklarla ve çok sayıda kanser tipi ile ilişkilendirilen ve polyol metabolik yolağının ilk aşamasını katalizleyen aldoz redüktaz (AR) enziminin inhibisyonuna dair günümüzde çok sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir. Bununla birlikte bu enzim ailesinin üyelerinin birçok kanser tipinde de değişen aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir. Bu enzimin aktivitesini değiştirebilecek potansiyel maddelere ihtiyaç vardır. Bu nedenle aldoz redüktaz enziminin aktivitesini değiştirebilecek bir maddeye ulaşmak amacı ile planladığımız tez çalışmamızda, polifenol ve flavonoid bileşikleri içeren *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum* mantar özütlerinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* ortamda araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst.

Fruktifikasyon organı, şapka ve sap olarak ayrılır. Şapka, 70-200 mm çapında, gençken konveks iken gelişme ilerledikçe düzleşir ve merkez bölgesi çukurlaşır. Açık veya sütlü kahve zemin üzerinde koyu kahverengi çıkıntılar bulunur. Sap, 50-70 × 20-40 mm, silindirik veya klavat, sapla aynı renktedir. Himenyum, dişli, açıktan koyu kahverengiye değişen tonlardadır. Etli kısım, beyaz veya krem rengindedir. Sporlar, 6-7 × 5-6 µm, genişçe eliptik, tüberküllü, pürüzsüz ve renksizdir. Bazidiyum, 30-40 × 7-8 µm, klavat ve 4 sporelidir. Yaz ve sonbahar aylarında konifer ormanlarda toprak üzerinde gelişir ve yaygın bir türdür (Breitenbach ve Kränzlin, 1986).

Lokalite: Trabzon, Uzungöl Doğa Parkı, Ladin ormanı, toprak üzeri, 1610 m, 06.10.2010, Akata 3224.



Şekil 2.1 *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst (Akata vd. 2014)

2.2 *Cantharellus cibarius* Fr.

Fruktifikasyon organı, şapka ve sap olarak ayrılır. Şapka, 30-100 mm çapında, yumurta sarısı veya turuncu renkli ve huni şeklindedir. Sap, 30-70 × 5-30 mm, şapkayla aynı renkte, silindirik, bazen sap tabanına doğru incelir. Himenyum çatallanmış damarlı, yumurta sarısı renktedir. Etli kısım, beyazımsı-açık sarı renklidir. Sporlar, 8-9 × 5 µm, eliptik, pürüzsüz ve renksizdir. Bazidiyum, 60-80 × 6-8 µm, klavat ve 4 sporelidir. Yaz ve sonbahar aylarında konifer ve yaprak döken ormanlarda toprak üzerinde gelişir ve yaygın bir türdür (Breitenbach ve Kränzlin 1986, Pegler vd. 1997).

Lokalite: Trabzon, Beşikdüzü, Aksaklı köyü, fındık bahçesi, toprak üzeri, 170 m, 08.11.2009, Akata 3012.



Şekil 2.2 *Cantharellus cibarius* Fr. (Akata vd. 2014)

2.3 *Scleroderma verrucosum* (Bull.) Pers.

Fruktifikasyon organı, 3-4 cm çapında, küremsi, genellikle tepe kısmı hafifçe yassılaşmıştır. Taban bölgesinde sap benzeri bir yapı bulunur. Yüzey, sarımsı kahverengiden kahverengiye değişen tonlarda olup üzerinde kahverengimsi pullar bulunur. Gleba, yeşilimsi kahverengidir. Sporlar, 11-13 µm, küremsi, siğilli ve koyu kahverengidir. Yaz ve sonbahar aylarında özellikle kumlu topraklarda, ormanlık ve çalılık alanlarda tek tek veya gruplar halinde gelişir. Yaygın bir türdür (Breitenbach ve Kränzlin 1986, Akata 2004, Akata vd. 2014).

Lokalite: Trabzon, Yomra, Gülyurdu köyü, yol kenarı, toprak üzeri, 430 m, 13.09.2010, Akata & Yuzun 720.

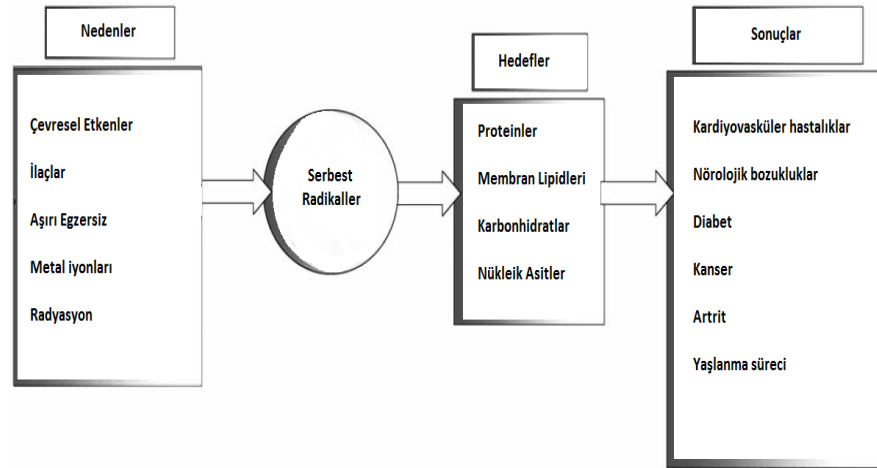


şekil 2.3 *Scleroderma verrucosum* (Bull.) Pers. (Akata vd. 2014)

2.4 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikaller, herhangi bir atom ya da molekülün en dış orbitalinde ortaklanmamış elektron bulundurması durumu olarak tanımlanır ve bu bileşikler genellikle stabil olmayıp oldukça reaktiftirler. Moleküler oksijenden türeyen serbest radikaller canlı sistemlerde üretilen radikal türlerin önemli bir sınıfını oluştururlar. Serbest radikaller aerobik hücrelerin doğal metabolizması sonucu, özellikle reaktif oksijen türlerinin varlığında (ROT) üretilirler. Bu üretimin neticesinde çoğu serbest radikal, hücresel antioksidan savunma mekanizmaları ile nötralize edilir. Normal organizma fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde serbest radikal üretimi ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin devamlılığı büyük önem taşımaktadır (Valko vd. 2007).

Oksidatif stres aşırı egzersiz ya da inflamasyon süreci gibi doğal nedenlerden, ya da ksenobiyotiklerin varlığı ve çeşitli hastalıklar gibi doğal olmayan nedenlerden kaynaklanabilir (Şekil 2.5). Serbest radikallerin kontrolsüz üretimi, kanser, diyabet, siroz, kardiyovasküler hastalıklar ve nörobiyolojik bozukluklar gibi durumlarla ve yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir (Barja 2004).



Şekil 2.4 Serbest radikallerin üretiminin temel sebepleri, oksidatif stres ile ilişkili muhtemel hücresel hedefler ve sonuçlar (Barja 2004).

2.5 Biyoaktif Mantar Metabolitleri

Mantarlar, tıbbi faydalarından dolayı fonksiyonel gıdalar olarak günümüzde oldukça cazip bir konumdadır. Mantarların biyoaktif bileşenleri, sıklıkla meyve bölümünden üretilmektedir. Bunun yanı sıra sıvı kültür ve besiyerlerinde miselyumdan da üretim yapılarak biyoaktif metabolitler elde edilebilmektedir (Chang 1996).

Mantarlar, kimyasal kompozisyonlarda çok sayıda düşük moleküler ağırlıklı poliksakkaritler, triterpenoidler, steroidler ve fenolik bileşikler üretmektedirler (Zaidman vd. 2005, Erkel ve Anke 2008, Ferreira vd. 2010). Bu bileşikler, aminoasit türevli yollar, shikimik asit yolağı, asetat-malonat yolağı, mevalonik asit yolağı ve polisakkaritler ile peptidopolisakkarit yollarının birincil metabolizmalarından ara ürünlerin türevleri şeklinde meydana gelir. Tıbbi mantarlardan izole edilen çoğu düşük moleküler ağırlıklı biyoaktif bileşik, NF- κ B, MAP Kinaz, hücre differansiyasyonu, anjiyogenez, karsinogenez ve metastaz gibi süreçlere dahil olarak etki gösterir (Petrova vd. 2008, Zhong ve Xiao 2009).

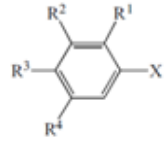
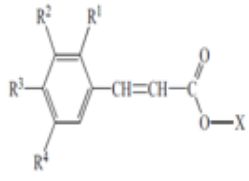
2.5.1 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, aromatik yapıda, hidroksillenmiş yani; bir ya da daha fazla hidroksil grubu ile yine bir ya da daha fazla aromatik halka taşıyan, terapötik olarak kullanılan yararlı biyoaktif bileşiklerdir (Apak vd. 2007). Fenolik bileşikler, shikimat ve asetat yollarının ürünleri olarak meydana gelip fenolik asitler, fenilpropanoidler, flavonoidler gibi basit moleküllerden lignin, tanin ve melanin gibi yüksek polimerize bileşiklere kadar çeşitlilik gösterirler. Yaygın olarak görülen flavonoidler geniş alt gruplara ayrılır. Bu polifenol içeriklerin, ateroskleroz ve kanser oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Bravo 1998, Apak vd. 2007).

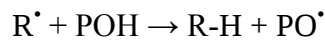
Mantarlardaki temel fenolik bileşikler, fenolik asitlerdir. Fenolik asitler hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler (Çizelge 2.1) olarak 2 temel gruba ayrılır. Hidroksibenzoik asit türevleri mantarlarda yaygın olarak polimerik yapıda yer alırlar;

ligninler ve hidrolize edilebilir taninler gibi kompleks yapıların tipik bileşenini oluştururlar. Ayrıca bitkisel gıdalarda şeker ve organik asitlere bağlı şekilde de bulunabilirler. Hidroksisinnamik asit türevleri de temel olarak polimerik formda bulunurlar. Tartarik ve quinic asitler gibi organik asitlerle ilişkilendirilebilmesine ilaveten, selüloz, lignin ve proteinler gibi hücre duvarı yapısal bileşenlerine de bağlı bulunurlar (Liu vd. 2004).

Çizelge 2.1 Mantarlarda bulunan bazı benzoik asit ve sinnamik asit türevlerinin kimyasal yapısı (Ferreira vd. 2009)

Benzoik Asit Türevleri	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
Gallik Asit	COOH	H	OH	OH	OH	
Gentisik Asit	COOH	OH	H	H	OH	
Vanilik Asit	COOH	H	OCH ₃	OH	H	
Sinnamik Asit Türevleri	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
Kaffeik Asit	H	H	OH	OH	H	
Ferulik Asit	H	H	CH ₃ O	OH	H	
Sinapik Asit	CH ₃ O	H	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	

Polifenollerin genel olarak serbest radikalleri temizlemesi belli metal şelat reaksiyonlarının uyarılmasına dayandırılır. Sağlıklı metabolik fonksiyonların gerçekleştirilebilmesi için reaktif oksijen türlerinin kaldırılması gerekir. ROS'ların konsantrasyonlarının azaltılması iyon taşıma sistemleri ve redoks sinyalleşme süreçlerini olumlu etkiler (Hall 2001). Polifenolik antioksidanlar, oksidatif stresi zincir kırma reaksiyonları ile ortadan kaldırır. Bu reaksiyonda radikale hidrojenin dahil olması söz konusudur. Dolayısıyla fenolik antioksidanların zincir reaksiyonunu sonlandırma reaksiyonları aşağıdaki şekilde gösterilebilir:

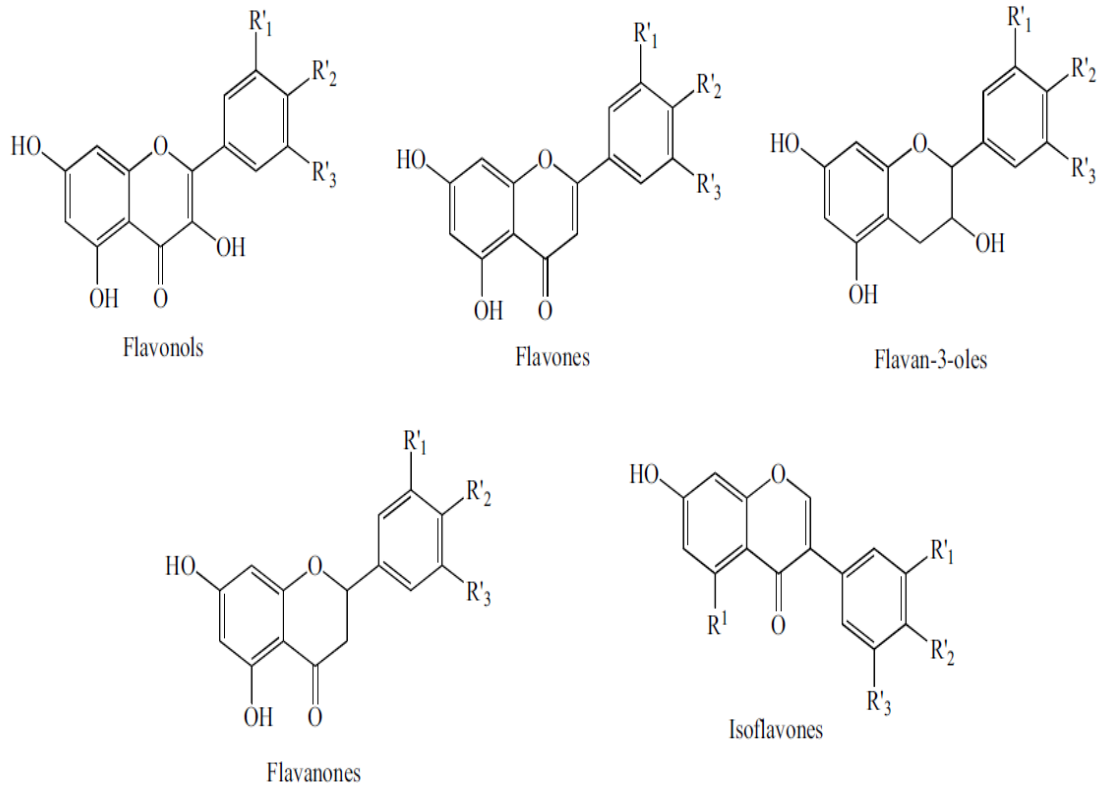


Sonuç olarak doğal fenolik antioksidanların etkisi; radikal reaksiyonlarda fenolik hidrojenin dahil olması ile bu reaksiyonlar sırasında doğal antioksidan oluşumunun kararlılığı ve kimyasal yapıdaki yer değiştirmelere bağlı olarak değişir. Bu yer değiştirmeler radikal reaksiyonların kontrolü için önem arz etmektedir (Wright vd. 2001).

2.5.2 Flavonoidler

Flavonoidler C6-C3-C6 karbon iskeleti ile karakterizedir. Bu bileşiklerin temel yapısı, 15 karbonlu halkasal yapıya fenolik hidroksillerin bağlanması ile oluşur. Heterosiklik karbon halkasının genel yapısındaki farklılıklardan dolayı flavonoidler; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antoksaninler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.7) (Iwashina 2000).

Flavonoidlerin sağlığa yararlı birçok etkisi tanımlanmıştır. Bu antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etkiler; biyoaktif enzimlerin inhibisyonu ya da detoksifiye edici enzimlerin tetiklenmesi ile ilişkilendirilir (Le Marchand vd. 2008). Flavonoidler, DNA hasarına yol açan ve tümör gelişim tetikleyicisi olan tekli oksijen molekülleri ile çeşitli serbest radikallerin ve çok sayıda oksitlenmiş molekülün yüksek etkinlikte temizleyicisi olarak gösterilmektedir (Wright vd. 2001).



Şekil 2.6 Mantarlardaki flavonoidlerin kimyasal yapıları (Ferreira vd. 2009)

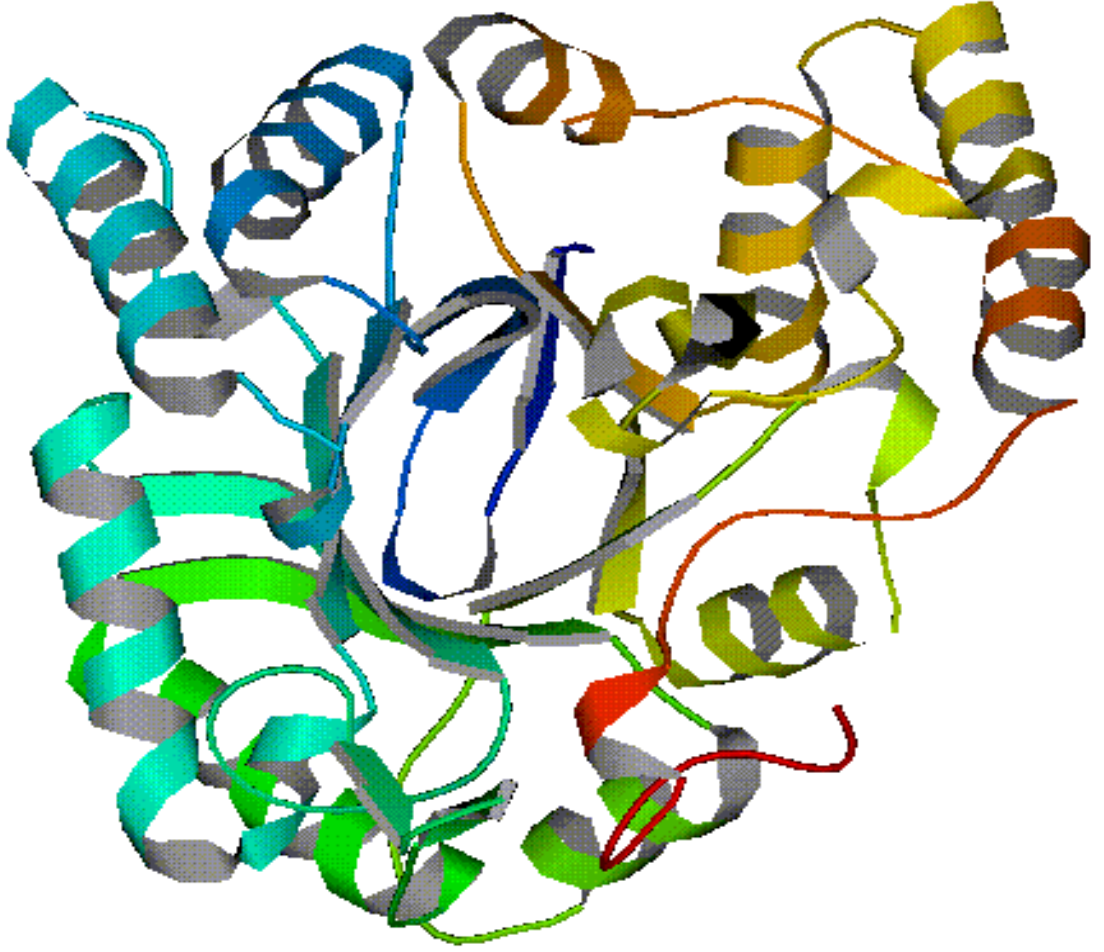
2.6 Aldoz Redüktaz

Aldoz redüktaz (AR, EC: 1.1.1.21), indirgenmiş formdaki NADPH'ı kofaktör olarak kullanan ve aldo-keto redüktazlar süper ailesine dahil monomerik bir enzimdir. (Srivastava vd. 2005). Hücre sitozolünde yer alan enzim yaklaşık 36 kDa ağırlığında olup 325 aminoasit dizisinden oluşmaktadır (Kumar ve Reddy 2007).

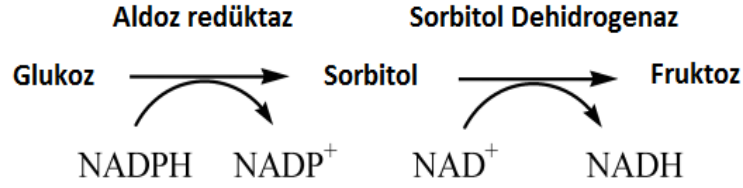
2.6.1 Aldoz redüktaz enziminin yapısı ve işlevi

Aldo-keto redüktaz süper ailesindeki diğer enzimler gibi, aldoz redüktaz da α/β fiçı modelindedir. (Şekil 2.8) Bu modelin merkezinde birbirinin ucuna eklenmiş olarak bulunan sekiz beta zincirinin etrafını, sekiz alfa heliksin sarmasıyla (α/β)₈ fiçı yapısı oluşmaktadır (Jez vd. 1997, Bohren vd. 2005).

Aldoz redüktaz, glukoz metabolizmasındaki polyol yolağının ilk ve hız kısıtlayıcı basamağını oluşturan glukozun çevrimini katalizler. Polyol yolu (Şekil 2.9) glukozun sorbitole dönüşümünü sağlayan sorbitol dehidrogenaz ile tamamlanır ve böylelikle NADPH'ın kullanımı ve NADH'ın üretimiyle birlikte polyol yolunda, glukoz fruktoza çevrilmiş olur (Petrash 2012).



Şekil 2.7 Aldoz Redüktaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı
(<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1ads.html>)

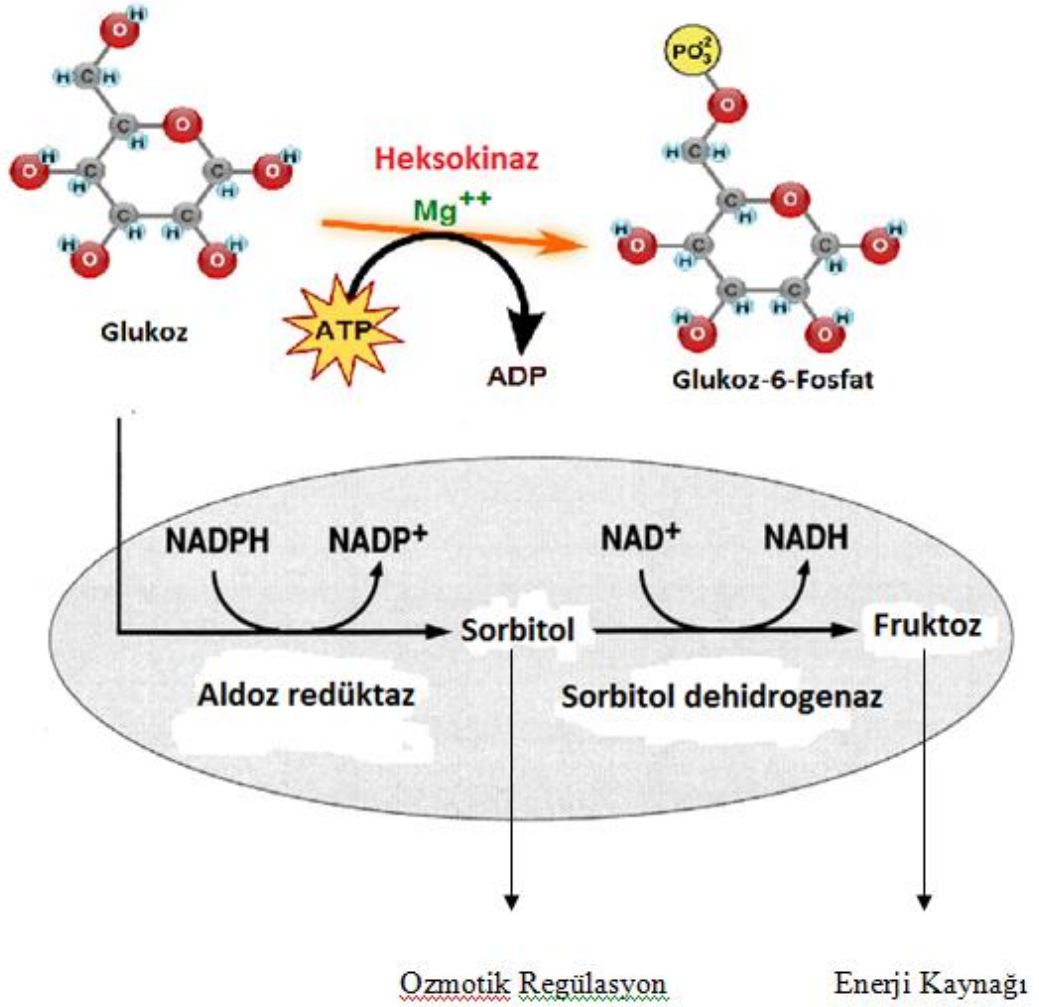


Şekil 2.8 Polyol metabolik yolunun ilk iki basamağı (Lee vd. 2008)

2.6.2 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi

Normal şartlarda, glikolizde, glukoz molekülü, heksokinaz enzimi aracılığıyla fosforillenerek glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Bu koşullarda aldoz redüktaz enziminin glukoz için afinitesi oldukça düşük olduğundan, fosforilize olmamış glukozun yaklaşık % 3'ü polyol yolağına dahil edilerek sorbitol ve fruktoza metabolize edilir. Oluşan sorbitol böbreklerde osmotik düzenlemeyi sağlarken, fruktoz ise sperm hücrelerine enerji kaynağı olarak hizmet eder (Şekil 2.10). (Yabe-Nishimura 1998, Balasubramanyam vd. 2002, Kumar ve Reddy 2007).

Kan şekerinin normal seviyesinin çok üzerine çıktığı durumlarda çeşitli dokularda aldoz redüktaz aktivitesi artar (Chan vd. 2000, Gugliucci 2000, Setter vd. 2003). Bu durumda heksokinaz enzimi doygunluğa ulaştığı için toplam glukozun % 33'ü polyol yolu ile metabolize edilir (Balasubramanyam vd. 2002). Dolayısıyla diyabetik komplikasyonların meydana gelmesinde glukozun aldoz redüktaz enzimi tarafından artan kullanımı önemli rol oynar (Chandra vd. 2002). Enzim glukozu sorbitole çevirir ve sorbitol hücre zarından geçemediği için hücre içerisinde birikerek insuline bağımlı olmayan periferik sinir hücreleri, retina ve böbrek dokularına zarar verip diyabetik komplikasyonların oluşumuna zemin hazırlar (Tanimoto vs. 1998, Nakano vd. 2003).



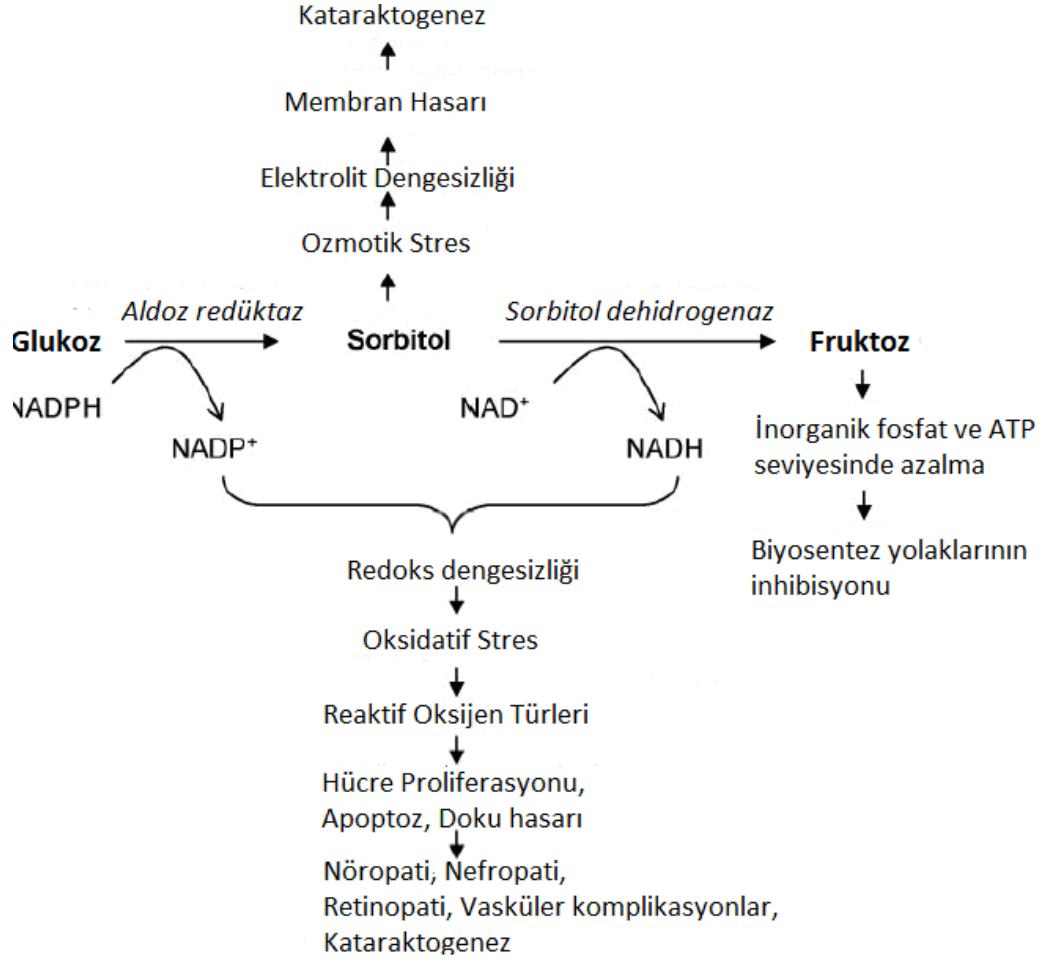
Şekil 2.9 Aldoz redüktaz enziminin glukoz ile ilişkisi

(<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/1/21/F1.expansion>
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Glycolysis.svg>)

Öte yandan aldoz redüktaz enziminin aktivitesinin aşırı artışı ile hücre içerisindeki NADPH ve NADH koenzimlerinin miktarı da değişerek, antioksidan savunma mekanizmalarına ait enzimlerin gen ifadesi engellenir. Bu durumda hücrede oksidatif stres oluşur (Larkins vd. 1992, Hodgkinson vd. 2003).

Lens dokusunda meydana gelen oksidatif stres, polyol yolağının aktivasyonu ile NADPH konsantrasyonunun ve glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin azalmasından ileri gelir (Kubo vd. 1999). Epitel hücrelerde oluşan oksidatif stres ve peroksidasyon ile meydana gelen toksik aldehytler ile doku zarar görür ve opaklaşma meydana gelir.

Aldoz redüktaz enziminin bir inhibitörü olan Genistein'in, hücresel GSH seviyesini artırarak bu durumu düzelttiği bildirilmiştir (Kim vd. 2008).



Şekil 2.10 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyonlarla ilişkisine genel bakış (Srivastava vd. 2005)

Diyabetik nöropati, periferel sinir kayıplarıyla ilgili semptomlarla kendini gösteren bir hastalıktır (Fowler 2008). Patolojik karakterizasyonu ağrı, hastalıklara duyarlılık, sinir ve duyu kayıpları ile ilişkilendirilir. (Yagihashi vd. 2007). Glukoz konsantrasyonunun artması ile aktive olan polyol metabolik yolağı ve dolayısıyla hücre içerisinde biriken fruktoz ve sorbitol, sodyum ile beraber hücreye alınan miyoinozitolün hücredeki konsantrasyonunu azaltır. Bu sebeple miyoinozitolün metaboliti olan fosfoinositid seviyesindeki azalma nedeniyle sinyal yolağı bozulur, Na/K ATPaz aktivitesi azalır ve sinirsel iletim hızı yavaşlar (Podwall ve Gooch 2004).

Diyabetik nefropati, böbreği besleyen damar sistemindeki hasarlar ile oluşur. Bu hasar verici süreç ilerlediğinde böbrek yetmezliği gelişir (Dunlop 2000, Lehman 2000). Diyabetik nefropatinin ilerlemesinde hiperglisemi aracılığıyla aktifleşmiş polyol yolağı, protein kinaz C yolağı, enzimatik olmayan glikasyon ve oksidatif stres yolakları etkili olmaktadır (Kikkawa vd. 2003).

2.6.3 Aldoz redüktaz enziminin kanserle ilişkisi ve aldoz redüktaz inhibitörleri

Aldoz redüktazın çeşitli organlardaki işlevi, lipid aldehytler ve bunların glutatyon-konjugatları ile ilişkisi ve inflamasyondaki rolü, bu enzimin diabetik komplikasyonlar dışında bir çok hastalık mekanizmasına dahil olduğunu desteklemektedir (Srivastava vd. 2007). Çoğu bulgu AR'ın alkolik karaciğer sirozu, kalp rahatsızlıkları, miyokardiyal iskemi, vasküler inflamasyon ve kanser hastalıklarında bir çok oksidatif stres ve inflamasyon ilişkili patolojik koşullarda aşırı düzeyde ifadelendiğini göstermektedir. (Zeinal-Eberhart vd. 1994, Horton vd. 1997, Ruef vd. 2000, Ramana vd. 2002).Örneğin normal karaciğerde AR ekspresyonu düşük iken, alkole bağlı olarak gelişen karaciğer rahatsızlığı olan hastaların immünoreaktivitesi, TNF- α gibi oksidatif stres ile ilişkili sitokinlerin salınımı nedeniyle artmaktadır (Tammali vd. 2011).

AR enziminin akciğer, meme, prostat, serviks, ovaryum ve kolon kanserlerinde ifade edilme düzeyinin azaltılması önem taşımaktadır. Yapılan araştırmalarda tümörlü bölgelerde, tümör taşımayan dokulara göre enzimin spesifik aktivitesi daha yüksektir (Sarawat vd. 2006).

AKR1B10, bir aldo-keto redüktaz ailesi enziminin serviks kanserinde ekspresyonu, ameliyat sonrası tümör nüksetmesi ve skuamöz hücre karsinomunu keratinizasyonu ile ilişkilendirilerek kanıtlanmıştır (Yoshitake vd. 2007). Yapılan bir diğer çalışmada Engelbreth-Hom-Swarm tümör hücrelerinden AR enzimi saflaştırılmıştır. Araştırma bulguları büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile hücre tipine göre değişerek büyüme ya da apoptozun indüklendiği göstermektedir. Reaktif oksijen türleri, NF-kB ve Aktivatör Protein 1 (AP1) transkripsiyonunu aktive eden, protein kinaz C (PKC), fosfolipaz C (PLC),

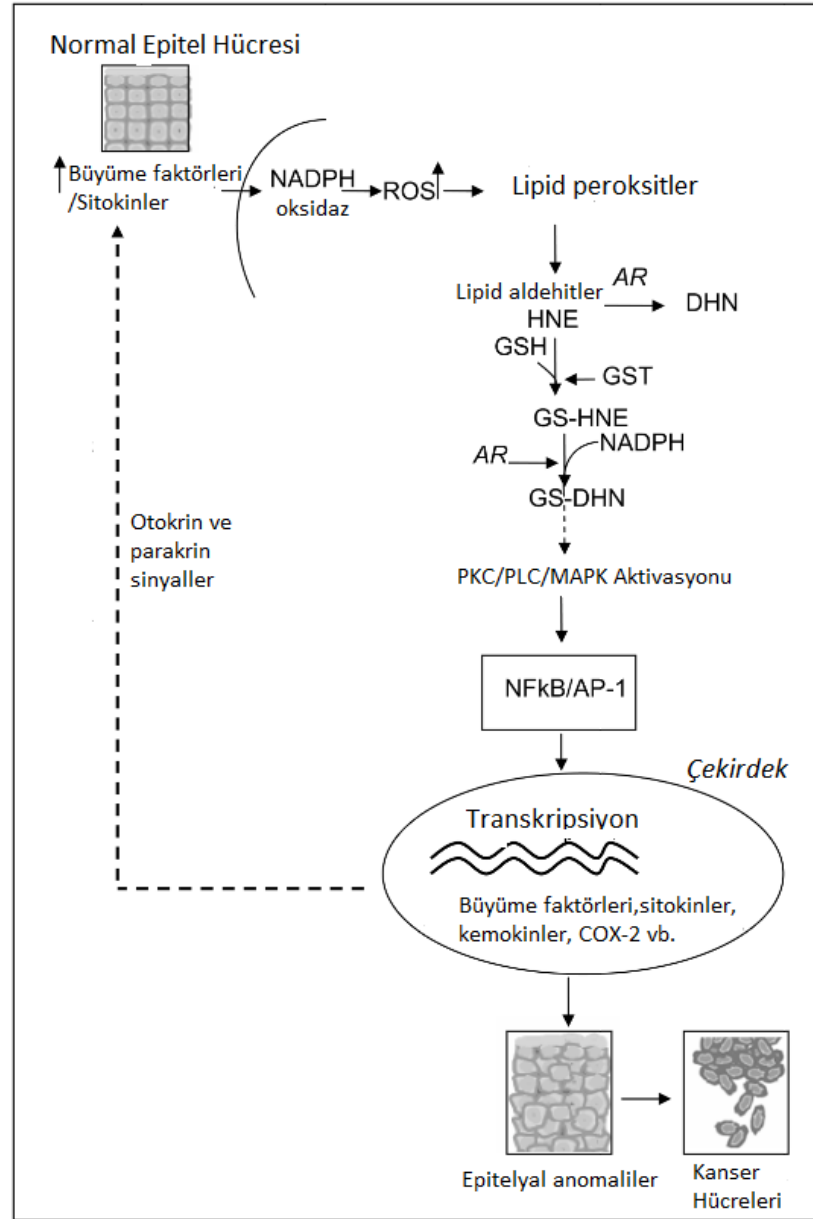
diacylglycerol (DAG), fosfoinositid-3-kinaz (PI3k) sinyal yollarını aktive ederek kanserli hücre çoğalmasına neden olur. (Srivastava vd. 2005, Ramana vd. 2006).

AR'ın oksidatif stres ile ilişkili kanserleşme sürecine arabuluculuk ettiği yolak (Şekil 2.12) detaylıca incelendiğinde büyüme faktörleri ve sitokinler NADPH oksidazlar aracılığı ile reaktif oksijen türlerinin oluşumunu başlatmakta ve membranın peroksidasyonuna neden olarak lipid aldehytlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. AR, bir toksik lipid aldehyt olan glutatyon bağlı 4-hidroksi-trans-2-nonenol (HNE)'un 1-4-dihidroksinonen(DHN)'e indirgenmesini katalizlemektedir. GS-DHN'de redoksa duyarlı transkripsiyon faktörleri olan NF-kB ve aktivatör protein 1'i protein kinaz kaskad reaksiyonları ile aktive etmektedir. Aktive olan transkripsiyon faktörleride çekirdek içerisine translokasyon gerçekleştirerek kontrolsüz hücre çoğalması, epitelyal anomaliler ve kanser sürecinin başlamasına sebep olmaktadır (Tammali vd. 2011). Tüm bu sebepler doğrultusunda AR'ın inhibisyonu, inflamatuvar marker olan prostaglandinler ve transkripsiyon faktörlerini aktive eden ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim aktivitesi artıran büyüme faktörleri, kemokinler ve lipid peroksidaz sinyallerinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir (Hayakawa vd. 2003, Srivastava vd. 2005, Ramana vd. 2006).

HeLa ve HepG2 hücreleri gibi bazı kanser hücrelerinde AR ve AR benzeri protein-1 (ARL-1)'in aşırı miktarda sentezlendiği bilinmektedir. ARL-1, AR ile benzer enzimatik aktivasyon göstermektedir. Bununla beraber, ovaryum, serviks, göğüs ve rektal tümörlerde aldoz redüktaz enziminin yüksek düzeyde ekspresyonu söz konusudur (Saraswat vd. 2006).

Kolon kanserinde görülen en önemli özelliklerden biri COX-2 enziminin aşırı ekspresyonudur. Bu enzim, araşidonik asitten kolon epitel hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olan prostaglandinlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Bu hücrelerde, COX-2'nin transkripsiyonel regülasyonu çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bununla beraber, büyüme faktörleri ve sitokinler AR enziminin de transkripsiyonunu aktive etmektedir (Tammali vd. 2006). TNF- α gibi sitokinler de kolon kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. AR inhibisyonu, TNF- α

uyarımli PKC ve NF- κ B'nin aktivasyonunu engellemektedir ve böylece COX-2 enzimi ifade edilememektedir (Tammali vd. 2006).



Şekil 2.11 Oksidatif stres ile ilişkili karsinogeneizde AR enziminin rolü (Tammali vd. 2011)

Aldoz redüktaz enzimi, osmotik denge, iyon taşınımı ve redoks dengesinin değişimine yol açarak birçok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Bu yüzden, AR inhibitörleri, çeşitli komplikasyonların başlamasının engellenmesi veya ilerlemesinin geciktirilmesi

için tedavi edici olarak oldukça geniş bir yelpazede araştırılmaktadır (El-Kabbani vd. 2004, Sun vd. 2004, Wang vd. 2009).

Son yıllarda aldoz redüktaz inhibitörleri ile ilgili bazı klinik araştırmalar, inhibitör tasarımı aşamasındaki yetersizliklerden ya da sentezlenen inhibitörün poliyol metabolik yolağına etki edememesi sebebiyle olumlu sonuçlar doğuramamaktadır (Obrosova vd. 2002). Bununla birlikte, insan klinik deneme aşamasına ulaşan Sorbinil ve Ponalrestat gibi inhibitörler, hem etkilerinin yetersizliği hem de yan etkilerinden dolayı piyasadan çekilmiştir. AR enzimi ile aynı süperaileden olan ve yapısal olarak birbirlerine benzeyen diğer aldehit redüktazların inhibe edilmesi sebebiyle çeşitli yan etkilerin oluştuğu düşünülmektedir. Bu sebeple, yalnızca aldoz redüktaz enzimine bağlanabilen inhibitörler geliştirilmeye çalışılmaktadır (El-Kabbani vd. 2004).

Aldoz redüktaz inhibitörlerinin biyokimyasal yapıları incelendiğinde büyük çoğunluğu asidik grup taşımaktadır. Asidik gruplar, kofaktörün nikotinamid kısmı ve enzimin aktif bölgesinde yer alan 48. Tirozin (Tyr), 110. Histidin (His) ve 111. Triptofan (Trp) amino asit kalıntıları ile hidrojen bağı oluşturarak enzimi inhibe etmektedir. AR inhibitörlerinin diğer bir ortak özelliği ise, yapılarında enzimin lipofilik bölgesi ile bağlanan bir veya birden fazla aromatik grubun bulunmasıdır. Çeşitli araştırmalar sonrasında karboksilik asit yapısı içeren benzimidazol, fenil ve pirol türevli asetik asit bileşikler ve tiyanosinolinon karboksilik asit türevleri aldoz redüktaz inhibitörleri olarak tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bilimsel araştırmaların çoğunda aralarında Arlestatin, Tolrestat, Epalrestat ve Zopolrestat bulunan belli başlı karboksilik asit bileşiklerinin aldoz redüktaz enzimine karşı inhibisyon etkileri çalışılmıştır ancak bugüne kadar bunlardan sadece Epalrestatın ilaç olarak kullanımı Japonya’da onay almıştır (Alexiou vd. 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmamızda kullandığımız kimyasallar ve diğer sarf malzemelerinden indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) (GERBU), mikropalakalar (BRAND ve Greiner Biione), sodyum-potasyum-tartarat (Carlo Erba), sodyum karbonat (Fisher Scientific), alüminyum klorür ($AlCl_3$) (Fluka), bakır sülfat ($CuSO_4$), etanol, gallik asit (GA), kuersetin , sodyum hidroksit (NaOH) ve sodyum klorür (NaCl) (Merck), dipotasyum hidrojen fosfat, dimetil sülfat (DMSO), lityum sülfat (Li_2SO_4) ve potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Riedel-de Haën), sığır serum albümini (BSA), DL-gliseraldehit (DL-GA), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve sodyum asetat (Sigma), amonyum sülfat, Folin Ciocalteu reaktifi (FCR) ve metanol (CH_4O) (Sigma-Aldrich) ve PMSF (Thermo Scientific) ilgili firmalardan çoğunluğu moleküler analiz kalitesinde temin edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız cihazlardan Kırık Buz Makinesi (AF 80 Agion Silver), Otomatik Pipetler (BIOHIT), Derin Dondurucu $-20^{\circ}C$ (BOSCH), Rotari Evaporatör (BUCHI), Vorteks (Heidolph), Derin Dondurucu $-80^{\circ}C$ ve Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj (Hettich), Hassas Terazi ve pH Metre (Mettler Toledo), Distile Su Cihazı ve Hassas Distile Su Cihazı (MILLIPORE), Homojenatör (Pro), Yüksek Devirli Masaüstü Soğutmalı Santrifüj (Sigma), dual spektral özellikte Mikroplaka Okuyucusu (SpectraMax M2), Spektrometre (T80 UV/VIS Spektrometer), Sıvı Azot Tankı (THERMO 5) ve Manyetik Karıştırıcı (WiseStir) ilgili firmalardan temin edilmiştir.

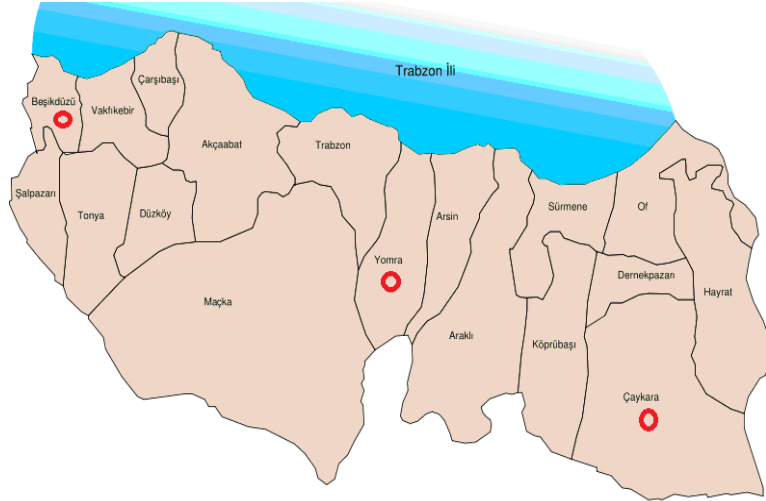
3.2 Yöntem

3.2.1 Mantar örneklerinin toplanması ve ekstraksiyon aşamasına hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan mantar örnekleri (*Scleroderma verrucosum*, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum*) 2009-2010 yılları arasında Trabzon bölgesinden Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olan Doç. Dr. Ilgaz Akata tarafından toplanmış ve tür teşhisleri yapılmıştır (Çizelge 3.1) Örnekler sırasıyla Akata 3224, Akata 3012 ve Akata & Yuzun 720 numaralarıyla herbaryumda saklanmaktadır.

Çizelge 3.1 Tez kapsamında kullanılan mantar örnekleri

Familya	Cins	Mantar Türü	Lokasyon	Tarih
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma</i>	<i>Scleroderma verrucosum</i>	Yomra-Trabzon	Eylül 2010
Bankeraceae	<i>Sarcodon</i>	<i>Sarcodon imbricatus</i>	Uzungöl Doğa Koruma Parkı-Trabzon	Ekim 2010
Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>	<i>Cantharellus cibarius</i>	Beşikdüzü-Trabzon	Ekim 2011



Şekil 3.1 Trabzon il haritası üzerinde mantar türlerinin toplandığı lokasyonların gösterilmesi (<http://www.uyduharita.org/trabzon-haritasi-resimleri/>)

3.2.2 Mantarların ekstraksiyonu

Kurutulmuş mantarlar parçalara ayrıldıktan sonra yaklaşık 5 gr olarak tartılmış ve havanda öğütülmüştür. Öğütüldükten sonra tekrar tartılarak toplamda mantarın 21 katı kadar metanol (105 mL) ilave edilmiştir. Toz halinde olan mantar örneklerinden özüt elde edilmesi için % 99'luk metanol çözgeni kullanılmıştır (Cowan 1999). Karışım 1 saat manyetik balıkla karıştırılmış ve + 4 °C'ye kaldırılarak 67 saat bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından oda sıcaklığına çıkarılarak santrifüj için falkonlara ayrılmış, 23 dk, 6000 rpm, + 4 °C' de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edildikten sonra supernatan kısımlar boş bir balona alınmıştır. Ardından metanol ve suyun 40°C'de uygun basınçta (337 mbar) rotary evaporatör yardımıyla uçurulması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konsantre özüt 5 ml DMSO'da çözülürerek, çözünen mantar özütleri alikotlar halinde +4 °C'de saklanmıştır.

Cantharellus cibarius mantarı ile yapılan ekstraksiyon işlemlerinin ardından balonda, çözünmeden kalan kristalli maddeler gözlemlenmiştir. Bu maddeler etanol (17 mL) ve distile su (21 mL) yardımıyla çözülürmüş ve sonuçta *Cantharellus cibarius* mantarından 1. yağlı fraksiyon ve 2. yağlı fraksiyon olmak üzere iki farklı özüt fraksiyonu elde edilmiştir.

3.2.3 Mantar özütlerinin polifenol miktarı tayini

Çalışmamızda polifenol miktarı tayini için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır (Singleton ve Rossi 1965). Bu metotta fenolik madde standardı olarak galik asit kullanılmıştır. Stok galik asit çözeltisinden 50, 100, 200 ve 400 mg/L'lik örnekler DMSO ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Organik boya olarak kullandığımız Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir.

Kör tüpüne 0.1 mL DMSO, standart tüplerine 0.1'er mL 50, 100, 200 ve 400 mg/L galik asit çözeltisi ve örnek tüplerine de 0.1'er mL mantar özütü eklenmiştir. Sonra, bütün tüplere 1'er mL Folin-Ciocalteu reaktifi karıştırılarak eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, bütün tüplere 1'er mL %2'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi karıştırılarak eklenmiştir ve 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilip kör tüpe karşı 750 nm'de okunmuştur. Standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak polifenol miktarı hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Mantar özütlerinin toplam polifenol tayini çalışma şeması

Kör	Standartlar				Örnek
0.1 mL DMSO	0.1 mL 50 mg/L GA	0.1 mL 100 mg/L GA	0.1 mL 200 mg/L GA	0.1 mL 400 mg/L GA	0.1 mL Mantar Özütü
1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi	1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi	1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi	1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi	1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi	1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi
5 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyon					
1 mL %2'lik Na_2CO_3	1 mL %2'lik Na_2CO_3	1 mL %2'lik Na_2CO_3	1 mL %2'lik Na_2CO_3	1 mL %2'lik Na_2CO_3	1 mL %2'lik Na_2CO_3
1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyon ve kör tüpe karşı 750 nm'de spektrofotometrik okutma					

3.2.4 Mantar özütlerinin flavonoid miktarı tayini

Mantar özütlerinin toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir. Bu metotta flavonoid madde standardı olarak kuersetin kullanılmıştır. Stok kuersetin çözeltisinden 25, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL’lik çözeltiler % 80’lik etanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Renk oluşumu için %10’luk alüminyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

Kör tüpüne 0.166 mL %95’lik etanol, standart tüplerine 0.166’şar mL 25, 50, 100 150, 200 µg/mL kuersetin çözeltisi ve örnek tüplerine de 0.166 mL mantar özütü eklenmiştir. Ardından bütün tüplere 0.5’er mL %95’lik etanol, 0.034’er mL %10’luk Alüminyum Klorür ve daha sonra 0.034’er mL sodyum asetat ve son olarak da 0.966’şar mL DMSO karıştırılarak eklenmiştir ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda bütün tüpler kör tüpe karşı 415 nm’de okunmuştur. Standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak flavonoid miktarı hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3 Mantar özütlerinin toplam flavonoid tayini çalışma şeması

Kör	Standartlar					Örnek
0.166 mL %95’lik etanol	0.166 mL 25 µg/mL kuersetin	0.166 mL 50 µg/mL kuersetin	0.166 mL 100 µg/mL kuersetin	0.166 mL 150 µg/mL kuersetin	0.166 mL 200 µg/mL kuersetin	0.5 mL Mantar Özütü
0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol	0.5 mL %95’lik etanol
0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür	0.034 mL %10’luk Alüminyum Klorür
0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat	0.034 mL sodyum asetat
0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO	0.966 mL DMSO
30 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletme ve köre karşı 415 nm’de spektrofotometrik okutma						

3.2.5 AR enziminin izolasyonu:

Deneylerde kullanılan AR enzimi normal şartlarda yetiştirilen sığırların karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Kesilen sığırdan alınan karaciğer dokusu, bekletmeden sıvı azot içerisine konulup laboratuvara taşınmıştır ve -80°C 'de saklanmıştır.

İzolasyon işlemi daha önce optimize edilmiş (İşgör 1997, Onay 2008) metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu metodda özetle -80°C 'de saklanmış karaciğer dokusu makas yardımıyla küçük parçalara kesilip 1 mM EDTA ile yıkanmıştır. Daha sonra karaciğer dokusunun tartısı alınıp üç katı 1 mM EDTA 50 μM PMSF ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. % 40 doygunluk için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 22.6 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. % 40 doygunluktaki süpernatantı % 50 doygunluğa ulaştırmak için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 5.8 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. % 50 doygunluktaki süpernatantı % 75 doygunluğa ulaştırmak için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 15.9 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellet 50 mM sodyum klorür ile çözünüp -80°C 'de saklanmıştır.

3.2.6 Protein miktarı tayini

Çalışmamızda protein miktarı tayini için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry vd. 1951). Alkali koşullarda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgenmektedir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde bulunan Tyr, Trp ve Cys amino asitleri Folin-Ciocalteu reaktifinde yer alan fenol yapısını indirgeyerek mavi renk oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Bu metotta protein madde standardı olarak BSA kullanılmıştır. Stok BSA çözeltisinden 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL'lik çözelti distile deiyonize su (DDS) ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Lowry reaktifi için % 1'lik bakır sülfat pentahidrat, % 2'lik $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -Tartarat ve % 2'lik sodyum karbonatlı 0.1 N sodyum hidroksit sırayla 1/1/100 oranında karıştırılmıştır. Organik boya olarak da 1/1 oranında DDS ile seyreltilen FCR kullanılmıştır.

Kör tüpüne 0.5 mL distile su, standart tüplerine sırayla 0.5 mL 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL BSA çözeltisi ve örnek tüpüne de DDS ile seyreltilen 0.5 mL sitozol eklenmiştir. Sonra tüplerin her birine 2.5 mL Lowry reaktifi karıştırılarak eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda tüplerin her birine 0.25 mL FCR karıştırılarak eklenmiş ve 45 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda bütün tüpler köre karşı 660 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak protein miktarı mg/mL olarak hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.4'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4 AR enziminin protein tayini çalışma şeması

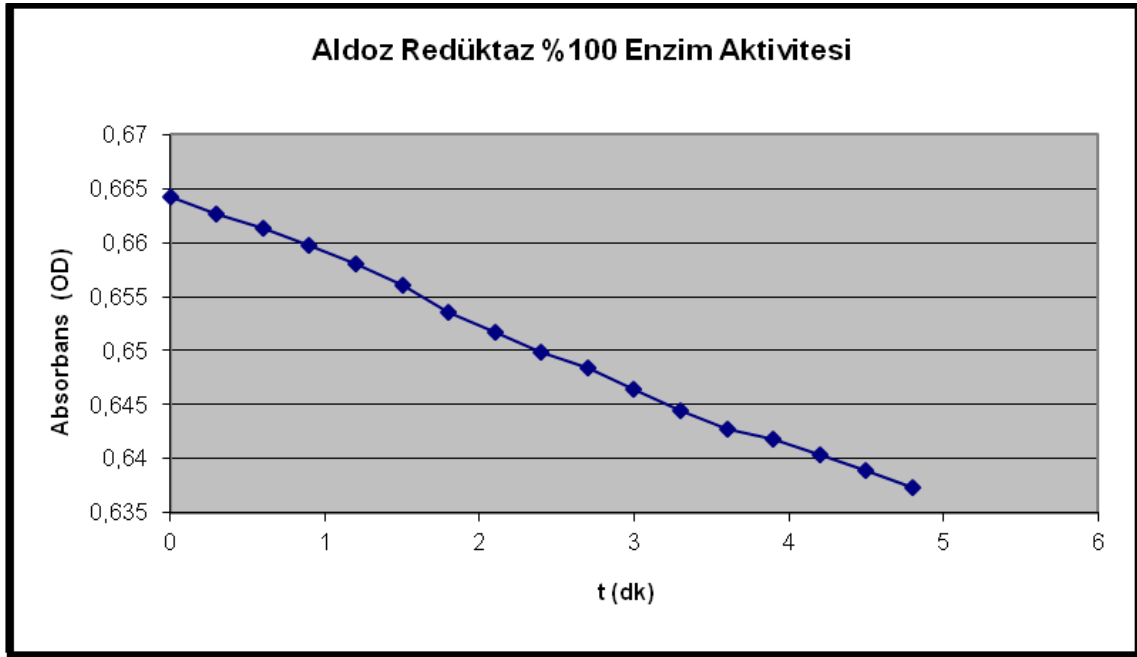
Kör	Standartlar				Örnek
0.5 mL H ₂ O	0.5 mL 0.5 mg/mL BSA	0.5 mL 0.1 mg/mL BSA	0.5 mL 0.15 mg/mL BSA	0.5 mL 0.2 mg/mL BSA	0.5 mL AR
2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi
10 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek					
0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi	0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi	0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi	0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi	0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi	0.25 mL Folin- Ciocalteu Reaktifi
45 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek ve köre karşı 660 nm’de spektrofotometrik okutma					

3.2.7 AR enzim aktivite tayini

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enziminin aktivitesi daha önce yayınlanmış olan (Hayman ve Kinoshita 1965) spektrofotometrik metodun bazı modifikasyonlarla geliştirilmesi sonucu oluşturulan analiz metodu ile tayin edilmiştir (İşgör 1997). Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan DL-Gliseraldehit, AR enzimi tarafından gliserole indirgenmektedir. Aynı zamanda, AR enziminin kofaktörü olan NADPH da NADP⁺ ‘ya okside edilmektedir. NADPH’ın oksidasyonu SpectraMax M2 mikropilaka okuyucusu kullanılarak 340 nm dalga boyunda takip edilmiştir.

Reaksiyon ortamı 20 µL Aldoz redüktaz enzimi (4,54 mg/mL) ve 40 µL Li₂SO₄ (320 mM-400mM), 15 µL NADPH (9×10⁻⁵ M) , 5 µL DMSO ve 140 µL KP tamponunun (50 mM, pH 6.2) eklenmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 5 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra 340 nm’de kör olarak okuma yapılmış, üzerine 30 µL DL-GA (6×10⁻⁴ M) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 250 µL olup

reaksiyon karışımındaki absorbans azalması 5 dakika süresince takip edilmiştir. ΔOD 'lerden ve NADPH'in ekstinksiyon katsayısından yararlanarak Aldoz redüktaz enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi birim zaman başına dönüştürülen substrat μmol sayısına eşittir ve her bir dakikada oksitlenen NADPH miktarına göre ifade edilmiştir.



Şekil 3.2 Aldoz Redüktaz % 100 Enzim Aktivitesi Grafiği

Sarcodon imbricatus, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum* mantar örneklerinden elde edilen konsantre özütlerin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelenmek amacıyla aynı metot kullanılmıştır. Bu özütlerin en yüksek dozu $100 \mu\text{g/mL}$ ve en düşük doz $6.25 \mu\text{g/mL}$ olmak üzere stok solüsyonları $\frac{1}{2}$ oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Deney daha önce optimizasyonu yapılmış protokolün (Nadig vd. 2012) mikropalakaya adaptasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Analiz $20 \mu\text{L}$ sitozol (4.54 mg/mL , 0.496 mg/min/mL), $40 \mu\text{L}$ lityum sülfat ($320\text{-}400 \text{ mM}$), $15 \mu\text{L}$ NADPH ($9 \times 10^{-5} \text{ M}$), $30 \mu\text{L}$ DL-GA ($6 \times 10^{-4} \text{ M}$) ve $140 \mu\text{L}$ potasyum fosfat tamponuna (50 Mm , $\text{pH } 6.2$) son konsantrasyonları optimizasyonla belirlenmiş $5 \mu\text{L}$ DMSO veya mantar özütlerinin eklenmesiyle $250 \mu\text{L}$ hacimdeki reaksiyon, NADPH

tüketiminin 340 nm’de dakikadaki absorbans değişiminin (OD/dk) gözlenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

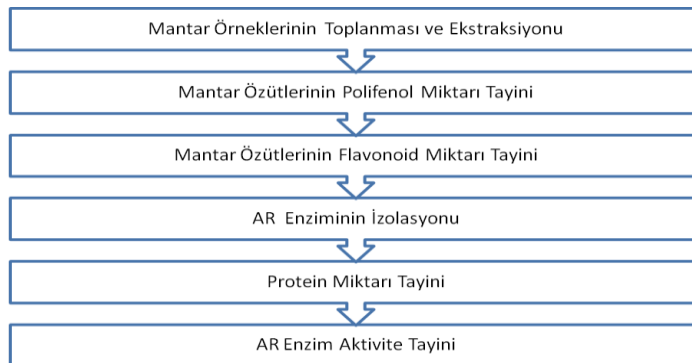
Numune okumaları 5 µL ½ oranında seri olarak seyreltilen mantar özütleri eklenerek gerçekleştirilmiştir. Kör okumaları negatif kontrol olarak kabul edilmiştir. ΔOD/dk verilerinden yararlanarak ve aşağıdaki formülü kullanarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Guzman ve Guerrero 2005). NADPH’in ekstinksiyon katsayısı 0.00622 µM⁻¹ cm⁻¹ ‘dir. ΔOD kontrol, deney ortamında AR yok iken diğer tüm deney bileşenleriyle reaksiyon ortamında herhangi bir interferans olup olmadığının belirlenmesi ve arka planın gözlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{(\Delta\text{OD}_{\text{örnek}} - \Delta\text{OD}_{\text{kontrol}}) / \text{dk} \times \text{sitozol}(\mu\text{L})}{\epsilon_{\text{NADPH}} \times \text{deney hacmi}(\mu\text{L})}$$

$$\% \text{ Maksimum Aktivite Artışı} = \frac{\text{Örnek Enzim Aktivitesi} \times 100}{\% 100 \text{ Enzim Aktivitesi}} - 100$$

Tüm mantarlar için elde edilen her bir doza bağlı % maksimum aktivite, % 100 enzim aktivitesine oranlanarak belirlenmiştir. Kullanılan dozlara göre enzim aktivitesindeki yüzdece artışın hesaplanması için sonuçlardan 100 çıkarılmıştır.

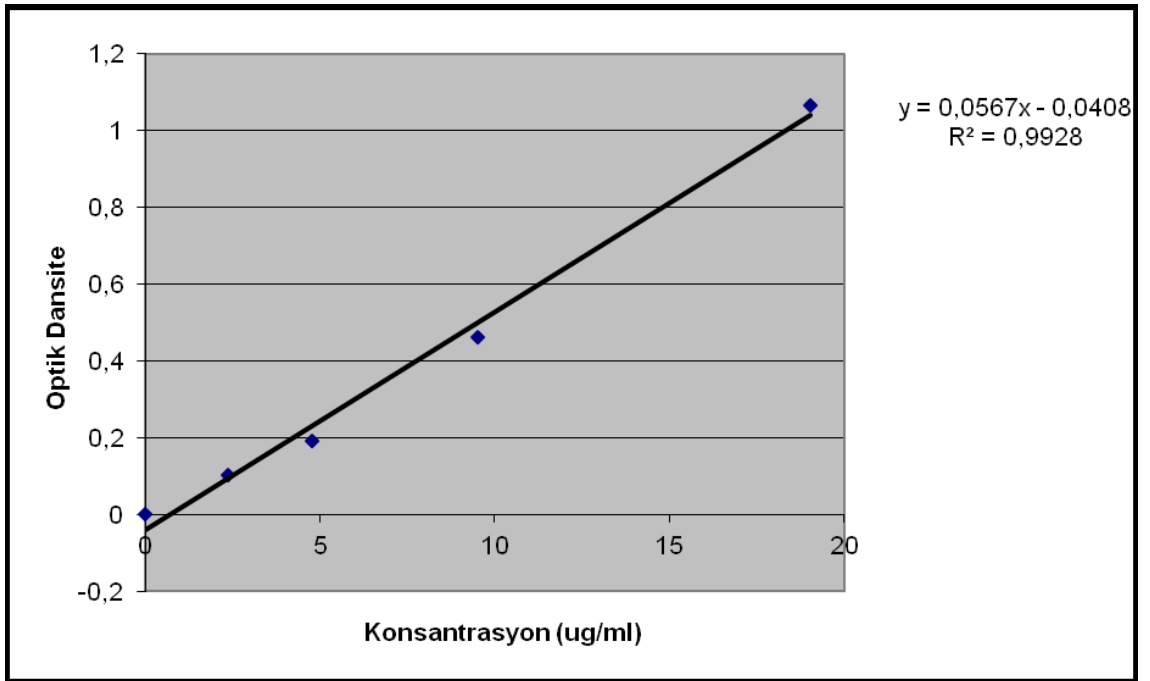
Özütlerin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkilerine dair grafikler, Microsoft Excel kullanılarak çizilmiştir. Tez çalışmamız boyunca tüm deney verilerimiz duplike okuma sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 3.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Metotlar

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

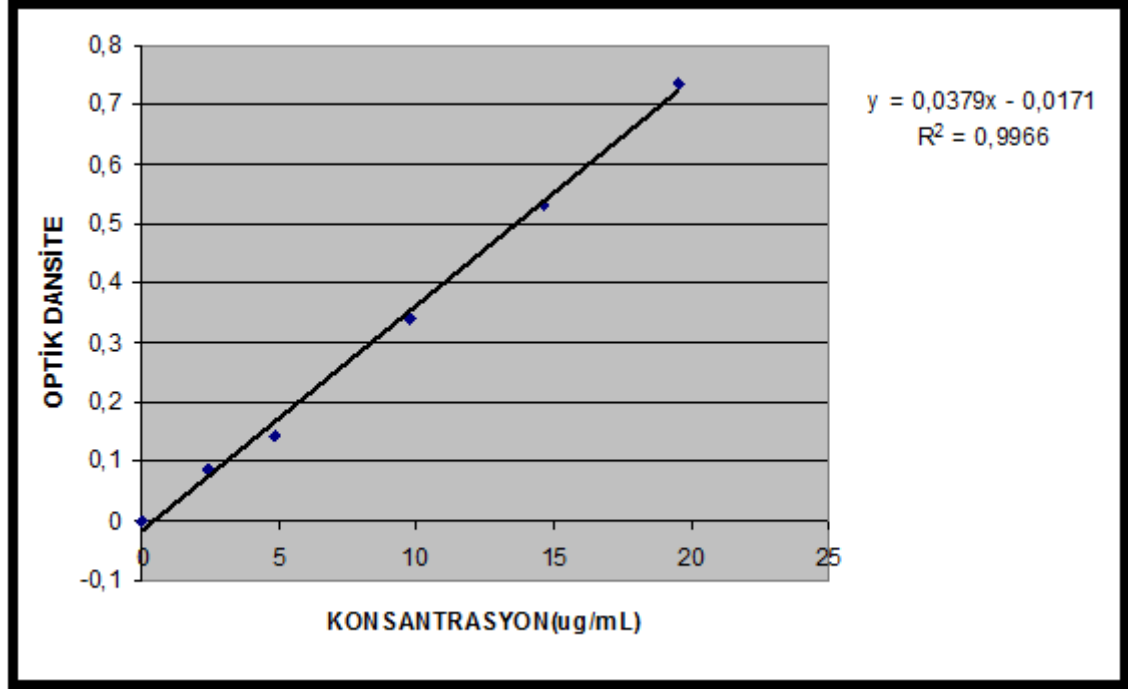
Çalışmamızda polifenol miktarı tayini için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır (Slinkard ve Singleton 1977). Bu metotta fenolik madde standardı olarak GA kullanılmıştır. Stok GA çözeltisinden 50, 100, 200 ve 400 mg/L'lik çözeltiler DMSO ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Organik boya olarak da 1/10 oranında distile su ile seyreltilen FCR kullanılmıştır. Standartların 750 nm'de spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak bitki özütlerinin polifenol miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 Folin-Ciocalteu gallik asit standart grafiği

Mantar özütlerinin toplam flavonoid miktarı ise, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir (Chang vd. 2002). Bu metotta flavonoid madde standardı olarak kuersetin kullanılmıştır. Stok kuersetin çözeltisinden 25, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL'lik çözeltiler %80'lik etanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Renk oluşumu için %10'luk alüminyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Standartların 415 nm'de spektrofotometrik

ölçümlerinden yararlanarak mantar özütlerinin flavonoid miktarı $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2 Kuersetin standart grafiği

Çizelge 4.1 Mantar özütlerinin toplam polifenol ve toplam flavonoid miktarları.

MANTAR	Toplam Polifenol Miktarı (GAE)	Toplam Flavonoid Miktarı
<i>Sarcodon imbricatus</i>	51.55 $\mu\text{g/mL}$	6.654 $\mu\text{g/mL}$
<i>Cantharellus cibarius</i> 1.yağlı fraksiyonu	8.43 $\mu\text{g/mL}$	1.59 $\mu\text{g/mL}$
<i>Cantharellus cibarius</i> 2.yağlı fraksiyonu	31.53 $\mu\text{g/mL}$	45.81 $\mu\text{g/mL}$
<i>Scleroderma verrucosum</i>	95.82 $\mu\text{g/mL}$	13.68 $\mu\text{g/mL}$

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enziminin protein miktarını ölçmek için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry vd. 1951). Bu metoda göre stok BSA çözeltisinden hazırlanan 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL olan standartların 660 nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışmanın ardından DDS ile seyreltilen 0.5 mL sitozol 2.5 mL Lowry reaktifi ve 0.25 mL FCR eklenerek 660 nm’de köre karşı okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak AR enziminin protein miktarı 56.7482 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

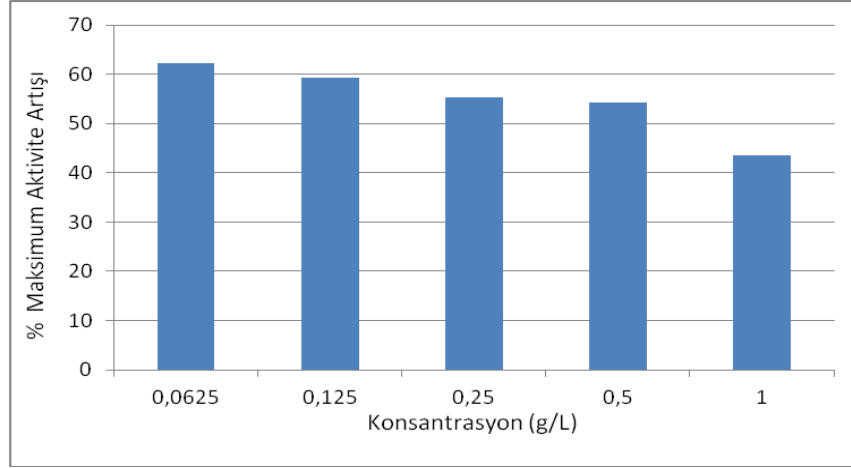
Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enzim aktivitesi 340 nm’de NADPH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür. Mantar özütleri olmadan, yani sadece AR enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4.54 mg/mL enzim için ölçülen 0.057 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır.

AR enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra; *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum* mantar özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. Doza bağlı enzim aktiviteleri (çizelge 4.2), % 100 enzim aktivitesine oranlanarak % maksimum aktivite artışı hesaplanmıştır. Çizilen grafikler, özüt konsantrasyonlarının % maksimum aktivite artış değerlerine karşı oluşturulan doz-cevap grafikleri olarak şekil 4.3 - 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Kullanılan dozlar ve doza bağlı enzim aktiviteleri

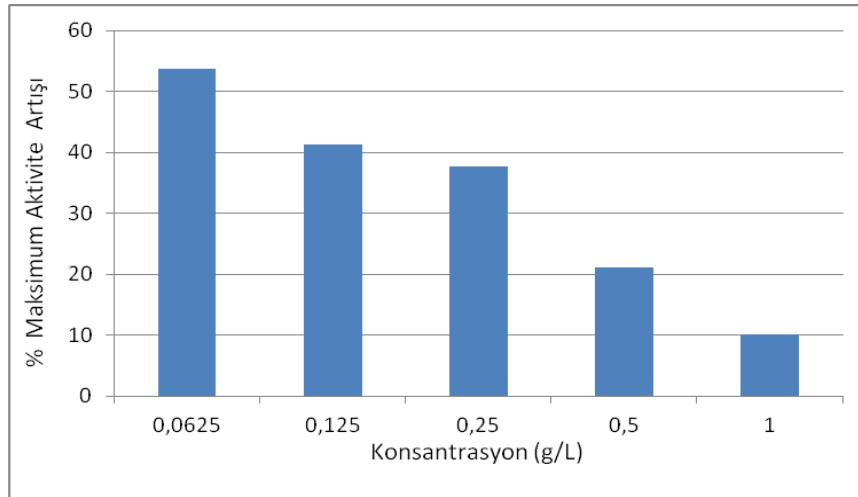
	Doza Bağlı Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$)				%100 Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$)
Kullanılan Dozlar (g/L)	<i>Sarcodon imbricatus</i>	<i>Cantharellus cibarius</i> 1.yağlı fraksiyon	<i>Cantharellus cibarius</i> 2.yağlı fraksiyon	<i>Scleroderma verrucosum</i>	0.057
0.0625	0.0925	0.0875	0.0830	0.0627	
0.125	0.0908	0.0805	0.0894	0.0750	
0.25	0.0885	0.0785	0.0905	0.0716	
0.5	0.0880	0.0690	0.0920	0.0714	
1.0	0.0818	0.0627	0.0920	0.0730	

Sarcodon imbricatus mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi (Şekil 4.3) incelendiğinde en düşük dozdan en yüksek doza doğru sırasıyla % 62.25, % 59.25, % 55.21, % 54.35 ve % 43.55' lik % maksimum aktivite artışı gözlenmiştir.



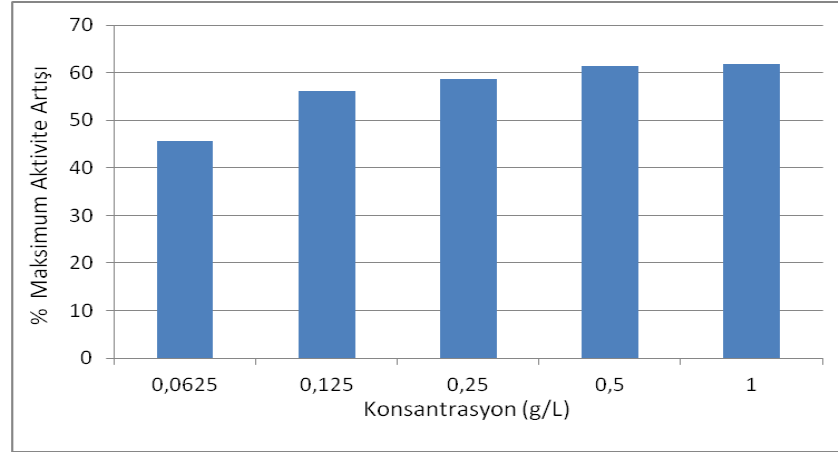
Şekil 4.3 *Sarcodon imbricatus* mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Cantharellus cibarius mantar özütünün (1.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi (Şekil 4.4) incelendiğinde en düşük dozdan en yüksek doza doğru sırasıyla % 53.8, % 41.2, % 37.67, % 21.04 ve % 10.08'lik % maksimum aktivite artışı gözlenmiştir.



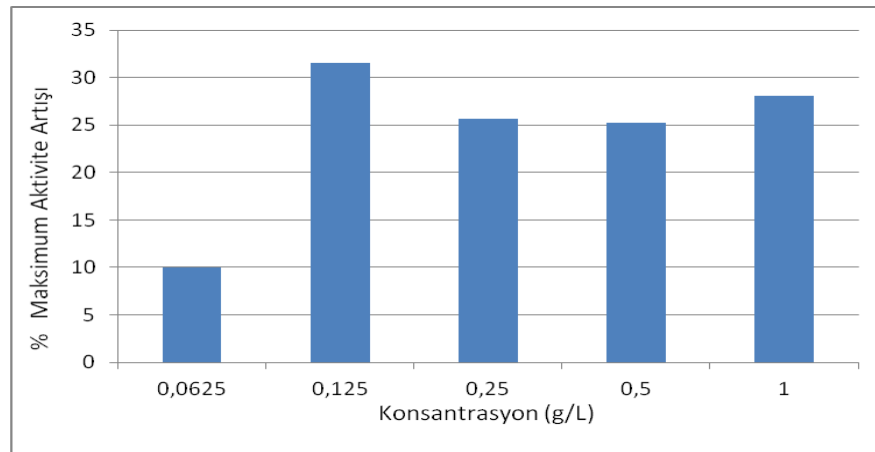
Şekil 4.4 *Cantharellus cibarius* mantar özütünün (1.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Cantharellus cibarius mantar özütünün (2.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi (şekil 4.5) incelendiğinde en düşük dozdan en yüksek doza doğru sırasıyla % 45.55, % 56.1, % 58.75, % 61.39 ve % 61.85’lik % maksimum aktivite artışı gözlenmiştir.

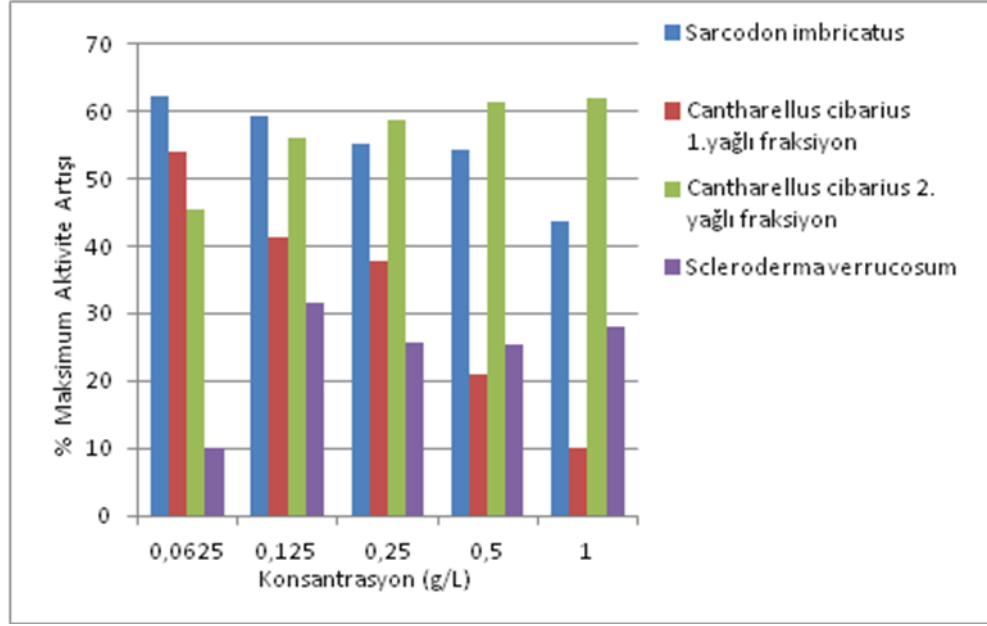


Şekil 4.5 *Cantharellus cibarius* mantar özütünün (2.yağlı fraksiyon) AR enzim aktivitesi üzerine etkisi

Scleroderma verrucosum mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi (Şekil 4.6) incelendiğinde en düşük dozdan en yüksek doza doğru sırasıyla % 9.95, % 31.56, % 25.698, % 25.26 ve % 28.07’lik % maksimum aktivite artışı gözlenmiştir.



Şekil 4.6 *Scleroderma verrucosum* mantar özütünün AR enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.7 Tüm mantar özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine etkileri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde aldoz redüktaz enziminin inhibisyonuna dair oluşan ilgi, enzimin nefropati, nöropati ve retinopati gibi uzun süreli diyabetik komplikasyonlara neden olması ve polyol yolağının ilk aşamasında üretilen sorbitolün dokularda birikmesi ile çeşitli kanser mekanizmalarına katılması sebebiyle oldukça artmıştır. Öte yandan son yıllarda tedavi süreçlerinde geleneksel olarak kullanılan tedavilerle birlikte destekleyici terapilere ve dolayısıyla doğal besinsel kaynaklara olan gereksinim çoğalmıştır. Mantarlar da bu doğal kaynaklardan birisi olup kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser tipleri, diyabet gibi birçok komplikasyonda yapılarında bulunan özellikle polifenol ve flavonoidler gibi fenolik içerikli bileşikler sayesinde gösterdikleri anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör ve nöroprotektif etkileriyle tedavi edici durumdadır.

Diyabetik rahatsızlıklar ve kanserlerin oluşumunu engellemek hedefinde olan çalışmalara bir katkı olarak planladığımız tez çalışmamızda polifenol ve özellikle flavonoid bileşikleri içeren (çizelge 4.1) *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum* mantar özütlerinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Polisakkaritler, makrofungusların hücre duvarında çokça rastlanılan polimerlerdir. Bu polisakkaritler β -Glukanlar, hetero- β -Glukanlar, glikanlar ve heteroglikanlar dahil çeşitli kimyasal kompozisyonlara sahiptir. Glukanlar yalnızca D-glukoz subunitlerinden oluşurken, heteroglukanlar monosakkaritlerin yan zincirleri ve glukoz, galaktoz, mannoz ile çeşitli kombinasyonlarını içermektedir (Gao vd. 1996, Mizuno vd 1992, 1995a, b)

Sarcodon imbricatus ile yapılan bir çalışma sonucunda F₀I, F₀II, F₀III olarak isimlendirilen ve ether ve sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen üç farklı polisakkarit fraksiyonu izole edilmiştir. HPLC analizleri ile F₀I fraksiyonunun galaktoz ve fukozdan, F₀II fraksiyonunun glukoz ve fukozdan, F₀III fraksiyonun ise sadece glukozdan meydana geldiği gösterilmiştir (Sulowska-Ziaja vd. 2012).

Cantharellus cibarius ile yapılan bir araştırmada, etanol, eter ve su ekstraksiyonu ve ardından HPLC analizleri ile 13,44 g/100g karbondhidrat içeriği elde edilmiştir. İçeriğin şeker kompozisyonu incelendiğinde mannitol ve trehaloz bileşiklerine rastlanmıştır. (Barros vd. 2008)

Bu veriler doğrultusunda elde ettiğimiz mantar tlerinde var olabilecek karbondhidrat içeriği nedeniyle, enzim aktivitesi deneylerimizde aldoz redüktazın aktive olduğu sonucuna varılmaktadır. Çünkü Aldoz redüktaz enzimi bir monosakkarit olan gliseraldehiti substrat olarak kullanmaktadır ve dolayısıyla mantar tleri içerisinde var olan karbondhidrat bileşikleri enzimin substratı olarak davranmakta ve enzim aktivitesini artırmaktadır.

Aldoz redüktaz enzimi, osmotik dengenin, iyon taşınımının ve redoks dengesinin değişimine yol açarak bir çok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Bu yüzden, AR enziminin aktive olması çeşitli diyabetik komplikasyonların başlaması, oksidatif stres ile ilişkili karsinogenez sürecine arabulucuk etmesi ve çeşitli kanser tiplerinin ilerlemesi noktalarında kritiktir. Dolayısıyla diyabetik rahatsızlıklar ve kanserlerin oluşumunu engellemek hedefinde olan çalışmalara bir katkı olarak planladığımız tez çalışmamızda polifenol ve flavonoid bileşikleri içeren (izelge 4.1) *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius* ve *Scleroderma verrucosum* mantar tlerinin aldoz redüktaz enzim aktivitesini artırması tlerin potansiyel inhibitör ajan olarak kullanılamayacağını işaret etmektedir.

İleriki çalışmalarda doz cevap eğrileri çalışılırken doza bağlı enzim aktivitesinin değişimini daha geniş bir vizyonda gözlemlemek amacıyla tlerle hazırlanan doz konsantrasyonlarından 0.0625 g/L ve daha aşağısı ile 1 g/L ve daha yukarısı kullanılabilir.

Çeşitli mantar tleri ile n bilgi elde etmek amacıyla yaptığımız bu çalışmamızda hangi tn içerisinde hangi polifenol ve flavonoid bileşiğin bulunduğu bilinmemektedir. Bu sebeple öncelikle hangi tn etkili olduğunu ispatlamak ve daha sonra tn kimyasal içeriğinin belirlenmesi amaçlı analiz yapılabilir.

Tez çalışmasında kullanılan mantarlardan *Sarcodon imbricatus* ve *Cantharellus cibarius* yenilebilir türlerdir. Diyabetik rahatsızlıklar ve kanser ile ilişkileri açısından değerlendirildiğinde bu mantarlara ait ekstraların Aldoz redüktaz enzim aktivitesini artırması ve enzim aktivite artışının hastalık mekanizmalarında etkin rol oynaması sebebiyle besinsel olarak tüketilmeleri önerilmeyebilir.

Mantarlarla yapılan bilimsel çalışmalarda izolasyon, saflaştırma ve biyokimyasal yapı analizleri oldukça kritiktir. Günümüze kadar yapılan deneylerle çok sayıda bileşik incelenmiştir. Fakat ilerleyen zamanlarda daha fazla araştırma yapılarak, çoklu bileşik tespitleri ya da kombine biyoaktif bileşen çalışmaları ile terapötik ajanların eksik kaldığı noktaların doldurulması ya da onlara eşdeğer ve tedavi süreçlerinde destekleyici olarak kullanılabildiğinde yan etkisi daha az immünomodülatör terapötik ajanların geliştirilmesi amaçlanmalıdır.

Yakın gelecekte tamamlayıcı tedaviler ve yeni ürün geliştirilmesi ve gıda takviyesi olarak kullanılabilmeleri açısından, mantar ürünlerine olan ilgi daha da artacaktır. Dolayısıyla bu ilgi, mantarlarla yapılan araştırmalarda biyolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yol açıp, kanser terapileri ve diyabetik rahatsızlıklar için geliştirilecek yeni ürünlere ticari açıdan da geniş bir vizyon kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

- Akata, I. 2004. Ankara-Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı Makrofungus Florası.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 239 s., Ankara.
- Akata, I., Kaya A. ve Uzun Y. 2014. Macromycetes determined in Yomra (Trabzon) district. *Turkish Journal of Botany*, 38: 999-1012.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, I. N. and Demopoulos, V. J. 2009. Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of 21st century. *Current Medicinal Chemistry*, 16(6); 734-752.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata., B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I. ve Ozyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, , 12, 1496-1547.
- Balasubramanyam, M., Rema, M. and Premanand, C. 2002. Biochemical and molecular mechanisms of diabetic retinopath. *Current Science*, 83 (12); 1506-1514.
- Barja, G. 2004. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.*, 27, 595-600. Cadenas, E., Sies, H. 1998. The lag phase. *Free Radic. Res.*, 28, 601-609.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P. and Santos-Buelga, C. 2008. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1076–1079.
- Bohren, K. M., Brownlee, J. M., Milne, C. A., Gabbaya, K. H., and Harrison, D. H. T. 2005. The structure of Apo R268A human aldose reductase: Hinges and latches that control the kinetic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 201-212.
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. 1986. *Fungi of Switzerland*. Vol: 2, Nongilled Fungi, Verlag Mykologia CH-6000 Luzern 9, 412 p., Switzerland.
- Chan, N. N., Vallance, P. and Colhoun, H. M. 2000. Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia*, 43; 137-147.
- Chandra, D., Jackson, E. B., Ramana, K. V. Kelley, R., Srivastava, S. K. and Bhatnagar, A. 2002. Nitric oxide prevents aldose reductase activation and sorbitol accumulation during diabetes. *Diabetes*, 51; 3095–3101.
- Chang, R. 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr. Rev.*, 54, S91-93.
- Dunlop, M. 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58 (77); 3-12.

- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, J.M. and Quirocho, F.A. 1998. Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Molecular Vision*, 4; 19.
- Erkel G., Anke T., Sterner O. 1996. Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. *Biochem Biophys Res Commun* 226:214–221.
- Erkel G., Anke T. 2008. Products from Basidiomycetes chapter 11. *Biotechnology Set*, 2nd edn. Wiley, New York, pp 490–526.
- Fatmawati S., Shimizu K., Kondo R., 2010. Ganoderic acid Df, a new triterpenoid with aldose reductase inhibitory activity from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* *Fitoterapia* Volume 81, Issue 8, December Pages 1033–1036.
- Ferreira, I., Barros, L., Abreu, R. 2009. CIMO-ESAB, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 1172, 5301-855.
- Fowler, M. J. 2008. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2); 77-82.
- Gao, QP., Seljelid, R., Chen, HQ., Jiang, R. 1996 Characterization of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk. with cytokine stimulating activity, *Carbohydr Res.*, 288:135–142)
- Gugliucci, A. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *Journal of the American Osteopathic Association (JAOA)*., 100 (10); 621-634.
- Guzman, A. and Guerrero, R.O. 2005. Inhibition of aldose reductase by herbs extracts and natural substances and their role in prevention of cataracts. *Rev Cubana Plant Med.*, 10(3-4).
- Hall, C. 2001. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In *Antioxidants in food: practical applications*. Pokorný, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge England pp 159-209.
- Hayman S. and Kinoshita JH., .1965. Isolation and Properties of Lens Aldose Reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 240, No. 2.
- Hodgkinson, A. D., Bartlett, T., Oates, P. J., Millward, B. A. and Demaine, A. G. 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*., 52; 846–851.
- Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.*, 113, 287-299.

- İşgör, BS. 1997. Characterization and Inhibition Study of Bovine Lens Aldose Reductase. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Petrash, J.M., Akileshwari C., Muthenna P., Nastasijevic B., Joksic, G. and Reddy GB. 2012. Inhibition of Aldose Reductase by *Gentiana lutea* Extracts. Experimental Diabetes Research, Vol. 2012, Article ID 147965, 8 pages, doi:10.1155/2012/147965.
- Jez, M.J., Bennett, M.J., Schlegel, BP., Lewis, M. and Penning, T.M. 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase süperfamily. Biochemical Journal, 326; 625-636.
- Johanneson, H., Ryman, S., Lundmark H. and Danell, E. 1999. (abstract) "Sarcodon imbricatus and S. squamosus – two confused species". Mycological Research 103 (11): 1447–52.
- Kang, E. S., Kim, H. J., Paek, K. S., Jang, H. S., Chang, K. C., Lee, J. H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. and Seo, H. G. 2005. Phorbol ester up-regulates aldose reductase expression in A549 cells: A potential role for aldose reductase in cell cycle modulation. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 62; 1146-1155.
- Kikkawa, R., Koya, D. and Haneda, M. 2003. Progression of diabetic nephropathy. American Journal of Kidney Diseases, 41 (3); 19-21.
- Kim, Y. S., Kim, N. H., Jung, D. H., Jang, D. S., Lee, Y. M., Jong, M. K. and Kim, J. S. 2008. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucoseinduced TGF- α 2 expression in human lens epithelial cells. European Journal of Pharmacology, 594; 18–25.
- Kubo, E., Miyoshi, N., Fukuda, M. and Akagi, Y. 1999. Cataract formation through the polyol pathway is associated with free radical production. Experimental Eye Research, 68; 457-464.
- Kumar, P.A. and Reddy, GB. 2007. Focus on molecules: Aldose reductase. Experimental Eye Research, 739-740.
- Larkins, R. G. and Dunlop, M. E. 1992. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. Diabetologia, 35; 499-504.
- Le Marchand, L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. Biomed. Pharmacother., 56, 296-301.
- Lee, YL., Jian, SY., Lian, PY., Mau, JL. 2008. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. J. Food Comp. Anal., 21, 116-124.

- Lee HS., 2005. Cuminaldehyde: Aldose Reductase and α -Glucosidase Inhibitor
Derived from *Cuminum cyminum* L. Seeds J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (7),
pp 2446–2450 DOI: 10.1021/jf048451g Publication Date (Web): February 23,
Copyright © 2005 American Chemical Society
- Lee YS, Kang YH, Jung JY, Kang IJ, Han SN, Chung JS, Shin HK, Lim SS. 2008 .
Inhibitory constituents of aldose reductase in the fruiting body of *Phellinus*
linteus. Biol Pharm Bull. 2008 Apr;31(4):765-8.
- Lehmann, R., and Schleicher, E.D. 2000. Molecular mechanism of diabetic
nephropathy. Clinica Chimica Acta, 297. (135–144).
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism
of action. J. Nutr., 134, 3479S-3485S.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. 1951. Protein measurement
with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265.
- Mizuno T., Wasa T., Ito H, Suzuki C., Ukai N. 1992. Antitumor-active polysaccharides
isolated from the fruiting body of *Herichium erinaceum*, an edible and medicinal
mushroom called yamabushitake or houtou. Biosci Biotechnol Biochem
56:347-348
- Mizuno T., Kinoshita T., Zhuang C., Ito H., Mayuzumi Y. 1995a. Antitumor-active
heteroglycans from *Niohshimeji* mushroom, *Tricholoma giganteum*. Biosci
Biotechnol Biochem 59:568– 571
- Mizuno T., Saito H., Nishitoba T., Kawagishi H. 1995b. Antitumor active substances
from mushrooms. Food Rev Int 11:23–61
- Nakano, I., Tsugawa, T., Shinohara, R., Watanabe, F., Fujita, T., Nagata, M., Katoa, T.,
Himenoa, Y., Kobayashi, T., Fujiwara, K., Nagata, M., Itoha, M. And Nagasaka,
A. 2003. Urinary sorbitol measurement and the effect of an aldose reductase
inhibitor on its concentration in the diabetic state. Journal of Diabetes and Its
Complications, 17; 337-342.
- Nadig, PD., Revankar, RR., Dethe, SM., Narayanswamy, SB., Aliyar, MA. 2012. Effect
of *Tinospora cordifolia* on experimental diabetic neuropathy. Indian J
Pharmacol, v.44(5): 580–583.
- Obrosova, I. G., Huysen, C. V., Fathallah, L., Cao, X., Greene, D. A. and Stevens, M. J.
2002. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in
peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. The
Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal,
16; 123-125.

- Onay M. 2008. Investigation for Natural Extract Inhibitors of Bovine Lens Aldose Reductase Responsible for the Formation of Diabetis Dependent Cataract. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Pegler, D.N., Roberts, P.J. and Spooner, B.M. 1997. British *Chanterelles* and Tooth Fungi. Royal Botanic Gardens, 114 p., Kiew.
- Podwall, D. and Gooch, C. 2004. Diabetic neuropathy: Clinical features, etiology, and therapy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 4; 55–61.
- Ramana, KV., Chandra, D., Srivastava, S., Bhatnagar A., Aggarwal BB. and Srivastava SK. 2002. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 277:32063–32070. [PubMed: 12063254].
- Ruef, J., Liu, SQ., Bode, C., Tocchi, M., Srivastava, S., Runge, MS. and Bhatnagar A. 2000. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 20:1745–1752. [PubMed: 10894812].
- Lee, HS., Shim, HS., Kim, JS. and Kang, SS. 2006. Constituents from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* and their aldose reductase inhibitory activity; *Archives of Pharmacal Research* June 2006, Volume 29, Issue 6, pp 479-483
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P. U., Suneetha, A., Rao, T. S., Srinivasulu, M. and Reddy, G. B. 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Medical Science Monitor*, 12(12); 525-529.
- Setter, S. M., Campbell, R. K. and Cahoon, C. J. 2003. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, 37; 1858-1866.
- Singleton V.L., Rossi J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V. and Bhatnagar, A. 2005. Role of Aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26(3); 380–392.
- Sun, G., Ma, Y., Gao, X., König, S., Fales, H. M. and Kador, P. F. 2004. Method for isolating tight-binding inhibitors of rat lens aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 79; 919-926.
- Sułkowska-Ziaja K., Muszyńska B., Ekiert H. 2012. Chemical composition and cytotoxic activity of the polysaccharide fractions in *Sarcodon imbricatus* (Basidiomycota). *Acta Mycol.* 47 (1): 49–56.

- Tammali, R., Ramana, K. V., Singhal, S. S., Awasthi, S. and Srivastava, S. K. 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *ancer Research*, 66 (19); 9705-13.
- Tammali R, Srivastava SK, Ramana VK. 2011. Targeting Aldose Reductase for the Treatment of Cancer Published in final edited form as: *Curr Cancer Drug Targets*. June ; 11(5): 560–571.
- Tanimoto T, Sato S, Kador PF. 1990. Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase from EHS tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 39:445–453. [PubMed: 2106320]
- Tanimoto, T., Maekawaa, K., Okadaa, S. and Yabe-Nishimurab, C. 1998. Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta*, 365; 285-292.
- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Rangel, J.; Ribeiro, B.; Silva, B.M.;Baptista, P.; Seabra, R.M. 2005. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *J. Agric. Food Chem*. 53, 4925-4931.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84.
- Wang, Z., Ling, B., Zhang, R., Suo, Y., Liu, Y., Yu, Z. and Liu, C. 2009. Docking and molecular dynamics studies toward the binding of new natural phenolic arine inhibitors and aldose reductase. *Journal of Molecular Graphics and odelling*, 5881; 1-8.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1173-1183.
- Yabe-Nishimura, C. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity:A potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews*,50(1);21-33.
- Yagihashi, S., Yamagishi, S.I. and Wada, R. 2007. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77; 184–189.
- Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Iwanari H, Watanabe A, Aburatani H, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T, Araki Y. 2007. Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 17:1300–1306. [PubMed: 17425679]

Zeindl-Eberhart E, Jungblut PR, Otto A, Rabes HM. 1994. Identification of tumor-associated protein variants during rat hepatocarcinogenesis. Aldose reductase. J Biol Chem.; 269:14589–14594. [PubMed: 8182065]

Zhong, JJ., Xiao, JH. 2009. Secondary metabolites from higher fungi discovery, bioactivity, and bioproduction, Adv Biochem Eng Biotechnol 113:79–150.

<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1ads.html>

<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/1/21/F1.expansion>

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Glycolysis.svg>

<http://www.uyduharita.org/trabzon-haritasi-resimleri/>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sercan ÇADIRCI

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : Ankara

Medeni Hali : 25.05.1988

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Cumhuriyet Lisesi (Süper Lise) - 2006

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - 2011

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği
Bölümü Yandal Sertifika Programı - 2011

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ABD
Eylül 2011 – Kasım 2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Uslu Tarımsal Analiz Laboratuvarı: (Stajyer Biyolog) 2009

GATA Mikrobiyoloji – GATA İmmünoloji: (Stajyer Biyolog) 2010-2011

Emtis Biosciences : Ürün Sorumlusu-Satış Temsilcisi (Biyolog) 2012-2013

Uluslararası Kongre Bildirisi

Ozlem Yildirim, Ergin Murat Altuner, Ilgaz Akata, Kerem Canli, Yasemin G. Isgor, Belgin S. Isgor, Sercan Cadirci and Elif Cakiroglu, *In vitro* antimicrobial screening and antioxidant activity of *Scleroderma verrucosum*, *Sarcodon imbricatus*, *Cantharellus cibarius*., (Aug 2013) SIMB Annual Meeting & Exhibition, Sheraton-San Diego.