



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANTİKANSER TAKSANLARIN FINDIK (*Corylus avellana*) HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ**

İlayda GÖKTEPE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şule ARI**

Temmuz, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Unvan
Üniversite
Fakülte

Unvan
Üniversite
Fakülte

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 29216 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Göktepe, İ. & Arı, Ş., 2019, Elicitor Treatments on Hazelnut Cell Cultures for Production of Taxanes, *II. International Green Biotechnology Congress*, 09-11 September 2019, İstanbul, 46.

Arı, Ş., ve diğ., 2019, Anticancer Taxanes in Turkish Hazelnut, *17th Annual Symposium in Plant Biology*, 12 October 2019, Boston, Poster presenter list no: 2.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şule ARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm imkanlarıyla her daim destek olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyallerini temin ettiğimiz Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ümit Serdar ve çalışma kapsamında HPLC analizlerinin yapılmasında büyük emeği geçen Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ hocalarıma teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim süresince desteklerini hissettiğim, Doç. Dr. Aslıhan TEMEL hocama ve sevgili çalışma arkadaşlarım Olcay ŞAHİN, Merve CEYLAN, Burcu ARIKAN, Aslıhan ŞENGELLEN ve Yunus AKSÜT'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan sevgili ailem ve Tolga ATILGAN'a çok teşekkür ederim.

Temmuz 2020

İlayda GÖKTEPE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	4
2.1.1 Kallus Kültürü	5
2.1.2 Hücre Süspansiyon Kültürü.....	6
2.2 BİTKİLERDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİZMA	6
2.2.1 Bitki Hücre Teknolojisi ve Sekonder Metabolit Üretimi	10
2.2.2 Elisitasyon	11
2.3 FINDIK	14
2.4 TAKSAN TÜREVİ SEKONDER METABOLİTLER.....	18
2.5 TAXOL®	20
2.6 TAXOL® ETKİ MEKANİZMASI.....	24
2.7 TAKSAN TÜREVİ SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİMİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	26
2.7.1 Yapay Kültürleme	26
2.7.2 Kimyasal Sentez	27
2.7.3 Kimyasal Yarı Sentez	27
2.7.4 Metabolizma Mühendisliği.....	27
2.7.5 Hücre Kültürleri.....	28
2.8 YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).....	29
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	32
3.1 BİTKİ MATERYALİ.....	32
3.2 BİTKİ YETİŞTİRİLMESİ	32

3.2.1 Besiyeri Hazırlanması	32
3.2.2 Yüze Sterilizasyonu ve Tohum Ekimi.....	33
3.3 KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	34
3.3.1 Kallus Oluşturma.....	34
3.3.2 Kallus Oluşum Frekansının Hesaplanması.....	35
3.4 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ KURULMASI.....	35
3.4.1 Üreme Eğrileri Oluşturulması	36
3.4.1.1 Thoma Lamı ile Hücre Sayımı	36
3.4.1.2 Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümleri	37
3.5 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE ELİSİTASYON UYGULAMALARI	37
3.5.1 Metil Jasmonat Elisitasyonu.....	37
3.5.2 Fenilalanin Elisitasyonu	38
3.6 YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ.....	38
3.6.1 Fındık Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Taksan Molekülleri Ekstraksiyonu.....	38
3.6.1.1 Liyofilizasyon.....	39
3.6.1.2 Toplam Taksan Ekstraksiyonu	39
3.6.1.3 Hücre Dışı Taksanların Ekstraksiyonu.....	39
3.6.2 HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) Analizi	40
3.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1 <i>IN VITRO</i> BİTKİ YETİŞTİRİLMESİ.....	43
4.2 FINDIK ÇEŞİTLERİNİN KALLUS OLUŞTURMA FREKANSI.....	44
4.3 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ	48
4.3.1 Hücre Sayımı ve Canlılığı Bulguları	49
4.3.2 Kuru ve Yaş Ağırlık Ölçümlerine Göre Üreme Eğrileri Oluşturulması.....	50
4.4 MEJA VE PHE ELİSİTÖRLERİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE TAKSAN TÜREVİ METABOLİT ÜRETİMİNE ETKİSİ	50
4.4.1 Elisitörlerin Toplam Üretilen Taksanların Miktarı Üzerindeki Etkileri.....	51
4.4.2 Elisitörlerin Hücre Dışı Taksanların Üretimi Üzerindeki Etkileri	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Bitki doku kültürü teknikleri ile ilgili önemli çalışmalar (Kutlutürk,2019).	4
Şekil 2.2: Bitki doku kültürü sistemlerinde kullanılan elisitör maddelerin sınıflandırılması (Bhatia ve Bera, 2015).	12
Şekil 2.3: Fenilalaninin paklitaksel üretim yolağına etkisi (McElroy ve Jennewein, 2017).	13
Şekil 2.4: Fındık bitkisine ait dişi (A) ve erkek çiçek (B) (Nature, 2019a).	15
Şekil 2.5: Türkiye’de fındık üretiminin illere göre dağılımı (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019).	16
Şekil 2.6: İzopren ünitesi.	20
Şekil 2.7: Porsuk ağacı (<i>Taxus brevifolia</i>) kabuk (A) ve iğne yapraklı meyve (B) (Nature, 2019b).	21
Şekil 2.8: Paklitaksel molekülü.	21
Şekil 2.9: HPLC sistemi.	30
Şekil 3.1: Metil Jasmonat (MeJa)’ın kimyasal yapısı.	38
Şekil 3.2: Fenilalanin (Phe)’in kimyasal yapısı.	38
Şekil 3.3: HPLC analizlerinde kullanılan 10-DAP, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel standart bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltilerinin kolondan çıkış sürelerini belirten kromatogramı.	41
Şekil 4.1: Tombul fındık bitkiciğinin 2 aylık (A) ve 6 aylık (B) görüntüleri.	43
Şekil 4.2: Kalınkara fındığa ait farklı besiyerlerinde gelişen 30 günlük kallusların görünümü. (A), MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyeri (B) MS + 2 mg/L 2,4-D +0,4 mg/L KİN ve (C) MS + 2 mg/L 2,4-D +1,6 mg/L KİN.	44
Şekil 4.3: Fındık çeşit ve genotiplerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, KİN ve BAP) kallus oluşumuna etkisi.	47
Şekil 4.4: Fındıkların farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonunda besiyerlerinde kallus oluşturma frekansları.	48

Şekil 4.5: Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürü örneklerinin Thoma lamındaki görüntüsü. Canlı hücreler şeffaf (A) ve ölü hücreler mavi (B) görünmektedir.....	49
Şekil 4.6: Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde mililitrede bulunan hücre sayısı (A) ve hücre canlılık yüzdesi (B) grafikleri.	49
Şekil 4.7: Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde kültürlenme süresi boyunca yaş ağırlık (A) ve kuru ağırlık (B) değişimleri.	50



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bitki sekonder metabolitleri tipleri (Jamwal ve diğ., 2018).....	7
Tablo 2.2: Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretimi için kullanılan teknikler (Bhatia and Bera, 2015).....	9
Tablo 2.3: Fındık (<i>Corylus avellana</i>) bitkisinin taksonomik sınıflandırması.	15
Tablo 2.4: Ülkelere göre dünya fındık üretimi (Ton, T.C. Ticaret Bakanlığı, 2018).	16
Tablo 2.5: 100 g fındığın besin değerleri (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019).	17
Tablo 2.6: Medikal olarak kullanılan önemli sekonder metabolitler ve bitkisel kaynakları (Pichersky ve Raguso, 2018)..	19
Tablo 3.1: Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri (Murashige and Skoog, 1962).	33
Tablo 3.2: HPLC analizinde kullanılan kolonun (C18) yıkama, şartlama ve analiz koşulları.	40
Tablo 4.1: Kullanılan fındık çeşit ve genotiplerinin kallus oluşturma frekansı.	45
Tablo 4.2: Elisitörler varlığında Kalıncara ve Tombul fındık çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde toplam üretilen taksan miktarları (µg/g).....	51
Tablo 4.3: Elisitörler varlığında Kalıncara ve Tombul fındık çeşitlerine ait ekstraktlarda bulunan hücre dışına salınan taksan türevlerinin miktarları (µg/g).	52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
L	: Litre
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrad Derece
h	: Saat
dk	: Dakika

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

MeJa	: Metil Jasmonat
Phe	: Fenilalanin
KİN	: Kinetin
BAP	: 6-benzilamino pürin
2,4-D	: 2,4- dikloro fenoksi asetik asit
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
FDA	: Food and Drug Administration
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
ppm	: Parts per Million
UV	: Ultraviyole
Cor	: Koronatin
MS	: Murashige & Skoog Besiyeri
T.E.	: Tespit Edilemedi
US	: Ultrasonikasyon
SA	: Salisilik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİKANSER TAKSANLARIN FINDIK (*Corylus avellana*) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BİYOTEKNOLOJİK ÜRETİMİ

İlayda GÖKTEPE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şule ARI

Paklitaksel, 1971 yılında *Taxus brevifolia* (Porsuk ağacı) kabuğundan izole edilmiş ve Taxol® ticari adı altında anti kanser ilaç olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmış önemli bir terapötiktir. Taxol® (Paklitaksel), günümüzde çeşitli tipteki tümörlerin tedavisinde başarılı bir biçimde kullanılmaktadır. Paklitaksel, diterpen alkaloid grubu bir sekonder metabolittir. Sekonder metabolitler genel olarak bitkilerin stres faktörleriyle mücadele etmelerinde görevli düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Sekonder metabolitlerin üretim ve saflaştırılması zorlu ve karmaşık süreçler gerektirir. Paklitaksel ekstraksiyonunun verimli bir protokol ile gerçekleştirilebilmesi için birçok yöntem denenmiştir. Kimyasal sentez, yarı sentez, metabolizma mühendisliği, bitki doku kültürü tekniklerinin kullanılması bu yöntemlerin en önemlileridir. Taxol® üretiminde halen kullanılmakta olan yöntem, *Taxus* türlerinin hücre kültürleri ile üretimdir. Üretim hızının artırılması, verimin yükseltilmesi, paklitaksel öncüllerinin üretimi ve istenmeyen yan ürün oluşumunun ortadan kaldırılması gibi amaçlar için alternatif bitkilerin kültür sistemlerinin kurulması büyük umut vadetmektedir. Fındık (*Corylus avellana*) Türkiye’de büyük miktarlarda üretimi ve ihracatı yapılan, besin değeri nedeniyle insan diyeti için oldukça önemli bir bitkidir. Ekonomik öneminin yanı sıra, fındığın paklitaksel türevi taksanları üretebildiği gösterilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında ülkemizde yetiştirilen 5 farklı çeşit (Tombul, Sivri, Çakıldak, Palaz, Kalınkara) ve 2 farklı genotipteki (Ham ve Sivri Yağlı) fındığın bitki doku kültürü sistemleri kullanılarak taksan türevi antikanser maddelerin (paklitaksel, bakkatin III, 10-

deasetil bakkatin III ve sefalomannin) biyoteknolojik üretimine yönelik potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda tüm fındık çeşit ve genotiplerinde kallus kültürleri, Tombul ve Kalıncara fındıklarda da hücre süspansiyon kültürleri başarıyla kurulmuştur. Hücre süspansiyon kültürlerinde taksan türevi antikanser maddelerin üretiminin artırılması amacıyla hücre süspansiyon kültürlerine Metil Jasmonat (MeJa) ve Fenil alanin (Phe) ile elisitasyon uygulaması yapılmıştır. Elisite edilen kültürlerde bulunan toplam ve hücre dışına salınan paklitaksel, bakkatin III, 10-deasetil bakkatin III ve sefalomannin miktarları HPLC ile analiz edilmiştir.

Kallus kültürlerinin kurulması amacıyla MS besiyerine eklenen 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN, 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN ve 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP bitki büyüme düzenleyicilerinden kallus kültürleri oluşturmada tüm fındık tiplerinde en etkili olan kombinasyonun 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP olduğu (Sivri Yağlı- %50, Ham- %46, Tombul- %36, Sivri- %26, Çakıldak- %40, Palaz- %40 ve Kalıncara- %36) belirlendi. Hücre sayımı, yaş ve kuru ağırlık ölçümleri yapılarak Kalıncara ve Tombul fındık çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinin hücre üreme grafikleri oluşturuldu. Bu sonuçlara dayanılarak MeJa (100 µM) ve Phe (3 µM) elisitörlerinin uygulanması için hücrelerin logaritmik üreme fazının ortasında oldukları kültürlenmenin 17. günü belirlendi. Hücre süspansiyon kültürlerinden üremenin durduğu kültürlenmenin 30. günde toplam ve hücre dışına salınan taksanların ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktlardan taksan türevi diterpen alkoloidlerden 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel moleküllerinin HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı. Tombul fındıkta toplam bulunan paklitaksel miktarının kontrol grubuna ($3,81 \pm 0,30$ µg/g) göre 100 µM MeJa ve 3 µM Phe uygulanmış kültürlerde sırasıyla %42,5 ($5,43 \pm 0,31$ µg/g) ve %56,1 ($5,95 \pm 0,17$ µg/g) oranında arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Tombul fındıkta hücre dışına salınan bakkatin III miktarı kontrol grubuna ($19,65 \pm 0,17$ µg/g) göre 100 µM MeJa uygulanmış ve 3 µM Phe uygulanmış kültürlerde sırasıyla %43,6 ($28,23 \pm 1,54$ µg/g), ve %78,3 ($35,05 \pm 0,74$ µg/g) artmıştır. Yine Tombul fındıkta hücre dışına salınan sefalomannin miktarı kontrol grubuna ($2,13 \pm 0,03$ µg/g) göre 100 µM MeJa uygulanmış ve 3 µM Phe uygulanmış kültürlerde sırasıyla %26,2 ($2,69 \pm 0,14$ µg/g) ve %27,2 ($2,71 \pm 0,13$ µg/g) artmıştır. Kalıncara fındıkta ise hücre dışına salınan 10- DAP miktarı kontrol grubuna ($41,71 \pm 0,15$ µg/g) göre 100 µM MeJa uygulanmış kültürde %9,8 ($45,83 \pm 1,49$ µg/g) artış göstermiştir. Bu sonuçlara göre Tombul fındık antikanser taksan türevlerinin hücre süspansiyon kültürlerinde üretimi bakımından Kalıncara fındığa göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Yapılan elisitasyon uygulamaları sonucunda Tombul fındıkta toplam paklitaksel, hücre dışına salgılanan bakkatin III ve sefalomannin üretimlerindeki artış oranlarının Kalıncara fındığa göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Bu tez çalışması ile Türkiye’de yetişen fındık çeşitlerinin ilk kez kallus ve sekonder metabolit üretimi amacıyla hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Bunun yanı sıra, yapılan elisitasyon çalışmaları sonucunda kemoterapinin ilk aşamasında yaygın olarak kullanılan Taxol® ilacının hammaddesi olan paklitaksel molekülünün Türkiye’de yetişen Tombul fındık (*Corylus avellana*) bitkilerine ait hücre kültürlerinde üretilip üretilmediği gösterilmiştir. Yapılan elisitasyonlar ile hücre süspansiyon kültürleri kurulan fındık çeşitlerinde paklitaksel ve onun öncülleri olan diğer taksan türevi maddelerin üretimleri de arttırılmıştır. Bu tez çalışması, ülkemiz topraklarında yetişen fındık çeşitlerinin, paklitaksel ve paklitakselin kimyasal sentezinde kullanılan öncüllerden bakkatin III ve sefalomanninin üretiminde bir alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Temmuz 2020, 91 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Corylus avellana*, findık, hücre süspansiyonu, taksan, biyoteknoloji



SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOTECHNOLOGICALLY PRODUCTION OF ANTICANCER TAXANES IN HAZELNUT (*CORYLUS AVELLANA*) CELL CULTURES

İlayda GÖKTEPE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Şule ARI

Paclitaxel is an important therapeutic that was obtained in *Taxus brevifolia* (Yew tree) barks in 1971, and the FDA approved it, which is under the brand name Taxol® for use as an anticancer drug. Taxol® (Paclitaxel) is used for the treatment of various types of cancer with success. Paclitaxel is a secondary metabolite belonging to diterpene alkaloid. Secondary metabolites are generally low molecular weight compounds that are responsible for combating stress factors in plants. Production and purification of secondary metabolites require hard and complex processes. Many methods have been tried to perform paclitaxel extraction with an efficient protocol. The most important of these methods are chemical synthesis, semi-synthesis, metabolism engineering, use of plant tissue culture techniques. The method currently used in Taxol® production is cell cultures of *Taxus* species. However establishment of culture systems of alternative plants promises great hope for purposes like increasing the production speed, increasing efficiency, production of paclitaxel precursors and eliminating unwanted byproduct formation. Hazelnut (*Corylus avellana*) being produced and exported of high quantities in Turkey is an important plant also due to its nutritional value for the human diet. As well as its economic importance, it has been shown that hazelnut produces paclitaxel-derived taxanes.

In this thesis, it was aimed to investigate the potentials intended biotechnological production of taxane-derived anticancer substances (paclitaxel, baccatin III, 10-deacetylbaaccatin III, and cephalomannine) by using plant tissue culture systems of five different varieties (Tombul, Sivri, Çakıldak, Palaz, Kalinkara) and two different genotypes (Ham ve Sivri Yağlı) of hazelnut grown in our country. For this purpose, callus cultures in all hazelnut varieties and genotypes, and cell suspension cultures in Tombul and Kalinkara hazelnuts have been successfully established. In order to increase the production of taxane-derived anticancer agents in cell suspension cultures, elicitation was applied to cell suspension cultures with Methyl Jasmonate (MeJa) and Phenylalanine (Phe). In cultures applied elicitation, the amounts of paclitaxel, baccatin III, 10-deacetylbaaccatin III and cephalomannine that were released total and extracellular were analyzed by HPLC.

2 mg/L 2,4-D+ 0,2 mg/L BAP was determined to be the most effective combination in all hazelnut types (Sivri Yağlı- 50%, Ham- 46%, Tombul- 36%, Sivri- 26%, Çakıldak- 40%, Palaz- 40% ve Kalinkara- 36%) of plant growth regulators (2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN, 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN ve 2 mg/L 2,4-D+ 0,2 mg/L BAP) added to MS medium for the establishment of callus cultures. The growth curve of the cell suspension cultures belonged to Kalinkara and Tombul hazelnut types were made by counting the number of cells and measuring wet and dry weight. Based on these results, the 17th day of cultivation was determined as the middle of the logarithmic growth phase of the cells for the application of MeJa (100 µM) and Phe (3 µM) elicitors. The extraction of taxanes released into the total and extracellular medium was performed on the 30th day of cultivation that growth in cell suspension cultures stopped. From obtained extracts, qualitative and quantitative analysis of 10-deacetylbaaccatin III, baccatin III, cephalomannine and paclitaxel molecules, which are taxane-derived diterpene alkaloids, were performed by HPLC. Hazelnut cell suspension culture types in which the amount of paclitaxel, baccatin III, cephalomannine and 10-DAP, which are taxane-derived substances analyzed in this thesis study, are successfully increased by elicitation application are given below. The amount of total paclitaxel contained in Tombul hazelnuts was determined to increase at the rate of 42,5% ($5,43 \pm 0,31$ µg/g) and 56,1% ($5,95 \pm 0,17$ µg/g) in cultures treated with respectively 100 µM MeJa and 3 µM Phe compared to control group ($3,81 \pm 0,30$ µg/g). Similarly, the amount of baccatin III that was released into the extracellular medium in Tombul hazelnut was increased by 43,6% ($28,23 \pm 1,54$ µg/g) and 78,3% ($35,05 \pm 0,74$ µg/g) in cultures treated with respectively 100 µM MeJa and 3 µM Phe compared to control group ($19,65 \pm 0,17$ µg/g). The amount of cephalomannine that was released into the extracellular medium in Tombul hazelnut was increased by 26,2% ($2,69 \pm 0,14$ µg/g) and 27,2% ($2,71 \pm 0,13$ µg/g) in cultures treated with respectively 100 µM MeJa and 3 µM Phe compared to control group ($2,13 \pm 0,03$ µg/g). The amount of 10- DAP that was released into the extracellular medium in Kalinkara hazelnut was increased by 9,8 % ($45,83 \pm 1,49$ µg/g) in cultures treated with 100 µM MeJa compared to control group ($41,71 \pm 0,15$ µg/g). According to these results, Tombul hazelnut gave better results in terms of the production of anticancer taxane derivatives in cell suspension cultures than Kalinkara hazelnut. As a result of elicitation applications made, the rate of increase in the production of paclitaxel contained in intracellular and baccatin III, cephalomannine released into extracellular medium was found to be higher in Tombul hazelnut than in Kalinkara hazelnut.

In this thesis, callus cultures and cell suspension cultures of hazelnut types grown in Turkey were established for the first time for the production of secondary metabolites. Besides, Paclitaxel molecule, the raw material of Taxol® drug that is used widely as a primary chemotherapeutic drug, has been shown to be produced in cell cultures of Tombul hazelnut

(*Corylus avellana*) plant grown in Turkey. The production of paclitaxel and other precursors of taxane-derived substances were increased by elicitations made in cell suspension cultures of hazelnut types. This thesis suggests that it can be considered as an alternative in the production of paclitaxel and baccatin III, cephalomannine, precursors used in chemical synthesis of paclitaxel, of hazelnut types grown in our country.

July 2020, 91 pages.

Keywords: *Corylus avellana*, hazelnut, cell suspension, taxane, biotechnology



1. GİRİŞ

Kanser genel bir tanım olarak hücrelerin kontrollü bölünme yeteneklerini yitirerek oluşturdukları düzensiz hücre kitleleridir. Kanserleşen hücreler diğer hücrelerden farklı olarak bölünmeyi kontrol altında tutan sinyal yollarındaki işlev bozuklukları nedeniyle devamlı olarak bölünmenin uyarılmasını sağlayan sinyallerle tetiklenir. Hem genetik hem çevresel birçok faktöre bağlı olan kanser dünyada kalp hastalıklarından sonra en fazla karşılaşılan hastalıktır (WHO, 2019). Farklı kaynaklardan türevlenen birçok kanser tipi vardır ve hastalık kişilerde farklı seyredebilir. Bu nedenle de oldukça zor ve uzun bir tedavi süreci gerektirmektedir. Hücre bölünmesi süreçlerinin doğru işlemesi hücrelerin yaşam döngüsü ve organizmanın sağlığı açısından kritik öneme sahiptir. Bölünme sırasında oluşabilecek herhangi bir hata durumunda hücrede bölünmenin düzenlenmesinden sorumlu mitotik kontrol noktaları bölünmenin devam etmesine engel olur ve süreci duraklatır (Clarke ve Gimanez, 2000).

Günümüzde kanser tedavisinde birçok yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı kemoterapi tedavileridir. Kemoterapi hastaya tümörün hasara uğratılarak bu hücrelerin çoğalmalarını engelleyecek birtakım anti kanser ilaçların verilmesidir (Furue, 2003). Geçmişten günümüze artan hasta sayısı ve var olan kemoterapötiklerin istenmeyen yan etkileri bilim insanlarını yeni anti kanser ilaçların araştırılmasına yöneltmiştir. Bu amaçla 1960 ve 1981 yılları arasında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Amerikan Tarım Departmanı (USDA) iş birliği ile anti kanser aktiviteye sahip bitkisel içeriklerin elde edilmesi için bir bitki tarama programı başlatılmıştır. Bu program kapsamında 1964 yılında *Taxus brevifolia* (Pasifik Porsuk Ağacı) kabuklarından elde edilen ekstraktların sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Wani ve diğ.,1971). Paklitaksel olarak adlandırılan bu madde NCI ilaç geliştirme programına dahil edilmiştir. 1992 yılında FDA (Food and Drug Administration) etken maddesi paklitaksel olan Taxol® ilacının yumurtalık kanseri tedavisinde kullanımına onay vermiştir. Bu onayı 1994 yılında meme kanseri ve 1999 yılında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) onayları takip etmiştir (Weaver ve Bement, 2014).

Paklitaksel mikrotübülleri oluşturan α ve β -tübülün heterodimerlerinin polimerizasyonunu desteyerek mikrotübül ayrışmasını engeller. Mitoz bölünme geçiren kardeş kromatidler iğ mikrotübüllerine DNA'nın sentromerik bölgelerinden bağlanır. Mikrotübüllere stabil bağlanma

yapmamış kinetokorlar mitotik ilerlemeyi geciktiren sinyal iletim yollarını aktive eder. Paklitaksel varlığında polimerize olmuş mikrotübüller hücre bölünmesinin sürmesini engeller. Mitotik kontrol noktası mitozda kromozomların ayrılmasını kontrol ederek bu sağlanana kadar bölünmesini sürmesini engeller. Paklitaksel kaynaklı mitotik tutuklama, mitotik kontrol noktasının aktivasyonu nedeniyle oluşur (Weaver ve Bement, 2014).

Taxol® birçok kanser tipinin tedavisinde etkili bir biçimde kullanımı ile büyük bir pazar payına sahip olmuştur. Bununla birlikte, paklitakselin doğrudan *T. brevifolia* kabuklarından ekstraksiyonu çok maliyetli ve verimsiz bir süreçtir. Bu nedenle paklitaksel ekstraksiyonuna alternatif yöntemler geliştirilmesi için çalışmalar başlatılmıştır. *Taxus* hücre kültürleri kullanılarak Taxol® öncüllerinin üretilmesi ile yarı sentez yöntemi hali hazırda Taxol® üretimi için kullanılan temel yöntemdir.

Hoffman ve diğ. (1998)'nin yapmış olduğu çalışmada Fındık (*Corylus avellana*) bitkisi hücrelerinden elde edilen ekstraktlarda paklitaksel ve türevi anti kanser moleküllerin varlığı saptanmıştır. Fındık hücrelerinin *in vitro* laboratuvar koşullarında üretiminin *Taxus* türlerine göre önemli avantajlarının olması paklitaksel üretiminde fındık bitkisinin kullanılmasına dikkat çekmektedir. Türkiye dünya fındık üretiminde %70 gibi büyük bir oranla ilk sırada gelmektedir. Proteinler, vitamin ve mineraller gibi temel besin kaynaklarının yanı sıra paklitaksel ve türevleri gibi önemli ilaç hammaddeleri barındırması bitkinin değerini arttırmaktadır (FAO, 2019; Kutlutürk, 2019).

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye’de yetişen 5 farklı çeşit (Tombul, Sivri, Çakıldak, Palaz ve Kalınkara) ve 2 farklı genotipte (Sivri Yağlı ve Ham) fındıklarda paklitaksel ve türevleri moleküllerin (10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel) üretimlerinin artırılması amacıyla hücre kültürleri kurulmuştur. Kurulan hücre kültürlerinde elisasyon uygulamaları yapılmış ve bu kültürlerde tespit edilen anti kanser aktiviteye sahip moleküllerin miktarları HPLC analizi ile belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre paklitaksel ve türevi moleküllerin miktarları *Taxus* hücre kültürlerinde tespit edilen kadar yüksek olmamasına karşın, fındık bitkisinin üretim ve kültürleme süreçlerinde günümüzde Taxol® üretiminde kullanılan *Taxus* hücre kültürlerine göre üstün özelliklerinin olduğunu görülmektedir. Yapılacak ileri optimizasyon çalışmaları ile Türkiye’de yetişen fındıklara ait hücre kültürlerinde paklitaksel ve türevi moleküllerin

Üretimleri arttırılabileceği ve bu kültürlerin gelecekte Taxol® ve türevi ilaçların yeni bir sürdürülebilir hammadde kaynağı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

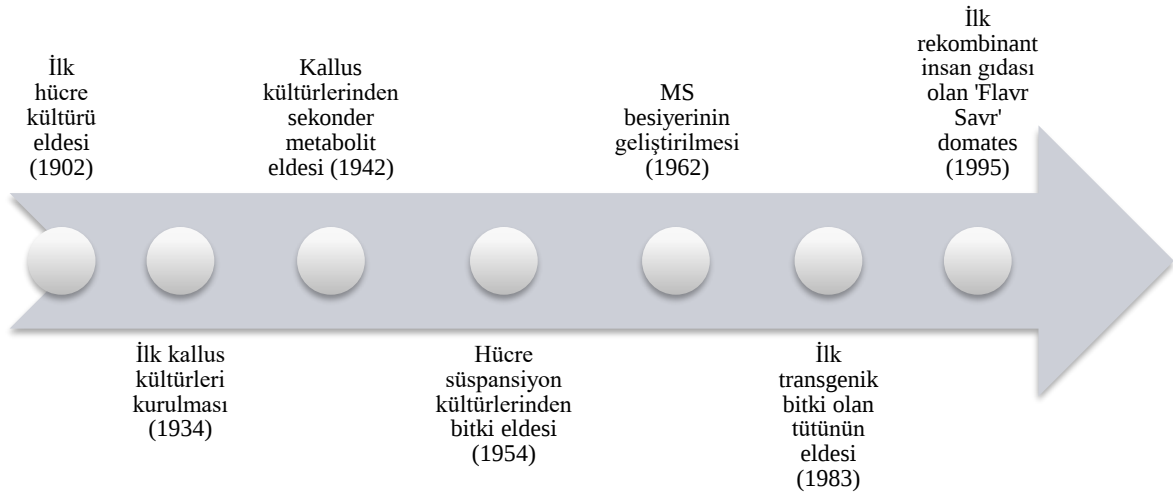


2. GENEL KISIMLAR

2.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü teknikleri; aseptik şartlarda, laboratuvar koşullarında tam bir bitki ya da bitkisel kısımlar kullanılarak yeni bir bitki ya da bitkisel kısımların elde edilmesine olanak veren tekniklerdir. Bir hücreden uygun şartlar altında bütün organizmanın üretilmesi olarak tanımlanan totipotensi özelliği, bitki doku kültürü tekniklerinin temelini oluşturmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2001).

20. Yüzyılın başlarında Haberlandt tarafından ilk hücre kültürlerinin kullanılmasından beri bu tip kültürler bitkisel araştırmaların temelini oluşturmaktadır (Haberlandt, 1902). 1900 lü yılların sonlarında ise çözeltiler içerisinde bitkilerin yetiştirilmesi çalışmaları, bütün bir bitkinin veya belirli bitkisel kısımların laboratuvar ortamında üretilmesi fikrini doğurmuştur. Şekil 2.1 de bitki doku kültürü teknikleri ile ilgili önemli çalışmaların tarihsel gelişimi verilmiştir (Babaoğlu ve diğ., 2001).



Şekil 2.1: Bitki doku kültürü teknikleri ile ilgili önemli çalışmalar (Kutlutürk,2019).

In vitro kültürler; mevsimsel, coğrafi ve azalan yabani bitki popülasyonunun neden olduğu kısıtlamalardan bağımsız olduklarından sağlam tedarik zincirlerinin oluşturulmasına, ekoloji ve bitki çeşitliliğinin kaybı sorunlarının önüne geçilmesine yardımcı olmaktadır. Bu teknoloji ile tarımsal üretimin neden olduğu değerli su kaynaklarının gereksinimi de azaltabilmektedir. Ayrıca, bitki doku kültürleri ile üretilen doğal ürünlerin ticarileşmesi, genetiği değiştirilmiş (GD) olarak sınıflandırılmadığından toplum tarafından kabul edilmesi de kolaydır.

Bitki hücre kültürleri ilaç, gıda ve kozmetik vb. endüstrilerinde kullanılan bitkisel doğal moleküllerin sentezi için önemli kaynaklardır. Aynı zamanda hastalıksız bitki üretimi ve nadir genotiplerin hızlı üretilmesi çalışmalarında da kullanılmaktadır. *In vitro* bitki biliminin gelişmesi, bitki hücrelerinin terapötik moleküllerin üretiminde kullanılabilmesi bakımından da önemlidir (Bhatia and Bera, 2015). Bu yaklaşım özellikle karmaşık yapıya sahip doğal moleküllerin üretimlerinde ilaç endüstrisi için oldukça önem taşımaktadır (Villarreal ve diğ., 2016; Espinosa-Leal ve diğ., 2018). Örneğin bir deniz yosunu olan *Sargassum incisifolium*'dan izole edilen sekonder metabolitler Crohn hastalığı ve ülserat kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında, *Artemisia annua* bitkisinden ekstrakte edilen artemisin sıtma tedavisinde, *Celastraceae* türlerinden elde edilen pristimerin ve tingenon mikrobiyal enfeksiyon tedavilerinde kullanılmaktadır (Seca ve Pinto, 2019).

2.1.1 Kallus Kültürü

Çok hücreli organizmalarda hücreler, zigot oluşumundan kısa bir süre sonra belirli bir işlev kazanmak üzere özelleşmeye başlar. Döllenenin ardından farklılaşmanın başlangıcına kadar geçen sürede her bir hücre bütün bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu özellik totipotensi olarak tanımlanmaktadır (Lodish ve diğ., 2011). Bazı organizmalarda meydana gelen bu farklılaşmanın geri dönüşümü mümkündür. Dediferansiasyon olarak adlandırılan bu durumda hücreler yeniden totipotensi özelliklerini kazanabilirler. Bitkilerde kalluslar dediferansiasyon ile bütün bir organizmayı oluşturabilme yeteneği kazanmış hücreler barındıran kitlelerdir (Mitalipov ve Wolf, 2009). Kallus, ana bitkiden ayrılmış ancak aktif bölünme yeteneğini kaybetmemiş bitkisel doku parçalarının uygun besiyeri ortamında üretilmesi ile meydana gelen farklılaşmamış, düzensiz hücre kitleleridir (Babaoğlu ve diğ., 2001). Bu heterojen yapıdaki hücre kitleleri yaralanan bitkisel dokular ya da *Agrobacterium tumefaciens* benzeri patojenlere karşı doku onarıcı bir cevap olarak meydana gelir (Güven ve Gürsul, 2014).

Yaralama yolu ile mekanik hasar vermek ve eksplantların kallus oluşumunu uyarıcı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besiyerlerine ekilmesi kallus kültürü oluşturmak için etkili yöntemlerden bazılarıdır (İkeuchi ve diğ., 2013). Kalluslar, yapılarında bulundurdıkları farklılaşmamış hücreler nedeniyle birçok kültür için başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Hücre süspansiyon kültürleri için de kalluslar oldukça uygun bir kaynaktır.

2.1.2 Hücre Süspansiyon Kültürü

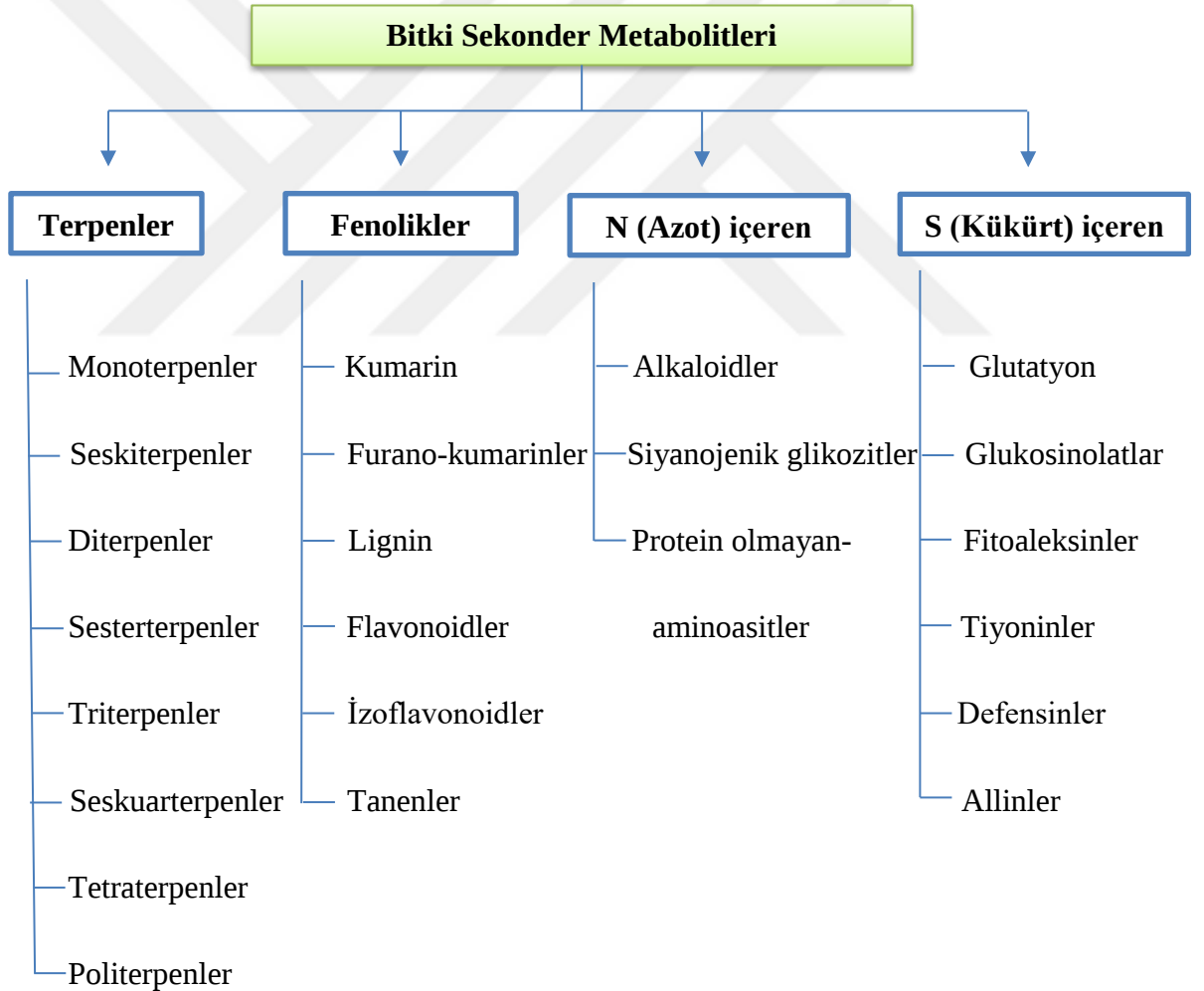
Hücre süspansiyon kültürleri hücre gruplarının sıvı besiyerleri içerisinde dağılması ile üretilmesine olanak veren bitki doku kültürü tekniğidir. Bu çeşit kültürlerde hücrelerin bir araya gelerek kümeleşmesini önlemek amacıyla kültür bir çalkalayıcı ortamında inkübe edilir. Hücre süspansiyon kültürleri ilk aşamada kültüre alınacak bitkinin uygun bir parçasıyla kurulabilir. Başlangıç materyali olarak kallus kültürlerinin kullanılması ise doğrudan ana bitkinin kullanılmasına göre daha avantajlıdır. Bunun nedeni, laboratuvar koşullarında üretilen kallusların yapılarının ana bitkiye göre *in vitro* ortama ve sıvı kültür koşullarına daha iyi uyum sağlayabilmesidir. Aynı zamanda kalluslar sıvı besiyerinde ana bitki eksplantına göre daha iyi bir dağılım göstereceğinden, elde edilecek hücre süspansiyon kültürü daha homojen bir yapıda olmaktadır. Bitki hücrelerinde büyüme, hücrelerin sayılarında ve hacimlerinde meydana gelen artış ile değerlendirilir. Zamana bağlı olarak bitki hücre sayısındaki artışın grafiği, mikroorganizmalarda gözlenene benzer şekilde sigmodial bir üreme eğrisi verir. Kültürde üreme Lag (uyum) faz, Logaritmik (üssel) Faz, Lineer (doğrusal) Faz ve Duraklama Fazı olmak üzere dört temel safhadan meydana gelir (Babaoğlu ve diğ., 2001).

2.2 BİTKİLERDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİZMA

Organizmada gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar temelde primer ve sekonder metabolizma olarak sınıflandırılır (Bhatia ve Bera, 2015). Primer metabolizma hücrelerin varlığını sürdürebilmesi ve yaşamsal aktivitelerini gerçekleştirebilmesinde görevli temel metabolitleri ve yolları ifade eder. Enerji üretiminde görevli nükleotid trifosfatlar, fotosentez ve solunum reaksiyonlarında görevli moleküller, enzimler ve yollar primer metabolizmanın temel bileşenleridir ve canlıların tümünde yüksek oranda benzerlik gösterir (Güven ve Gürsul, 2014).

Esansiyel primer metabolitlerle birlikte gelişmiş bitkiler bir dizi düşük molekül ağırlıklı bileşik üretebilir (Naik ve Khayri, 2016). Doğal yaşamlarında birçok rakip ve stres faktörüyle karşılaşan bitkiler bu faktörler ile baş edebilmek için belirli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler, sekonder metabolitler olarak adlandırılan bileşikler üreterek kendilerini savunurlar. Bu moleküller bitkilerin savunma mekanizmalarında gerekli olan ancak yaşamsal fonksiyonları için zorunlu olmayan bileşiklerdir (Jamwal ve diğ., 2018). Sekonder metabolitler genellikle çeşitlerine, çoklu kiral merkezlerine ve bağlarını kapsayan kompleks kimyasal yapılarına göre karakterize edilir. Tablo 2.1’de temel sekonder metabolitler verilmiştir.

Tablo 2.1: Bitki sekonder metabolitleri tipleri (Jamwal ve diğ., 2018).



Sekonder metabolitlerin sahip olduğu yararlı özellikler ve artan kullanım ihtiyacı bu maddelere olan pazar talebinin artmasına neden olmuştur. Bu artan pazar talebinin karşılanabilmesinin en iyi ve sürdürülebilir yolu özellikle medikal bitkilerin kültüre edilmesi ve bitkisel sekonder metabolitlerin *in vitro* üretimidir (Jamwal ve diğ., 2018). Bitki fizyolojisi alanında yapılan *in vitro* deneyler tedavi edici, renklendirici, gıda takviyesi gibi birçok alanda kullanılabilecek geniş bir sekonder metabolit yelpazesi oluşmasını sağlamıştır. Aseptik koşullarda bitki hücre ve dokuları kullanılarak üretilen *in vitro* kültürler biyokütle artırımını ve yüksek miktarlarda sekonder metabolit üretimini mümkün kılmıştır (Bhatia ve Bera, 2015).

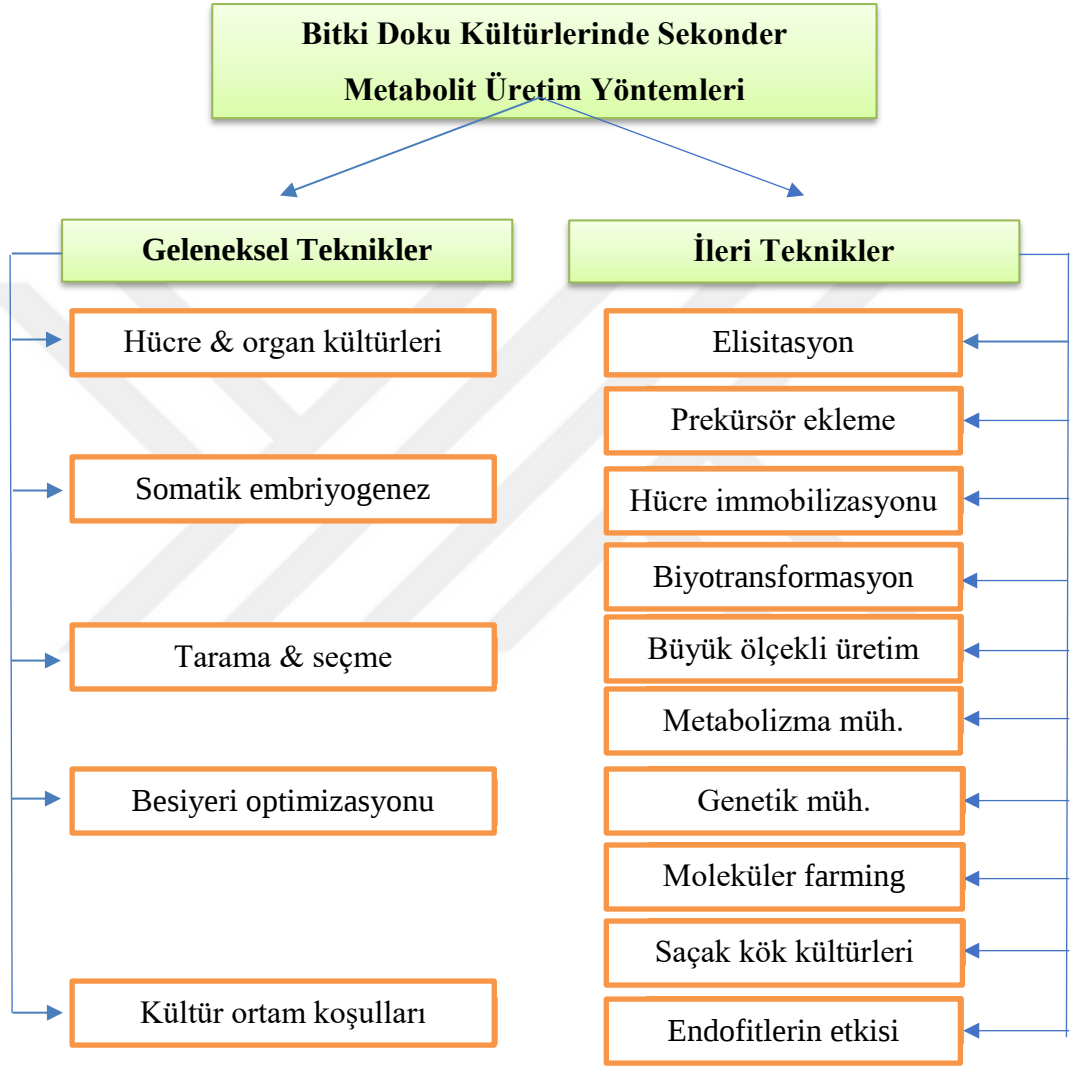
Sekonder metabolitler, bitkilerin bulundukları çevreye adaptasyonlarında rol oynamakla birlikte önemli farmasötik kaynaklardır (Jamwal ve diğ., 2018). Bu moleküllerin çoğu doğal kaynaklarında az miktarlarda (ppm düzeyinde) bulunur. Bu nedenle özellikle nadir bulunan ya da nesli tükenmekte olan bitkilerden yeterli miktarda sekonder metabolit eldesi için kültür sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Örneğin porsuk ağacı (*Taxus baccata*) bitkisi 60 yıllık büyüme sürecinden sonra yüksek paklitaksel üretimine uygun olmaktadır (Jamwal ve diğ., 2018).

Bitki hücre ve doku kültürü teknolojisi önemli sekonder metabolitlerin üretimi için önemli bir alternatiftir. Doku kültürü uygulamalarında hücre, doku ya da organ eksplantları optimum *in vitro* koşullarda kültüre alınabilir. Bu da kültür koşullarında daha az zamanda daha yüksek miktarda ürünün elde edilmesine olanak tanır. Bitki doku kültürü teknolojilerinde günümüzdeki gelişmelerle istenilen maddelerin üretiminin katlarca artırılabilirdiği gösterilmiştir (Bhatia ve Bera, 2015). *In vitro* koşullarda kurulan hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin metabolizma hızı, doğal koşullardaki hücrelerden daha yüksek olduğundan sekonder metabolit üretimi için elverişlidir. Ek olarak aseptik koşullarda dış çevresel faktörlerden bağımsız oluşturulan kültürler üretim koşullarının kontrol altında tutulabilmesi bakımından avantajlıdır (Güven ve Gürsul, 2014).

Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak terapötik moleküllerin üretilmesi çok çeşitli avantajlar sağlar. Hücre ya da dokuların büyümesi ve üremesi için kontrollü ve optimize edilmiş koşullar sağlanır. Bu sayede istenmeyen otlar ve bitki patojenleri ile mücadelede kullanılan zararlı herbisit ve pestisitlerin kullanımına gerek olmamaktadır. Bitki doku kültürleri iklim değişiklikleri, coğrafi konum gibi çevresel faktörlere bağımlı değildir (Bhatia ve Bera, 2015). Bitki doku kültürü teknolojileri kullanılarak sekonder metabolitlerin üretimi uzun yıllardır

gerçekleştirilmektedir. Tablo 2.2 de bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretimine yönelik yaklaşımlar verilmiştir (Bhatia and Bera, 2015).

Tablo 2.2: Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretimi için kullanılan teknikler (Bhatia and Bera, 2015).



Bitki hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolizmaya ilişkin maddelerin üretimi ve birikimi iki modelleme üzerinden yorumlanır. Genellikle fazla miktarda sekonder metabolitlerin üretimi için bitki hücre süspansiyon kültürlerinde ‘Antosiyanin tip’ olarak adlandırılan modelleme görülmektedir. Bu tip modelde sekonder metabolizma ürünlerinin üretimi ile üreme arasında negatif ilişki vardır. Logaritmik fazın ortalarından itibaren artan

sekonder metabolitler duraklama fazında en yüksek birikim düzeyine ulaşır (Babaoğlu ve diğ., 2001).

‘Betasiyanin tip’ birikim modelinde ise sekonder metabolit birikimi hücre üremesi ile pozitif yönde ilişkilidir. Bu modelleme tipinde sekonder metabolit birikimi düzeyi hücre bölünmesinde olduğu gibi logaritmik fazda en yüksek değere ulaşır ve sonraki safhalarda düşer. Daha önce de belirtildiği gibi bitki hücre kültürleri yüksek miktarda sekonder metabolit üretimi için potansiyel birer kaynaktır. Bununla birlikte geleneksel tarımsal üretimde de fayda sağlamaktadır. Bu faydalar; hızlı üretim, ucuz öncül maddeler kullanılmasıyla yeni moleküllerin üretilmesi, benzer kalite ve miktarlarda ürünler elde edilebilmesi, ata bitkilerde üretilmeyen moleküllerin üretilmesi, iklim ve çevresel faktörlerden bağımsız olması sayılabilir (Bhatia ve Bera, 2015).

Bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesi üzerinde önemli etkileri olan ve düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olan basit moleküllerdir ve bitkisel sekonder metabolitlerin üretimleri arttırmak için kullanılmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerine verilen reaksiyon bitkinin türüne, yaşına, fizyolojisine vb. değişebilmektedir ve bu moleküllerin sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri ayrıntılı biçimde çalışılmıştır (Khan ve diğ., 2008; Shilpashree ve Rai, 2009; Jamwal ve diğ., 2018).

2.2.1 Bitki Hücre Teknolojisi ve Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki temelli moleküllere olan talebin artmasıyla, büyük ölçekte doğrudan bitkiden ekstraksiyon yapılması zorlaşmıştır. Ayrıca, sekonder metabolitlerin biyosentezi genellikle belirli bir doku ile sınırlıdır ve belirli bir gelişim aşamasında ortaya çıkar. Nadir bulunan veya neredeyse nesli tükenmiş olan yüksek bitkilerden değerli sekonder metabolitlerin elde edilmesi de zordur. Bu nedenle, sekonder metabolitlerin üretimi için *in vitro* bitki doku kültürleri kullanılarak bitkilerden değerli sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretimi oldukça önemli bir alternatif olmuştur. *In vitro* bitki hücre / doku kültürü, yüksek miktarda üretim için kültür koşullarının manipülasyonuna uygulanabilirlik ve istenen ürünün geri kazanımı için daha basit ve daha ekonomik işlemlerin kullanılması açısından avantajlıdır (Narayani ve Srivastava, 2017).

Birçok durumda, *in vitro* kültürler, metabolik olarak daha yetkin oldukları için, tarlada yetiştirilen bitkilere kıyasla yüksek miktarda sekonder metabolit üretimi gösterirler (Nasim ve diğ., 2010; Nagella ve Murthy, 2011).

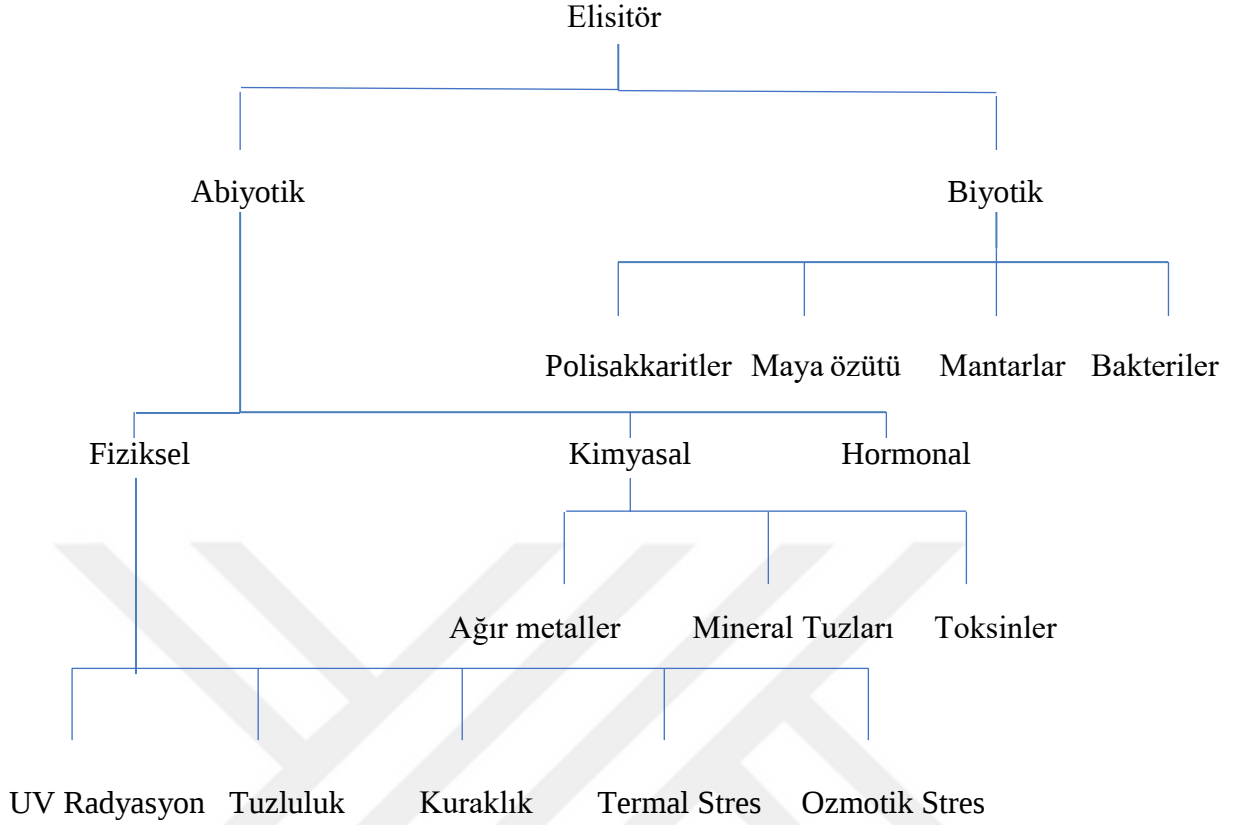
Bunun dışında, normal bitkide genellikle bulunmayan metabolitler, *in vitro* bitki hücre / doku kültüründe bulunabilmektedir. Bu nedenle, son birkaç yılda istenilen sekonder metabolitleri üreten ve yüksek miktarda üretim sağlayabilen hücre kültürlerinin gelişimi önemli ölçüde artmıştır. Günümüzde, mühendislik ilke ve yöntemlerinin dahil edilmesi ile temel *in vitro* teknikleri ticari olarak uygulanabilir teknolojilere dönüştürmüştür. Önemli bir örnek olarak, bitki hücre kültürü teknolojisi ile üretilen ve kanser tedavisinde kullanılan Taxol® (Bristol-Myers Squibb) ilacı verilebilir (Narayani ve Srivastava, 2017).

2.2.2 Elisitasyon

Stres, bitkilerin kimyasal bileşimini ve terapötik aktivitesini belirlemede önemli bir faktördür. İstenilen bir kimyasal yanıtı uyarmak için bitki stres tepkisini ortaya çıkarmak, sekonder metabolizma çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Naik ve Khayri, 2016). Bitki hücre teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla, bitki hücre, doku ve organ kültürleri kullanılarak değerli bileşiklerin *in vitro* üretimi, çok iyi tanımlanmış ve endüstriyel uygulamalar için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Steingroewer ve diğ., 2013).

İyi bilinen verim artırma stratejilerinden biri olan "elisitasyon", genellikle sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılmaktadır (Narayani ve Srivastava, 2017). Bitki doku kültürleri değerli farmasötik ve kemoterapotik moleküller için önemli bir kaynaktır. Elisitör madde uygulamaları kullanılmasından önce sekonder metabolit sentezinde kullanılan yöntemler kullanışsızdı. Ancak, elisitör madde kullanımı sekonder metabolitlerin yüksek miktar ve kalitede üretimi sistemini daha kullanışlı hale getirmiştir. Günümüzde elisitasyon, bu değerli metabolitlerin üretiminde kullanılan en önemli araçlardan biridir (Bhatia ve Bera, 2015).

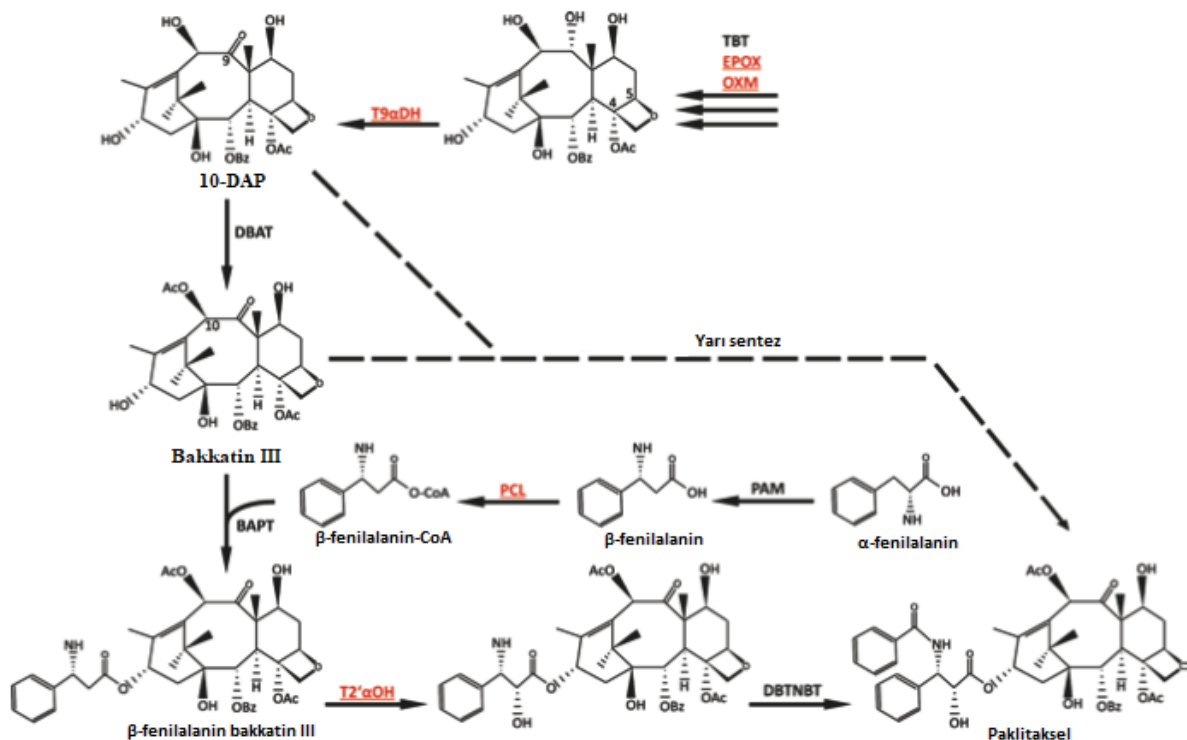
Elisitör maddeler kökenleri ve yapısal karakterleri bakımından abiyotik ve biyotik olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır (Bhatia ve Bera, 2015). Elisitörlerin temel sınıflandırılması Şekil 2.2’te gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Bitki doku kültürü sistemlerinde kullanılan elisitör maddelerin sınıflandırılması (Bhatia ve Bera, 2015).

Biyolojik olmayan kaynaklardan köken alan elisitör maddelere abiyotik elisitörler adı verilir. Fiziksel elisitörler; UV radyasyonu, sıcaklık, mekanik yaralanma gibi dış çevreden maruz bırakılan stres faktörleridir.

Ağır metaller ve inorganik kimyasallar, kimyasal elisitörler kategorisine girer. Ağır metallerin tuzları ile elisitasyonun hücre kültürlerinde büyüme ve sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri gösterilmiştir (Huang ve diğ., 2013). Ayrıca lantanyum ve seryum gibi nadir elementlerin *Taxus* çeşitlerinde paklitaksel gibi sekonder metabolitlerin üretimini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Wu ve diğ., 2001; Narayani ve Srivastava, 2017) Salisilik asit (SA), Metil Jasmonat (MeJA) ve Jasmonik asit (JA) gibi bitki büyüme düzenleyicileri, normal olarak bitki hücreleri tarafından üretilen, sinyal iletim yollarında ve bitkilerin savunma yanıtlarında iş gören moleküllerdir. Bununla birlikte, *in vitro* koşullar altında sekonder metabolit üretiminin uyarılması için kültür ortamına dışarıdan eklendiğinde güçlü elisitörler olarak da kabul edilirler (Narayani ve Srivastava, 2017).



Örneğin *Ambrosia artemisiifolia* bitkisinin patojeni olan *Protomyces gravidus* mantarına ait otoklavlanmış hücre çeperi süzüntüsünün elisitör olarak kullanıldığı bir çalışmada *A.artemisiifolia* saçak kök kültürlerinde tiyarubrin miktarının 3 kat arttığı gösterilmiştir (Bhagwath ve Hjortsø, 2000). Bir diğer yaygın kullanılan elisitör maya ekstaktıdır ve birçok sekonder metabolitin üretimini arttırdığı bilinmektedir.

Örneğin biberiye olarak bilinen *Rosmarinus officinalis* bitkisine aromasını veren rosmarinik asit molekülünün üretiminde maya ekstraktı elisitasyonunun etkisi gösterilmiştir (Sahu ve diğ., 2013). Bakteri hücre duvarı bileşenleri ve hücre homojenatları bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırmak amacıyla kullanılan elisitörlerdir. Örneğin *Pseudomonas syringae* patojeninin bir toksini olan koronatinin (Cor), *Taxus* hücre kültürlerinde MeJa ile elisite edilmiş kültürlerle göre bakkatin III ve paklitaksel miktarını sırasıyla 4,8 ve 3,6 kat arttırdığı gösterilmiştir (Onrubia ve diğ., 2013).

Elisitasyonun başarısı ve etkinliği, hücre hattına, elisitör konsantrasyonuna, ilgi duyulan sekonder metabolite, metabolik yolağın özgüllüğüne, elisitörlerin tipine ve konsantrasyonuna, uygulamanın yapıldığı hücre hattına, belirli bir hücre büyüme döngüsü sırasında muamele süresi ve ekleme zamanı dahil birçok koşula bağlıdır (Bhatia ve Bera, 2015). Hem temel hem de uygulamalı araştırmalarda bitki hücresi / doku kültürü temelli sekonder metabolit üretimi ile ilgili yayınların sayısının hızla artması; bu araştırma alanının büyük potansiyelini ve önemini göstermektedir (Narayani ve Srivastava, 2017).

2.3 FINDIK

Fındık antik çağlardan beri insanlar için önemli bir gıda maddesi olmuştur. M.Ö. 10000 yıllara dair arkeolojik kazılar insan diyetinde fındığın önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Eski Çin kaynaklarında fındığın Tanrı tarafından insanlara bahşedilen meyvelerden biri olduğunu ifade eden yazıtların varlığı bilinmektedir. Eski Türk destanlarında da fındık ağacı tasviri vardır. 20. yüzyılın başlarında dünyada fındık üretiminin yapıldığı tek ülke Türkiye olmuştur. Cumhuriyet döneminin başlarından günümüze kadar da fındığın üretimi, satışı ve kalitesi oldukça önemsenmiştir (T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2020).

Fındık (*Corylus avellana*) Betulaceae ailesine ait kapalı tohumlu bir bitki türüdür. Fındık bitkisinin taksonomik sınıflandırılması Tablo 2.3'te verilmiştir (USDA, 2020). Boyları 15 metreye kadar uzayabilir. Mevsimsel olarak yaprak döker ve 50-70 yıl yaşamaktadır. Ülkemizde çiçeklenme zamanı Mart-Nisan aylarıdır, tohumların olgunlaşması ve hasat dönemi Ağustos-Eylül aylarıdır. Tek evcikli, erkek ve dişi çiçekler aynı bitki üzerinde bulunur (Gallego ve diğ., 2017). Fındık bitkisine ait dişi ve erkek çiçekler Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Nature, 2019a).

Tablo 2.3: Fındık (*Corylus avellana*) bitkisinin taksonomik sınıflandırması.

Alem	Plantae
Üst Şube	Spermatophyta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Hamamelididae
Takım	Fagales
Aile	Betulaceae
Cins	Corylus
Tür	Corylus avellana

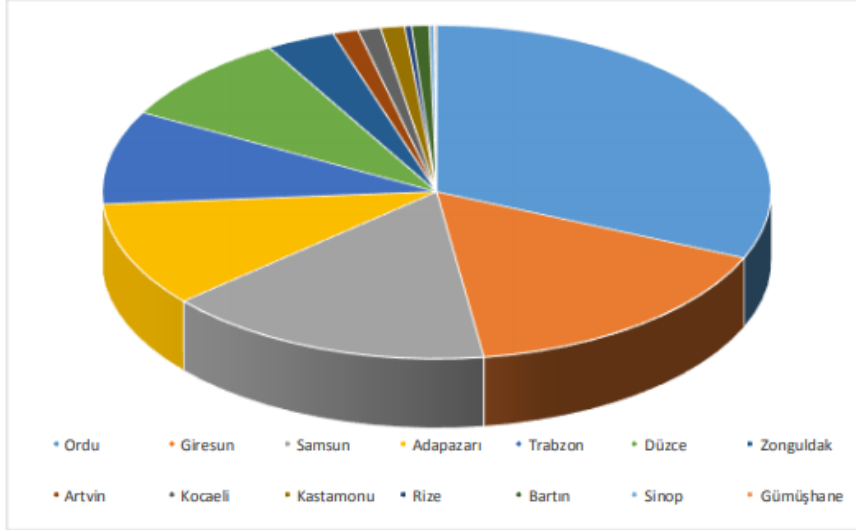
**Şekil 2.4:** Fındık bitkisine ait dişi (A) ve erkek çiçek (B) (Nature, 2019a).

Ülkemiz fındık üretimi ve ihracatı bakımından dünyanın en güçlü ülkesidir. Dünya çapında en yüksek miktarda fındık üretimini yapan ülke Türkiye'dir. Dünya fındık üretiminin ortalama %70'i Türkiye'de yapılmaktadır (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2018). Ülkemizin ardından İtalya, ABD, İspanya ve İran başta olmak üzere birçok ülkede üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkelere göre fındık üretim miktarları Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4: Ülkelere göre dünya fındık üretimi (Ton, T.C. Ticaret Bakanlığı, 2018).

ÜLKE	2018/19
Türkiye	515.000
İtalya	115.000
ABD	50.000
Azerbaycan	50.000
Gürcistan	45.000
İspanya	16.000
Diğer	51.500
Toplam	842.500

Ülkemizde fındık üretimi iklim ve coğrafi koşullar nedeniyle Karadeniz bölgesinde yaygındır. Fındık yetiştiriciliği ise 2014 / 7253 sayılı karar ile 16 şehrimizle sınırlandırılmıştır. Şekil 2.4'te ülkemizde fındık yetiştiriciliği yapılan illeri gösteren daire grafiği gösterilmiştir (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019). Elde edilen mahsulün yaklaşık %60'ı Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, %25'i Batı Karadeniz Bölgesi'nde ve %15'i Orta Karadeniz Bölgesi'nde üretilmektedir (FAO, 2019).

**Şekil 2.5:** Türkiye'de fındık üretiminin illere göre dağılımı (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019).

Fındık, önemli bir ekonomik kaynak olmasının yanı sıra yaygın bir tüketim alanına sahiptir. İçerdiği yağ asitleri, proteinler, önemli mineral ve vitaminler de insan diyeti için oldukça

önemlidir (Karaosmanoğlu ve Üstün, 2017). Tablo 2.5'te 100 g fındığın içerdiği besin maddeleri verilmiştir.

Tablo 2.5: 100 g fındığın besin değerleri (T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019).

	100 gram
Karbohidrat (g)	17
Protein (g)	15
Yağ (g)	61
Lif (g)	10
Kolesterol (mg)	0
Sodyum (mg)	0
Potasyum (mg)	680
Kalsiyum (mg)	114
Vitamin A (mg)	20
Vitamin C (mg)	6
Demir (mg)	5

Ülkemizde 18 fındık çeşidinin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunlar; Yuvarlak Badem, Kan, Foşa, Acı, Yassı Badem, Palaz, Çakıldak, Tombul, Ham, Mincane, Karafındak, Uzunmusa, Kuş, Sivri, Kargalak, Cavcava, Kalıncara ve İncekara'dır (Pelvan ve diğ., 2012; Karaosmanoğlu ve Üstün, 2017).

Dünyadaki toplam üretimin yaklaşık %10'u taze veya kavrulmuş olarak ve %90'ı gıda işleme endüstrisinde (fırıncılık, şekerleme endüstrisi vb.) kullanılmaktadır. Fındık tohumlarının toplanması ve endüstriyel işleme süreçlerinde yeşil yapraklı züruf, sert kabuk ve ince kabuk gibi yan ürünler elde edilir. Bu yan ürünler üreticiler için ekonomik bir problem olmakla birlikte; kalıntıların yakılması nedeniyle çevreye de zarar vermektedir. Çekirdeği kırıldıktan sonra açığa çıkan ligno-selüloz kalıntıları bu atığın çoğunu oluşturur ve boya üretiminde ısı kaynağı olarak kullanılır (Esposito ve diğ., 2017).

Fındıkların hem tohumlarından hem de kabuklarından elde edilen ekstraktlarda antioksidan özelliğe sahip fenolik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Besinlerle polifenollerin alınması genellikle kardiyovasküler, inflamatuvar, mikrobiyal, yaş ilişkili hastalıklar ve kanser

tedavisinde kullanılmaktadır (Esposito ve diğ., 2017). Son yıllarda biyolojik olarak aktif moleküllerin kaynağı olarak ilgi çekmektedir (Rusu ve diğ., 2019).

2.4 TAKSAN TÜREVİ SEKONDER METABOLİTLER

Terpenler en büyük ve çeşidi en zengin sekonder metabolit sınıflarından biridir (Jamwal ve diğ., 2018). ‘Terpen’ terimi, Orta Doğu’daki insanlar tarafından çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan *Pistachia terebinthus* bitkisinin Yunanca adı olan ‘seqébumhoç’tan gelmektedir. Terpenler ve terpenoidler, çok uzun yıllardır insan yaşamı ve kültüründe oldukça önemli olmuşlardır (Pichersky ve Raguso, 2018).

Otlar ve baharatlardaki terpenoidler sıklıkla böcek öldürücü özellikleri sayesinde yiyecekleri korumak amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca geleneksel tıpta ağız yıkamalarında, öksürük ilaçlarında, dezenfektanlarda ve böcek kovucularda sıklıkla kullanılmıştır (Tassou ve diğ., 2012).

Bazı terpenoid bileşikler insanlar tarafından temel bileşikler üretmek için kullanılır. Örneğin vücudumuz için gerekli olan A vitamini bir bitki terpeni olan β -karotenden sentezlenir. Gıdalarda bulunan terpenler insan diyetinde önemli etkilere sahiptir. Biksin, likopen ve astaksantin gibi terpenoid pigmentleri gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Zencefil aromasını zingiberen, greyfurt aromasını nootkaton sağlar. Birçok bitki (limon gibi taze bitki mataryeli) ve baharatlar (safran gibi kurutulmuş bitki mataryeli), uçucu terpenoidler ve alkollü içecekler lezzetlerinin çoğunu terpenlerin varlığına borçludur (Pichersky ve Raguso, 2018).

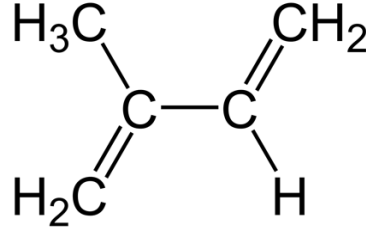
Dioscorea mexicana ve ilişkili türlerin yumrularında yüksek konsantrasyonlarda bulunan diosgein, doğum kontrol hapları ve diğer tıbbi steroidler için progesteronun yarı sentetik sentezi için kullanılmıştır (Djerassi, 1990). Bununla birlikte Taxol® ve vinblastin gibi daha karmaşık terpenoidler çoğunlukla kanser gibi spesifik hastalıkların tedavisinde insan hücre bileşenleri üzerinde kullanılabilecek önemli aktivitelere sahiptir (Julsing ve diğ., 2006; Pichersky ve Raguso, 2018). Tablo 2.6’da medikal olarak kullanılan önemli bitkisel sekonder metabolitler kullanım amaçları ve bitkisel kaynakları ile birlikte verilmiştir.

Tablo 2.6: Medikal olarak kullanılan önemli sekonder metabolitler ve bitkisel kaynakları (Pichersky ve Raguso, 2018).

Sekonder Metabolit	Bitkisel Kaynak	Medikal Kullanımı	Kaynak
Artemisin	<i>Artemesia annua</i>	Anti-malarya	(Baran ve Pietrosluk, 2012)
Kodein	<i>Papaver somniferum</i>	Sedatif	(Tiserat ve Berhow, 2009)
Sekürinin Alkaloidleri	<i>Securinega suffruticosa</i>	Anti-alzheimer	(Raj, D ve diğ., 2015)
Ajmalin	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Anti-hipertansiyon	(Sudha, CG ve diğ., 2003)
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Steroid öncülü	(Ciura, J ve diğ., 2015)
L- efedrin	<i>Ephedra sinica</i>	Günlük takviye	(Lodha, D ve diğ., 2014)
Rosmarinik asit	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Anti-mikrobiyal	(Eknamkul ve Ellis, 1988)
Paklitaksel	<i>Taxus brevifolia</i>	Anti-kanser	(Wani, M ve diğ., 1971)

Bitkilerin çeşitli terpenoidleri sentezleme yeteneklerinin hangi avantajları sağladığı ise önemli bir sorudur. Popüler bir hipotez; bitkilerin yeni bileşikler sentezleme yeteneğinin, düşmanlarındaki değişikliklerle ‘eski’ bileşiklerin artık etkili olmadığına ‘evrimsel silahlanma yarışı’ kapsamında kazanıldığını öne sürmektedir. Bir başka hipotez ise; bu tür bileşiklerin çeşitliğinin, tek bir bileşiğin sağlayamayacağı faydalar sağlayabildiğini ortaya koymaktadır (Pichersky ve Raguso, 2018).

Çeşitliliklerine rağmen, terpenler tanımlandıkları ve kolayca sınıflandırılacakları temel bir ortak özelliğe sahiptir. İzopren kuralı olarak adlandırılan bu ortak özellik 1887’de Otto Wallach tarafından öne sürülmüştür. Bu kural, tüm terpenlerin tekrar eden beş karbonlu izopren birimlerine sahip olduklarını belirtir (Croteau, 1998). Dolayısıyla terpenler, izoprenden türetilen bir yapıya sahip olan bir hidrokarbon bazlı doğal ürünler grubu olarak tanımlanır. Şekil 2.5’te bir izopren ünitesinin molekül gösterimi verilmiştir (Cseke ve diğ., 2006).



Şekil 2.6: İzopren ünitesi.

Diterpenler ($C_{20}H_{32}$) 4 izopren ünitesinden oluşur. Geranilgeranil difosfattan köken alırlar ve temel moleküler iskeletlerinde 20 karbon birimi içerirler. Diterpenler farmakolojik etkilerinin yanı sıra önemli biyolojik özellikleriyle de ilgi görmektedir. Örneğin paklitaksel ve türevleri meme, yumurtalık, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları, AIDS ilişkili Kapoksi sarkoma ve diğer tiplerdeki tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Onrubia ve diğ., 2013; Jamwal ve diğ., 2018).

2.5 TAXOL®

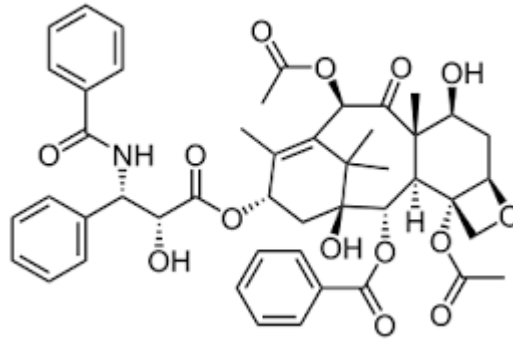
ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Tarım Bakanlığı (USDA), antikanser aktiviteye sahip ve doğal olarak oluşan bileşikleri tanımlamak amacıyla 1960 ve 1981 yılları arasında, 15.000 bitki türünden 115.000 ekstraktı kapsayan bir bitki tarama programı üzerinde çalışmıştır. USDA botanikçisi Arthur Barclay tarafından 1962 yılında Pasifik porsuk ağacı olarak da bilinen *Taxus brevifolia*'dan örnekler alınmış; kabuk, dallar, iğneler ve meyvelerden ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir (Weaver ve Bement, 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda porsuk ağacı kabuğundan yapılan ekstraksiyonda paklitaksel izole edilmiştir. 15.000 bitki özütünün tarandığı programın sonucu olarak klinik kullanıma uygunluğu belirlenen paklitaksel, Taxol® (Bristol-Myers Squibb Company, New York) adıyla piyasaya sürülmüştür (Wani ve diğ., 1971).

Taxol® ilk olarak 1963'te *Taxus brevifolia* kabuğundan izole edilmiştir ve Taxol® ismi, üreticisi olan *Taxus* cinsi bitkinin isminden türetilmiştir. *Taxus* türleri kozalaklı ormanların altında yetişen küçük, yavaş büyüyen, yaprak dökmeyen ağaçlardır. Güney yarımkürede bulunan *Taxus spicata* hariç olmak üzere, dünya çapında, kuzey ılıman bölgelere dağınık dağılmış toplam on bir *Taxus* türü vardır (Wani ve ark., 1971; Gond ve diğ., 2014). Şekil 2.6'da *T. brevifolia* bitkisinin kabuk ve iğne yapraklı meyvesi gösterilmiştir (Nature, 2019b).



Şekil 2.7: Porsuk ağacı (*Taxus brevifolia*) kabuk (A) ve iğne yapraklı meyve (B) (Nature, 2019b).

Paklitaksel 853 Dalton (Da) moleküler ağırlığında, $C_{47}H_{51}NO_{14}$ molekül formülüne sahip bir diterpenoid pseudoalkaloiddir. Beyaz veya kirli beyaz renkli kristal bir toz yapısındadır. Oldukça lipofiliktir, suda çözünmez ve 216-217 °C de erir. UV spektrumunda 273 nm dalga boyunda ışıma gösterir (Liu ve diğ., 2016; Li ve diğ., 2017) Bu hidrofobik özelliği nedeniyle uygulanması, alkol ve hintyağı içeren bir çözelti içerisinde gerçekleştirilir (Seca ve Pinto, 2018).



Şekil 2.8: Paklitaksel molekülü.

Paklitaksel molekülü, bakkatin III adı verilen tetrasiklik bir çekirdek ve bir amid kuyruğundan oluşur (Kasaei ve diğ., 2017). Dört üyeli bir oksetan halkasına bağlı ve karmaşık bir iskelet içeren, ester, keton ve amid fonksiyonlarına sahip bir trisiklik diterpenoiddir (Şekil 2.7) (Bernabeu ve diğ., 2016; Seca ve Pinto, 2018).

Paklitakselin biyosentezi, mevalonat (MVA) yolu ile 2-C-metil-eritritol-4-fosfat (MEP) yolundan elde edilen izopentenil pirofosfattan (IPP) türetilen evrensel bir diterpenoid öncülü

olan geranilgeranil difosfattan (GPP) başlayarak en az 19 enzimle katalize edilir (Roberts, 2007; Gond ve diğ., 2014). Son yıllarda, bilim insanları paklitaksel üretim yolağının her aşamasının anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydetmişlerdir (Howat ve diğ., 2014). Taksadien sentaz (TS) varlığında, geranilgeranil pirofosfat (GGPP); taxa-4 (5), 11 (12) -dien oluşturmak üzere siklize edilir. Ardından paklitakselin tam senteziyle sonuçlanan fonksiyonel yan zincir grupları eklenir (Liu ve diğ., 2016). Biyosentetik yol, plastid, endoplazmik retikulum ve sitosol dahil olmak üzere farklı hücresel bölmelerde bulunan farklı sınıftan enzimlerle yapılır (Zhu ve Chen, 2019).

Taxol® 1993'ten beri satılan ve yaygın olarak erken evre ve metastatik meme kanseri (MBC) tedavisinde kullanılan en aktif kemoterapötik ilaçlardan biridir (Weaver ve Bement, 2014; Seca ve Pinto, 2018). Çok genel bir tanımlama ile hücre bölünmesinde görevli olan mikrotübülleri stabilize ederek hücre döngüsünün durmasına ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açar Schiff ve diğ., 1979; Martín, 2015). Taxol®, Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından son 30 yılın kemoterapi çalışmalarında en önemli gelişme olarak kabul görmüştür (Li ve diğ., 2017).

Paklitaksel, sadece kanser tedavisinde yeni sistemlerinin geliştirilmesi ile değil, diğer antikanser ilaçlarla birlikte uygulanması nedeniyle de ilaç endüstrisinde oldukça önemli bir üründür. Aynı zamanda psoriasis (Ehrlich, 2004), romatoid artrit (Brahn, 1996) ve botulinum nörotoksin inhibe etme (Dadgar ve diğ., 2013) gibi diğer tedaviler için de klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Li ve diğ., 2017; Seca ve Pinto, 2018).

Paklitakselin bir dizi hastalığa karşı güçlü bir ajan olması nedeniyle kullanımı yaygınlaşmıştır. Fakat yaygın kullanımda karşılaşılan en büyük sınırlama, dar kaynak aralığıdır, çünkü *T. brevifolia* ve diğer *Taxus* türleri, çok düşük miktarlarda paklitaksel üretir (Ottaggio ve diğ., 2006). Yüksek Taxol® talebinin karşılamak amacıyla *T. brevifolia*'nın kabuklarından paklitaksel ekstraksiyonu bitkinin önemli ölçüde tükenmesine neden olmuştur. 1990 yılında, ABD İçişleri Bakanlığı'na nesli tükenmekte olan türler listesine *T. brevifolia* eklenmesi için dilekçe verilmiş ve 1992 yılında ağacı korumak için Pasifik Porsuk Yasası kabul edilmiştir (Weaver ve Bement, 2014). Bu nedenle, paklitaksel elde etmek için *T. brevifolia*'nın yapay olarak yetiştirilmesi, ilacın kimyasal sentezi veya yarı sentezi ve biyoteknolojik sentezi dahil olmak üzere farklı yöntemler geliştirilmektedir (Zhu ve Chen, 2019). Bu yöntemler Bölüm 2.7'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Artan paklitaksel talebini karşılamak üzere yapılan çalışmalar yüksek miktarda paklitaksel üretimini sağlamışken, aynı zamanda Taxol®'ün işlevsel olarak geliştirilmesini de mümkün kılmıştır. Bununla birlikte paklitakselin etki mekanizmasının aydınlatılması ile yüksek etkinlikte ve daha az yan etkiye sahip yeni türevler tasarlanmıştır. Nab-paklitaksel, kabazitaksel, dosetaksel ve larotaksel dahil olmak üzere en az dokuz yeni taksoid türevinde ve formülasyonlarında klinik çalışmalar yapılmıştır (Liu ve diğ., 2016; Li ve diğ., 2017).

Paklitakselin çözünmesi için hint yağı türevleri, dosetaksel için polisorbata 80 kullanılmaktadır. Bu çözücüler, uzun süreli periferik nöropati dahil olmak üzere aşırı duyarlılık ve diğer toksisitelerle ilişkilendirilmiştir (Weiss ve diğ., 1990; Martín, 2015). Bu yeni formülasyonların geliştirilmesi, paklitakselin daha doğrudan ve güvenli bir antikanser aktivite için tümör dokusuna yönlenebilmesine ve çoklu ilaç direnci, zayıf sulu çözünürlük, klinik nörotoksikite gibi dezavantajların üstesinden gelinmesini sağlamıştır (Seca ve Pinto, 2018).

Paklitakselin moleküler yapısının ve farmosötik özelliklerinin aydınlatılması ile dosetaksel keşfedilmiştir. 1995'ten bu yana piyasada bulunan ve Taxotere® (Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc., Collegeville, PA) ticari markası altında kullanılan bu yeni ilaç daha az yan etkiye ve iyileştirilmiş farmasötik özelliklere sahiptir (Wen ve diğ., 2016). Meme, yumurtalık, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kansinimleri tedavisinde kullanılan birinci nesil taksanlara aittir ve paklitaksele göre daha uzun bir yarı ömür, daha hızlı hücre alımı ve daha uzun hücre içi tutulum göstermektedir (Crown ve diğ., 2004; FDA, 2013; Seca ve Pinto, 2018).

Paklitaksel ve dosetakselin, meme kanseri (BC) tedavisinde önemli klinik faydaları gösterilmiştir fakat düşük çözünürlükleri nedeniyle spesifik çözücülerin kullanılmasını gerektirir. Örneğin, enjekte edilebilir ilk paklitaksel lesitin / kolesterol lipozomu olan Lipusu® (Luye Pharma Group), yumurtalık, meme, küçük hücreli olmayan akciğer kansinimleri, mide ve baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde 2006 yılından beri başarıyla kullanılmaktadır (Bernabeu ve diğ., 2017). Bu lipozomal formülasyona sahip Lipusu®, paklitaksele benzer antitümör etkiler gösterir, ancak eşit dozda paklitakselde daha düşük toksisite göstermiştir (Xu ve diğ., 2013). Bir diğer örnek; paklitakselin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla geliştirilen ve nab-paklitaksel adı verilen, albümine bağlı bir paklitaksel olan Abraxane® (ABI-007)'dir ve 2005 yılında FDA ve 2012'de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır (FDA, 2009; Rivera ve diğ., 2015; Seca and Pinto, 2018). Albümine bağlı paklitaksel formu olan nab-

paklitaksel çözücü gerektirmez ve paklitakselin terapötik güvenlik aralığını iyileştirmek yani, antitümör aktivitesini arttırmak ve aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi toksisiteleri azaltmak için tasarlanmıştır (Desai N ve diğ., 2006; Martín, 2015).

Kabazitaksel, Jevtana® (Sanofi-Aventis), 2010 yılında FDA tarafından dirençli metastatik prostat kanseri ve dosetaksele veya paklitaksele dirençli tümörlerin tedavisinde kullanılmak için onaylanmıştır (FDA, 2010; Vrignaud ve diğ., 2014). Sahip olduğu yapısal modifikasyonlar ilacın, dosetakselden daha yüksek konsantrasyonlarda hücre içinde birikebilmesini sağlar ve taksana dirençli hastalarda yüksek etkinlik gösterir (Liu ve diğ., 2016; Seca ve Pinto, 2018).

2.6 TAXOL® ETKİ MEKANİZMASI

Hücrelerde bulunan mitotik kontrol noktası, bölünme sırasında meydana gelen her bir çift mitotik için hücrenin her iki kutbunda da sabit bağlantılar yapmasına kadar kardeş kromatidlerin birbirinden ayrılmasını engeller. Bu sayede oluşacak her bir yavru hücrenin kardeş kromatidlerden yalnızca bir kopya almasını sağlar.

Kromatidler iğ mikrotübüllerine, DNA'nın sentromerik bölgelerinde toplanan protein kompleksleri olan kinetokorlarından bağlanır. Mikrotübüllere stabil bir bağlanma yapamamış kinetokorlar, mitotik ilerlemeyi geciktiren bir sinyal iletim yolağını aktive eder (Foley ve Kapoor, 2013). Paklitaksel, bu bağlı olmayan kinetokorların varlığı nedeniyle hücreleri mitozda durdurur (Waters ve diğ., 1998; Weaver and Bement, 2014).

Profaz sırasında mikrotübüller, kromozomları kutuplara doğru çekmek için bir iğ yapısı oluşturur. Daha sonraki aşamalarda, mikrotübüller depolimerize olurlar ve iğ yapısı çözülür. Hem düşük sıcaklıklara hem de kalsiyum iyonlarına maruz kalma, mikrotübüllerin depolimerizasyonunu tetikler. Paklitaksel, mikrotübüllere bağlandığında paklitaksele bağlı mikrotübüller, düşük sıcaklıklar altında veya kalsiyum iyonları ile muamele edildiğinde dahi depolimerizasyona direnir. Bu şekilde, paklitaksel tedavisi tübülün polimerizasyonunu destekler ve mitozun ilerlemesini engeller (Ojedalopez ve diğ., 2014; Zhu ve Chen, 2019). Paklitaksel, tübüline olan bağlanma afinitesi nedeniyle mikrotübül ayrışmasını inhibe ederek kanser hücrelerinin bölünmesini engelleyen önemli bir ilaçtır (Ottaggio ve diğ., 2006). Tübülünün mikrotübüllere bağlanmasını önleyen diğer tübülün bağlayıcı antikanser ilaçların aksine, paklitaksel, tübülünün mikrotübüllere birleştirilmesini teşvik eder ve mikrotübüllerin

ayrılmasını önler, böylelikle hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre bölünmesinin gerçekleşmesini engeller (Weaver, 2014; Zhu ve Chen, 2019).

Tümör immünoterapisi, vücudun bağışıklık sisteminin geliştirilerek tümörlere bağışıklık tepkisinin üretilmesidir. Son zamanlarda klasik ilaçların tümör immünoterapisinde olası uygulamalarına yönelik çalışmalarda ilerlemeler kaydedilmiştir (Zhu ve Chen, 2019). Birçok çalışma, paklitakselin tümör hücrelerini doğrudan öldürmesinin yanı sıra efektör T hücreleri, dendritik hücreler (DC'ler), doğal öldürücü (NK) hücreler, düzenleyici T hücreleri (Tregler) ve makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinin çalışmasında etkili olduğunu göstermiştir (Vassileva ve diğ., 2008). Paklitaksel hücre bölünmesini inhibe eden birinci basamak kemoterapi ilacıdır. Paklitaksel kemoterapisi, tümör hücrelerinde apoptoz oranını arttırabilir, tümör antijenlerini serbest bırakabilir ve antijen sunan hücrelerin (APC'ler) fagositozunu artırabilir. APC'ler proenflamatuar sitokinleri serbestleştirmek için aktive edilir. DC immünoterapi, aktivasyon, modifikasyon ve *in vitro* proliferasyondan sonra hastanın kendi bağışıklık hücrelerini hastaya enjekte etmek için kullanılır, böylece spesifik veya spesifik olmayan bir bağışıklık tepkisi uyatarak tümör hücreleri öldürülür (Zhu ve Chen, 2019).

Paklitakselin Treglerin işlevini inhibe ettiği ve tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçışını tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, immünoterapi ile kombine edilen paklitaksel, tedavinin etkinliğini artırabilir. Klinik olarak, paklitaksel kombine tedavi, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları, yumurtalık kanseri ve diğer malign tümörleri tedavi etmek için kullanılmıştır. III ve IV evre akciğer karsinomu tedavisinde paklitaksel-karboplatin-bevacizumab kullanan klinik çalışmalar mevcuttur (Spigel ve diğ., 2015).

Karboplatin ve paklitaksel kemoterapi ikinci basamak kemoterapi yaklaşımı olarak kullanılır. Karboplatin, T hücresi aktivasyonunu arttırmak için DC'ler ve melanom hücreleri tarafından anlatımı yapılan, ölüm reseptörü-ligand 2'yi (PD-L2) programlayan T hücresi inhibitör molekülünü düzenler (Lesterhuis WJ ve diğ., 2011).

Radyoterapi ile birleştirilen lipozomal paklitaksel ve karboplatinin LSCC ve kontrol edilebilir toksisite üzerinde önemli antitümör etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, lipozomal paklitaksel bazlı kemo-radyoterapinin, lokal olarak gelişmiş LSCC için, özellikle alerjik hastalıklarda güvenli bir tedavi olduğunu göstermektedir. İmmünoterapi halen araştırma

aşamasında olduğundan kanser tedavisinde kullanımı hakkında çok az şey bilinmektedir (Wang ve diğ., 2018).

2.7 TAKSAN TÜREVİ SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİMİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Taxol® esas olarak porsuk ağaçları tarafından üretilmektedir. Bununla birlikte, ekstraksiyonda kullanılacak ağacın kuru ağırlığına göre oldukça düşük bir konsantrasyonda (% 0 ile % 0,069 arasında) paklitaksel elde edilebilir (Wu ve Lin, 2003). Her ne kadar paklitaksel ekstraksiyonu sürecinin verimi arttırılmış olsa da bir hastanın kemoterapisinde kullanılmak üzere 2 g ilaç üretmek için 4 ağaç kullanılması gerekir (Liu ve diğ., 2016).

Orijinal kaynak olan porsuk ağaçlarında Taxol® içeriği çok düşük olduğundan, bu yöntemin sürekli bir şekilde kullanılabilmesi çevresel olarak da uygun değildir (Li ve diğ., 2017). İlaç geliştirme süreçlerinin erken aşamalarında, paklitaksel ekstraksiyonu için ağaçların kabuklarının toplanması, doğal kaynakları tehdit etmiş ve sonuçta tüm dünyada yasaklanmıştır. Örneğin, tüm *Taxus* türleri Çin hükümeti tarafından yayınlanan Ulusal Korunmalı Yabani Bitkiler Listesi'nde (1999) I. dereceden ulusal koruma altına alınmıştır (Gongbao, 2000).

Paklitakselin porsuk ağacı bitkisi hasadıyla elde edilmesinin düşük verimli bir protokol olması ve neden olabileceği ekolojik sorunlar nedeniyle daha sürdürülebilir alternatif yöntemler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Mikroorganizmalar veya bitki hücre kültürleri ile fermantasyon teknolojisi (Gallego ve diğ., 2017) ve sitotoksik olmayan ve çok daha yüksek miktarlarda ve kolaylıkla bulunan iki paklitaksel öncü molekülünü olan bakkatin III (Baloglu ve Kingston, 1999) veya 10-deasetilbakkatin III (Mandai ve diğ., 2000) kullanılarak yapılan yarı sentez başlıca çalışmalardandır. Özellikle yarı sentez yöntemiyle paklitaksel üretimi yaklaşımı, ilaç endüstrisi tarafından kullanılmaktadır (Seca ve Pinto, 2018).

2.7.1 Yapay Kültürleme

Paklitaksel ekstraksiyonunun ekosistemler üzerindeki etkilerini azaltmak için yapay tarım yöntemleri kullanılmıştır. Örneğin, Çin'in Yunnan ve Sichuan eyaletlerinde, ilacın bir diğer kaynağı olarak tanımlanan *Taxus chensensis* dikimi için çalışmalar yapılmıştır (Lou ve diğ., 2011). Bugüne kadar 150'den fazla *T. chinensis* tarlası kurulmuştur. Bu tarlalar bitki yetiştirilmesinde olumlu birer kaynaktır fakat *Taxus* türlerinin yavaş büyümesi ve bitki

yetiştiriciliğinin çevresel faktörlerden yüksek oranla etkilenebilir olması, yöntemin etkinliğini düşürmektedir (Zhu ve Chen, 2019).

2.7.2 Kimyasal Sentez

Paklitaksel oldukça karmaşık bir moleküler yapıya sahip olup kimyasal sentezi çok karmaşıktır. Sentez süreci toplam 25-40 adım gerektirir. Holton ve arkadaşları paklitakseli kimyasal yolla 1994 yılında başarıyla sentezlediklerini bildirmiş olsalar da (Holton ve diğ., 1994), reaksiyon koşullarının kontrol edilmesinin son derece zor olması nedeniyle kimyasal sentez yoluyla ticari üretimi henüz mümkün değildir. Ayrıca, sentez sırasında büyük miktarda toksik yan ürün meydana gelir ve üretim maliyeti son derece yüksektir (Zhu ve Chen, 2019).

2.7.3 Kimyasal Yarı Sentez

Paklitaksel sentezlemek amacıyla ilk kimyasal yarı sentez 1988'de, 10- deasetilbakatin III (10-DAB) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Denis ve diğ., 1988). Paklitaksel, 10-deasetilbakatin ve bakkatin III gibi *Taxus* bitkilerinde bulunan analogları veya öncülerinin dönüştürülmesi yolu ile üretilir. Bu reaksiyon tipik olarak katalitik miktarda potasyum ferrisiyanit veya N-metilmorfolin içeren bir sitrik asit ve ayrıca bir N-oksit rejenerasyon reaksiyonunu gerektirir. Bu yöntem ile hem paklitaksel sentezi sırasında üretilen toksik yan ürünlerin düzeyi azaltılmış hem de maliyet düşürülmüştür (Zhu ve Chen, 2019).

2.7.4 Metabolizma Mühendisliği

Kimyasal sentez ve yarı kimyasal sentez ile paklitaksel üretim yöntemlerine alternatif olarak biyosentetik enzimlerin klonlanması çalışmaları yapılmaktadır. Taxol® biyosentez yolağında görevli önemli enzim ve moleküllerin mikroorganizmalara aktarımı başta olmak üzere farklı metabolizma mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır. Örneğin, paklitakselin biyosentetik yolunun bir kısmı *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* mikroorganizmalarına ve bazı bitki sistemlerine aktarılmıştır. IPP izomeraz, GGPP sentaz ve TS enzimlerinin, *E. coli*'de fazla miktarda anlatımı sağlanmıştır (Huang ve diğ., 2001). Son yıllarda, en yüksek paklitaksel verimini elde etmek için mikroorganizmalarda çalışmalar yapılmaktadır (Biggs ve diğ., 2016).

Taxol® biyosentez yolağında birçok enzim görev almaktadır. Bu enzimleri üretmek, hücresel ve moleküler seviyelerde daha yüksek paklitaksel elde etmek için genetik ve metabolik mühendislik çalışmaları devam etmektedir (Zhu ve Chen, 2019).

2.7.5 Hücre Kültürleri

Bitki hücre kültürleri, paklitaksel ve ilgili bileşiklerin stabil bir şekilde üretimi için en umut verici yaklaşımlardan biri olarak kabul edilir. Farklı *Taxus* türlerinden hücre kültürleri üretmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Ketchum ve Gibson, 1996; Ottaggio ve diğ., 2006). *Taxus* bitkilerinin, organlarının ve dokularının farklı kısımlarında bulunan paklitaksel miktarları büyük ölçüde farklıdır; bu nedenle *Taxus* türlerine ait doku ve organ eksplantları hedeflenmiş bir şekilde kültürlenmiştir. 1989 yılında *T. brevifolia* hücreleri ilk kez başarılı bir şekilde kültüre edilmiştir. İki yıl sonra *T. brevifolia* kültürleri ekstraksiyon başına 1-3 mg / L paklitaksel elde edilmiştir (Tabata, 2006). O zamandan beri, *T. baccata*, *T. yunnanensis*, *T. cuspidate*, *T. chinensis*, *T. canadensis* ve *T. globosa* gibi birçok *Taxus* türünün *in vitro* kültürlenmeye iyi yanıt verdiği gözlenmiştir (Ciddi ve diğ., 1995; Zhu ve Chen, 2019).

Taxus hücre kültürleri kurulmasının birçok avantajı vardır. Yabani bitkilerden farklı olarak kültürler hava, mevsimsel değişiklikler ve çevre kirliliğinden etkilenmez. *Taxus* hücrelerinin kültürlenmesi aynı saflıktaki paklitakselin sürekli üretimine izin verir ve kültürler yenilenebilir, çevre dostu ve doğal kaynaklardan bağımsızdır. *Taxus* hücrelerinin kültürlenmesi, özellikle verimi artıran metabolizma ve genetik mühendisliği teknikleriyle birlikte paklitaksel elde etmenin önemli bir yolu haline gelmiştir. Bununla birlikte, *Taxus* hücrelerinin kültürlenmesi ile ilgili çeşitli zorluklar da vardır. Kültürleme; yavaş hücre büyümesi, stres faktörü üretimi, hücre toplanması, yüksek maliyetler gibi etmenler ile olumsuz etkilenebilir (Zhu ve Chen, 2019).

In vitro koşullar altında *Taxus* türlerinden üretilen Taxol® miktarı hala sınırlıdır ve maliyeti oldukça yüksektir. Ayrıca porsuk ile ilişkili Taxol® üreten endofitik mantarların izolasyonu ve yetiştirilmesi üzerine de çalışmalar yapılmıştır ancak Taxol® verimi bitkiye göre nispeten çok küçüktür (Ottaggio ve diğ., 2006).

Taxus türlerine ek olarak, fındık (*Corylus avellana*), paklitaksel üreten bir diğer bitki olarak tanımlanmıştır (Hoffman ve diğ., 1998). Türkiye’de yetişen fındık çeşitlerine ait farklı dokulardan yapılan analizler de benzer şekilde paklitaksel türevi moleküllerin üretildiğini göstermiştir (Kutlutürk, 2019). Fındık hücre kültürleri yoluyla paklitaksel üretmenin en büyük

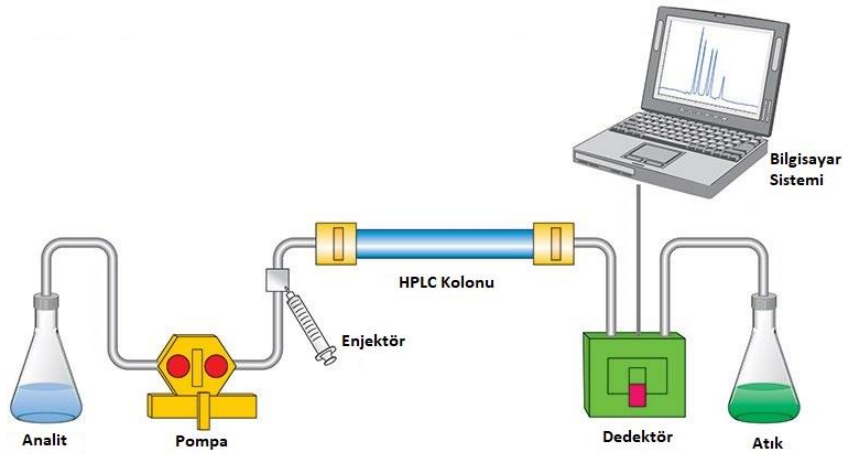
avantajı, bulunduğu yaygın olarak erişilebilir olması ve *in vitro* koşullarda yetiştirilmesinin daha kolay olmasıdır (Gallego ve diğ., 2015). *C. avellana*'nın *in vitro* kültürlerinin paklitaksel üretimi için umut verici ve daha ucuz bir kaynak olabileceği belirtilmektedir (Gallego ve diğ., 2017; Salehi ve diğ., 2017).

2.8 YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Kromatografi, belirli maddelerin bir hareketli faz aracılığıyla katı veya sıvı bir durağan fazda hareket etmesi temeline dayanan bir ayırım yöntemidir. Bu yöntem ayrılacak moleküllerin dağılma, tutulma, afinite gibi özelliklerinden etkilenir. Bu özelliklerdeki farklılıklar moleküllerin kromatografi sisteminden ayrılma sürelerinde değişikliklere neden olur (Temizkan ve Arda, 2018).

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), günümüzde oldukça geniş bir alanda kullanılan analitik kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde sıvı çözücü içerisinde çözünmüş moleküllerin durağan faz ile etkileşime girmesi ve çözücü içerisindeki moleküllerin yüksek basınçla itildiği kolondan, farklı sürelerde çıkması ile ayrılması esas alınır.

Esas ayırım kolon içerisinde gerçekleşmektedir. Burada bulunan durağan faz μm boyutlarındaki partiküllerden meydana gelir. Bu nedenle gerekli yüksek basınç sağlanmadıkça kolon içerisinde akışkanlık oldukça azdır. Ayırımın sağlanabilmesi için çözücünün ihtiyaç duyduğu yüksek basınç pompa ve supap sistemleri ile oluşturulur. Bu yöntemde kolon içerisindeki partikül boyutunun oldukça küçük olması ayırımın spesifikliği ile ilişkilidir. Çözücünün kolon içerisinden akışında yüksek basınç kullanılması tekniğin ayırım gücünün artmasını sağlar, işlemin tamamlanma süresini kısaltır. Geleneksel kromatografi yöntemlerinde ise çok daha düşük hassasiyette analizlerin tamamlanması çok daha uzun süreler almaktadır (Temizkan ve Arda, 2018). HPLC cihazı temel elemanları Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9: HPLC sistemi.

HPLC sistemi pompa, örnekleyici, kolon ve dedektör olmak üzere dört temel bileşenden meydana gelir. Ayrımı gerçekleştirmek istenilen moleküller analit olarak adlandırılır ve hareketli fazı oluşturur. Analizi etkileyen birçok etmen olduğu gibi çözücü tipi ve pH yapılan analizi doğrudan etkiler. Bu nedenle kullanılacak olan çözücü tipi oldukça önemlidir. Analitin çekilip esas ayırımın gerçekleşeceği kolona yüksek basınç ile gönderilmesinde pompa iş görür. Analitin kolondan geçeceği akış hızı ve uygulanacak basıncın ayarlanması da pompa ile sağlanır. Pompalar kullandıkları akış hızlarına göre Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif pompalar olarak sınıflandırılır. Mobil faz adedine bağlı olarak tek kanallı, gradient ve çok kanallı pompalar tasarlanabilir. Örneğin gradient pompa kullanılan bir çalışmada analitin değişik zamanlarda ve oranlarda çalışılması mümkündür. Bu çalışmanın spesifikliği ve süresini etkileyebilir. Örnekleyici, analizi yapılacak çözeltinin HPLC kolonuna iletilmesini sağlar. Manuel ve otomatik örnekleyici olmak üzere iki tipe ayrılır. Manuel modellerde analitin kolona gönderilmesi bir şırınga ile sağlanırken otomatik modellerde bu cihaz tarafından yapılabilmektedir. Kolon, sistemde moleküllerin ayrımının gerçekleştiği ünedir. Çelik ve cam gibi malzemelerden üretilir ve polimer veya silika gibi dolgu malzemeleri ile doldurularak durağan faz oluşturulur. Gelişen teknoloji ile silika dolgulu kolonların yerini çok küçük gözenekli polimer kolonlar almaya başlamıştır.

Çok küçük boyutlu partiküller kullanılmasıyla ayırımın kalitesinin yüksek olması, analitin kolondan geçirilmesine olanak tanıyan yüksek basıncın ve akış hızının kontrol edilebilir olması, küçük miktarlarda numunelerde dahi başarıyla analiz yapılabilmesi, yüksek doğruluk ve düşük

analiz süresi gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu nedenle gıdalardan herbisit ve pestisitlere, uyuşturuculara, biyokimyasallardan ilaçlara varan geniş bir alanda önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır (Synder, 2000).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 BİTKİ MATERYALİ

Çalışma kapsamında kullanılan 5 farklı çeşit ve 2 farklı genotipe ait fındık tohum materyali (Sivri Yağlı Fındık, Sivri Fındık, Tombul Fındık, Çakıldak Fındık, Palaz Fındık, Ham Fındık, Kalıncara Fındık, T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2020) Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden Prof. Dr. Ümit SERDAR' dan Eylül 2017'de temin edilmiştir. Çalışma süresince fındık çeşitleri 4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2 BİTKİ YETİŞTİRİLMESİ

Bitkilerde hücre kültürleri kurmak amacıyla birçok farklı yöntem uygulanmaktadır. Bitkisel sekonder metabolitlerin üretimi amacıyla kurulan hücre kültürlerinde kültürdeki hücrelerin stabilitesi oldukça önemlidir. Bu nedenle kök kültürleri sekonder metabolit üretimi için kullanılan alternatiflerden biridir. Çalışmada kullanılan çeşitlere ait bitki kültürleri daha önce kurulmadığından, başlangıçta bölünme yeteneği yüksek embriyolar kullanılarak *in vitro* koşullarda bitkicikler yetiştirilmiştir. Elde edilen steril bitkicikler kök kültürleri kurulmasında kullanılmış ve kurulan kök kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik elisitasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Besiyeri Hazırlanması

Bitki yetiştirilmesi amacıyla MS (Murashige ve Skoog) besiyeri kullanıldı. 1 litre MS besiyeri hazırlanması için 4,4 gr MS tuzu (Sigma, M5519) ve 30 gr sukroz (Sigma, 84097) 800 mL dH₂O da magnetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. 5N sodyum hidroksit (Merck, 1.06462.1000) çözeltisi kullanılarak pH 5,7- 5,8 aralığında olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim distile H₂O ile 1000 mL ye tamamlandı. Besiyeri içeriğine katılaştırıcı olarak 8 g/L agar (Sigma, A1296) eklendi. Hazırlanan besiyerleri 121 °C de 15 dakika 1 atm basınçta otoklavda steril edildi. MS besiyeri bileşenleri Tablo 3.1'de verilmiştir (Sigma, 2020).

Sterilizasyonun ardından besiyerleri ~60 °C'ye kadar soğutuldu ve son konsantrasyonu 1 mg/L olacak şekilde üreticiden temin edilen steril MS vitamini (Sigma, M3900) eklenerek plastik Magenta kaplarına döküldü. Soğuyup katılaştıran besiyerleri, parafilm (Sigma, Katalog No: P-7793) ile kapatılarak kullanılıncaya kadar 4 °C sıcaklıkta buzdolabında muhafaza edildi.

Tablo 3.1: Murashige ve Skoog besiyeri bileşenleri (Murashige and Skoog, 1962).

Besiyeri İçeriği	Mg/L
Amonyum nitrat	1650,0
Borik asit	6,2
Kalsiyum klorür	332,2
Kobalt klorür.6H ₂ O	0,025
Küprik sülfat.5H ₂ O	0,025
Na ₂ -EDTA	37,26
Ferrik sülfat.7H ₂ O	27,8
Magnezyum sülfat	180,7
Manganez sülfat.H ₂ O	16,9
Molibdik asit.2H ₂ O	0,025
Potasyum iyodür	0,83
Potasyum nitrat	1900,0
Potasyum fosfat	170,0
Çinko sülfat.7H ₂ O	8,6

3.2.2 Yüzey Sterilizasyonu ve Tohum Ekimi

Steril fındık bitkiciklerinin elde edilmesi amacıyla kullanılan fındık tohumlarının yüzey sterilizasyonu için Gallego ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan yöntem değiştirilerek uygulandı (Gallego ve diğ., 2015). Buna göre, tohumlar bir beher içinde ~1 saat akan musluk suyunda yıkandı, ardından laminar hava akımlı steril kabinde steril bir fındık kıracağı yardımıyla sert dış kabukları kırılarak uzaklaştırıldı. Kabuksuz tohumlar %70'lik etanol bulunan bir beherde 30 saniye bekletildi, ardından %3 ticari çamaşır suyu ve birkaç damla Tween 20 (Sigma, P1379) içeren diğ er bir behere aktarıldı ve 30 dakika bekletildi. Yıkama için tohumlar, içerisinde steril distile H₂O bulunan beherlere ardışık olarak 3 kez aktarıldı. Ardından tohumlar absolut etanole daldırılıp çıkartıldı ve durulama için içerisinde steril distile H₂O bulunan beherlere ardışık olarak aktarıl arak 3 kez yıkandı. Yıkamanın ardından steril cam Petri kaplarının içerisindeki steril filtre kağıtlarına alınarak fazla su uzaklaştırıldı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış steril tohumlar Magenta kaplarına ekildi. Kaplar parafilm ile

kuşatılarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux koşullarını sağlayan bitki büyütme kabini içinde bitki gelişimi gözlenene kadar inkübe edildi (Sanyo, MLR-352H).

3.3 KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

3.3.1 Kallus Oluşturma

Kallus oluşumunun uyarılması ve besiyerlerindeki farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarının kallus oluşum frekansına olan etkisinin hesaplanması amacıyla kallus kültürleri 3 farklı MS temelli besiyeri koşulunda kuruldu. Bu amaçla kallus oluşumunun uyarılmasında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri 2-4 diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), 6-benzilamino pürin (BAP) ve Kinetin (KİN) olarak belirlendi.

Kallus kültürlerinin kurulması amacıyla Bölüm 3.2.1’de belirtilen biçimde MS besiyeri hazırlandı. Sterilizasyonun ardından besiyerleri $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ye kadar soğutuldu ve son konsantrasyonu 1 mg/L steril MS vitamini, son konsantrasyonları 2,4-D için 2 mg/L, KİN için 0,4 mg/L ve 1,6 mg/L, BAP için ise 0,2 mg/L olacak şekilde steril besiyerine uygun miktarlarda eklendi ve plastik Magenta kaplarına döküldü. Soğuyup katılaştıran besiyerleri Parafilm (Sigma, Katalog No: P-7793) ile kapatıldı. MS besiyeri vitamin çözeltisi olan MS vitamini (Sigma, M3900) ve kallus oluşumu deneylerinde kullanılan 2,4-D (Sigma, 40330), BAP (Sigma, B3274), ve KİN (Sigma, K3253) bitki büyüme düzenleyicileri steril çözeltiler halinde üretici firmadan elde edildi.

Fındık tohumlarının yüzey sterilizasyonu Bölüm 3.2.2’de tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi. Bu şekilde steril edilen tohumlar, içerisinde steril filtre kağıtları bulunan cam Petrilere alınarak fazla suları uzaklaştırıldı ve bistüri yardımı ile kotiledon kısımları kesilerek olabildiğince azaltıldı. Embriyoyu da içerecek şekilde küçültülmüş tohumlar $\sim 2-3$ cm büyüklüklerde olacak şekilde parçalara ayrıldı. Eksplantlar, kesik yüzeyleri kallus oluşumunu uyarıcı bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş besiyerine temas edecek şekilde, içerisinde katı besiyeri bulunan her Petri kabına beşer parça olacak şekilde ekildi. Petri kapları, parafilm ile kuşatılarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux koşullarını sağlayan bitki büyütme kabini içinde inkübe edildi (Sanyo, MLR-352H).

3.3.2 Kallus Oluşum Frekansının Hesaplanması

Kallus kültürleri, eksplant ekimini takiben 30. günde kallus oluşturma frekansının belirlenmesi amacıyla gözlemlendi. 30. gün sonunda her çeşit ve genotip için % kallus frekansları Denklem 3.1'e göre hesaplandı.

$$\% \text{ Kallus Frekansı} = \frac{\text{Kallus sayısı}}{\text{Eksplant sayısı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ KURULMASI

Katı besiyeri ortamında üretilen Kalınkara çeşidine ait 30 günlük kalluslardan hücre süspansiyon kültürlerinin kurulabilmesi için canlılığı yüksek, kolay ufalanabilir olanları seçildi. Yaklaşık 5g ağırlığındaki kalluslar steril bir cam Petri üzerinde pens yardımıyla ufalandı. İçerisinde 2,4-D'nin 2 mg/L ve BAP'ın 0,2 mg/L konsantrasyonlarını içeren 50 ml sıvı MS besiyeri bulunan 250 ml'lik Erlen Mayerlere aktarıldı. Kültür kapları çalkalayıcı inkübatörde (Labnet, 211DS) öncül hücre süspansiyon kültürlerini oluşturmak üzere inkübe edildi. Steril kabin içerisinde yaklaşık 1 saat bekletilerek hücre kitlesi çöktürülmüş 30 günlük öncül kültürlerin yüzeye yakın kısmından 30 mL besiyeri, steril bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Yerine yukarıda içeriği verilen 30 mL taze besiyerleri eklendi. Bu şekilde ardışık üç alt kültürleme yapıldı. Bu öncül kültürler hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması için kullanıldı. Hücre süspansiyon kültürleri 120 rpm, 25 °C de karanlıkta 30 gün süre ile çalkalayıcıda inkübe edildi.

MS besiyeri varlığında Magenta kaplarında çimlendirilen tohumlardan Tombul fındık çeşidine ait yetiştirilen bitkicik kökleri öncül hücre süspansiyon kültürleri kurulması amacıyla seçildi. Tohum ekimini takiben 60 günlük steril fındık bitkiciğinin kök yapısı, içerisinde 2,4-D'nin 2 mg/L ve BAP'ın 0,2 mg/L konsantrasyonlarını içeren 50 mL sıvı MS besiyeri bulunan 250 mL'lik Erlen Mayerlere aktarıldı. Kültür kapları çalkalayıcı inkübatörde (Labnet, 211DS) öncül hücre süspansiyon kültürlerini oluşturmak üzere inkübe edildi. Kalınkara fındıkta yapıldığı gibi 30 günlük kültür süresinin sonunda öncül hücre süspansiyon kültürleri steril kabin içerisinde 1 saat bekletilerek içerdikleri hücre kitlesi Erlen Mayer tabanına çökmesi sağlandı. Ardından steril pipet yardımı ile yüzeye yakın bölgeden 30 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı ve 30 mL taze besiyeri eklendi. Bu şekilde ardışık üç alt kültürleme yapıldı. Bu öncül kültürler hücre

süspansiyon kültürlerinin kurulması için kullanıldı. Hücre süspansiyon kültürleri 120 rpm de karanlıkta 30 gün süre ile çalkalayıcıda 25 °C de inkübe edildi.

Kültürleme süresince hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin canlılığındaki değişimi dolayısıyla kültürün fizyolojik durumunu takip etmek amacıyla kültürün başlatıldığı günden itibaren her 5 günde (0. Gün, 5. Gün, 10. Gün, 15. Gün, 20. Gün, 25. Gün, 30. Gün) süspansiyon kültüründen 1'er mL örnek alındı ve bir santrifüj tüpü içerisinde 2 µL %1'lik Evan's Blue boyası ile karıştırılarak 10 dakika bekletildi. Süre sonunda bu karışımdan alınan 100 µL'lik örnekler Thoma Lamı'na (Brand, BR718005) aktararak ışık mikroskobunda (Leica, DM1000) boyanma özellikleri dikkate alınarak (mavi boyanan hücreler ölü, şeffaf görünen hücreler canlı) hücre sayımı yapıldı. Hücre boyamaları için kullanılan %1'lik Evan's Blue solüsyonu 0,1 g Evan's Blue boyasının (Sigma, E2129) 10 mL distile H₂O ile çözdürülmesi ile hazırlandı. Solüsyon 0,22 µm por çaplı Milipore filtreden (Milipore, SLMP25SS) geçirilerek steril edildi.

Thoma lamı ile hücre sayımında, Evan's Blue boyası ile boyanan ve boyanmayan hücre sayılarına göre kültürlerin % Hücre Canlılığı;

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Boyanmayan Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.2)$$

denklemine göre hesaplandı (Denklem 3.2).

3.4.1 Üreme Eğrileri Oluşturulması

Hücre kültürlerinin üreme davranışlarının belirlenebilmesi ve sekonder metabolizma uyarıcı elisitör madde uygulamasının doğru zamanda yapılabilmesi için hücre kültürlerinin üreme eğrileri çıkartıldı. Üreme eğrilerinin çıkartılmasında Thoma Lamı ile hücre sayımı, yaş ve kuru ağırlık ölçümleri yapıldı.

3.4.1.1 Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

Hücre süspansiyon kültürleri, kültürleme süresinin sonuncu günü olan 30. günde altkültürlendi. Hücre süspansiyon kültüründeki hücrelerden, hücre sayısının belirlenmesi için örnek toplandı. Bu amaçla hücre canlılığının belirlenmesi deneylerine paralel olarak kültürün başlatıldığı günden itibaren her 5 günde süspansiyon kültüründen alınan 100 µL örnek Thoma Lamı üzerine alınarak ışık mikroskobunda hücre sayımı yapıldı.

1mL'deki hücre sayısı,

$$\text{Hücre Sayısı / mL} = (\text{Sayılan hücre sayısı}) \times (\text{Sulandırma faktörü}) \times (10^4) \quad (3.3)$$

denklemine göre hesaplandı (Denklem 3.3).

3.4.1.2 Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümleri

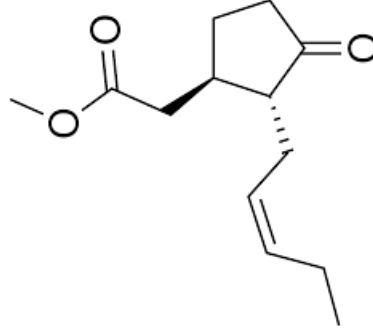
Hücre süspansiyon kültürlerinin 0., 5., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde 5 mL hücre süspansiyon kültürü örnekleri önceden boş ağırlığı bilinen falkon tüplere alındı. 9500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve yaş pelletin ağırlığı tartıldı. Yaş ağırlığı tartılan pellet 60 °C de 48 saat kurumaya bırakıldı. Tartılarak kuru ağırlık ölçümleri yapıldı.

3.5 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE ELİSİTASYON UYGULAMALARI

Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemler ile üreme eğrileri çıkartılan hücre süspansiyon kültürlerinde taksan türevi sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak amacıyla logaritmik üreme fazının ortasına karşılık gelen günde elisitasyon uygulaması yapıldı. Elisitör madde olarak Metil Jasmonat (Sigma, 392707) ve Fenilalanin (Sigma, P1751) kullanıldı.

3.5.1 Metil Jasmonat Elisitasyonu

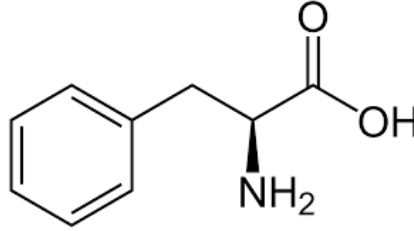
Elisitör uygulaması için ticari olarak satın alınan Metil Jasmonat (MeJa, %95) etanol içerisinde çözündürülerek, 100 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı ve 0,22 µm por çapında Milipore filtreden geçirilerek steril edildi. Stok çözeltiden, son konsantrasyon 100 µM olacak miktarda ekleme yapılarak hücre süspansiyon kültürlerinin logaritmik evresinin ortasına gelen günde elisitasyon uygulaması gerçekleştirildi. Şekil 3.1'de Metil Jasmonat'ın kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 3.1: Metil Jasmonat (MeJa)'ın kimyasal yapısı.

3.5.2 Fenilalanin Elisitasyonu

Fenilalanin (Phe) elisitörü uygulaması için ticari olarak satın alınan Fenilalanin distile su içerisinde çözdürülerek 100 mM konsantrasyonda stok fenilalanin solüsyonu hazırlandı ve 0,22 µm por çapında Milipore filtre kullanılarak steril edildi. Hazırlanan 100 mM konsantrasyondaki solüsyon kullanılarak, son konsantrasyon 3 µM olacak şekilde hücre süspansiyon kültürlerine elisitasyon uygulaması gerçekleştirildi. Şekil 3.2'de Fenilalanin'in kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 3.2: Fenilalanin (Phe)'in kimyasal yapısı.

3.6 YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Hücre süspansiyon kültürlerinde taksan türevlerinin kalitatif ve kantitatif analizi HPLC metodu kullanılarak yapıldı.

3.6.1 Fındık Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Taksan Molekülleri Ekstraksiyonu

Bu tez çalışmasında Kalıncara ve Tombul fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde taksan türevi diterpen alkaloidlerin tespit edilmesi amacıyla Gallego ve arkadaşları tarafından

geliştirilen ekstraksiyon yöntemi kullanıldı (Gallego ve diğ., 2015). Toplam taksanların ekstraksiyonu liyofilize edilmiş, 30 günlük hücre süspansiyon kültürü içeriğinden yapıldı. Hücre dışı (hücrelerden kültür sıvısına salınan) taksanların ekstraksiyonunda doğrudan hücre süspansiyon kültürlerinin besiyeri sıvısı kullanıldı. Hücrelerden kültür sıvısına salınan taksanların analizi tez çalışmasının devamında ‘hücre dışı’ olarak ifade edilecektir.

3.6.1.1 Liyofilizasyon

Kültürlerde bulunan toplam taksanların ekstraksiyonu için hücre süspansiyon kültürü örneklerinin tamamı öncelikle -80 °C’de donduruldu. Kültür içeriğinde bulunan suyun uçurulması için örnekler -56 °C’de 48 saat liyofilizatör (Christ, 1-2LDPlus) kullanılarak kristalize edildi.

3.6.1.2 Toplam Taksan Ekstraksiyonu

50 mg liyofilize edilmiş örnek 1 mL %90 metanol: su (v/v) eklenerek 1,5 mL lik santrifüj tüplerine alınarak cam bilyeler ile ekstrakte edildi. Hücreler 2 dakika süre ile 30 Hertz (1/s) de Mixer Mill (Domel Tehtnica, MillMix 20) kullanılarak parçalandı. Tüpler 10 dakika 15000 x g de santrifüj edildi ve metanol ekstraktı yeni tüpe aktarıldı. Pellet aynı protokol ile ikinci kez ekstrakte edildi. Metanol ekstraktları 8 mL n-hekzan ile kısa süre vorteksenerek yıkandı. Karışım 20 dakika 2500 x g’de santrifüj edildi. Sıvı faz yeni tüpe aktarıldı ve 4 mL diklorometan ile ikinci kez ekstrakte edildi. Organik faz toplandı ve evaporore (Savant, VLPI 20) edildi. Evaporasyondan geriye kalan kalıntı, analizlerde kullanılmak üzere 1 mL metanolde çözüldü. Analiz gerçekleştirilene kadar örnekler 4 °C’de bekletildi.

3.6.1.3 Hücre Dışı Taksanların Ekstraksiyonu

Hücre dışına salınan taksanların analizi için doğrudan 30 günlük Kalıncara hücre süspansiyon kültürlerinin besiyeri örnekleri kullanıldı. Çalkalanan kültürlerden homojen bir şekilde yaklaşık 10 mL kültür materyali 15 mL’lik falkon tüplere alındı ve 9500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faza ait 4 mL’lik örnekler 1 mL diklorometan ile ekstrakte edildi, tüpler elde ters düz edilerek 30 saniye karıştırıldı ve 1 saat ultrasonikasyon (Ultraclear Industrial CO., 500 HT) uygulandı. Organik faz toplandı. Evaporasyon ve kalıntıları çözme Bölüm 3.6.1.2’de belirtildiği şekilde yapıldı.

3.6.2 HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) Analizi

Hazırlanan Kalıncara ve Tombul fındık hücre süspansiyon kültürü ekstraktlarının taksan türevi diterpen alkaloidlerce içeriğinin analiz edilmesi için HPLC cihazı (The Shimadzu CBM-20A/CBM-20 Alite) ve NOVA Spher 100 Phenyl- Hexyl C18 kolonu (250 mm X 4.6 mm, 5 µm parçacık boyutu) kullanıldı. Analizler Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

HPLC analizlerine başlanmadan önce kullanılan kolon (C18) yıkandı. Ardından şartlama işlemi yapıldı ve standart çözeltilerin analizleri yapıldı. Yıkama, şartlama ve analiz işlemlerinin koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: HPLC analizinde kullanılan kolonun (C18) yıkama, şartlama ve analiz koşulları.

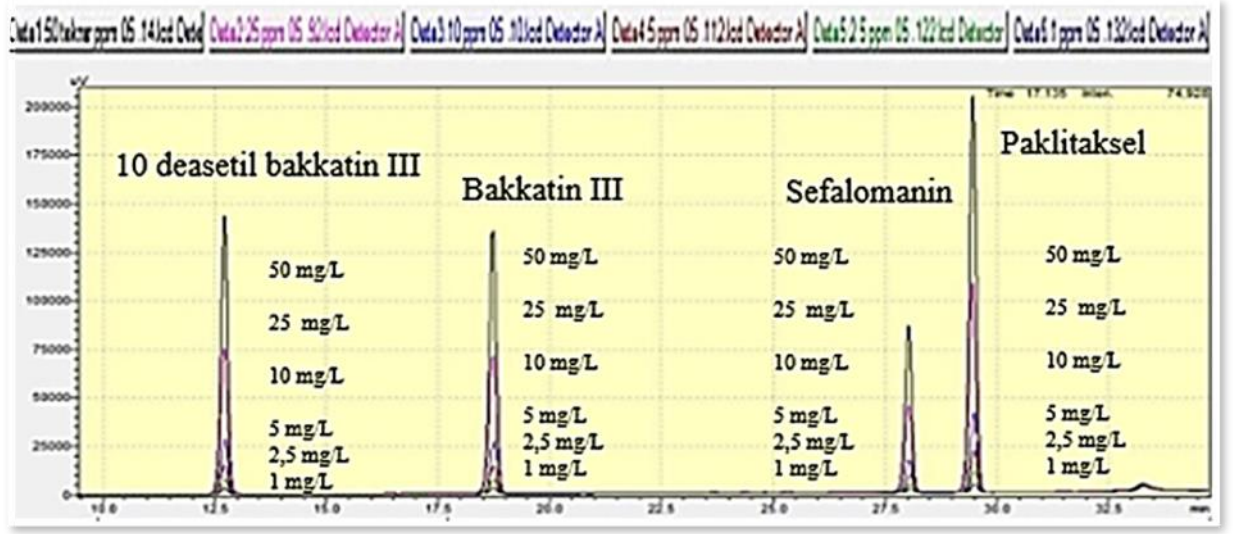
Yıkama	Şartlama	Analiz
Süre: (15.01 dk)	(15.00 dk)	(55.00 dk)
Sistem: Düşük Basıncılı Gradient Sistem	Düşük Basıncılı Gradient Sistem	Düşük Basıncılı Gradient Sistem
Toplam Akış Hızı	Toplam Akış Hızı	Toplam Akış Hızı
1.000 mL/ dk	1.000 mL/ dk	1.000 mL/ dk
HPLC grade metanol (%99,99) ile yıkama işlemi yapıldı	Asetonitril: Saf su (90:10 v/v)	Asetonitril: Saf su (25:75 v/v) - 15 dk

Kültürlerdeki taksan türevi diterpen alkaloidlerin analizinin yapılabilmesi amacıyla ticari olarak satın alınan 10-deasetil bakkatin III (10-DAP, Sigma, D3676), Bakkatin III (Sigma, B8154), Sefalomannin (Sigma, C4991) ve Paklitaksel (Sigma, T7402) standartlarının (Sigma-Aldrich, > %97, HPLC) HPLC analizleri gerçekleştirildi. Standartların analizi için (Kutlutürk, 2019) de geliştirilen yöntem uygulandı. Her bir standarttan 1000 ppm konsantrasyonda ana stok hazırlandı. Denklem 3.4 kullanılarak 6 farklı konsantrasyonda (50 mg/L; 25 mg/L; 10 mg/L; 5 mg/L; 2,5 mg/L ve 1 mg/L) seyreltilen standart çözeltileri HPLC ile analiz edildi. Cihaza ait UV dedektör aracılığıyla 228 nm dalga boyundaki ışığın absorbansına göre yoğunluğu ölçülerek çözeltilerin içerdiği taksan türevi maddelerin konsantrasyonları belirlendi. Bu analiz

sonucunda 10-DAP, Bakkatin III, Sefalomannin ve Paklitaksel moleküllerinin kolondan çıkış zamanları belirlendi.

$$C1 * V2 = C2 * V2 \quad (3.4)$$

Şekil 3.3'te HPLC analizinde kullanılan standartların kolondan çıkış sürelerini gösteren kromatogram verilmiştir. Kromatogramda X eksenı kolondan çıkış zamanı (dk), Y eksenı UV dedektörün ölçtüğü 228 nm dalga boyundaki absorbans değerlerini (A_{228}) göstermektedir.



Şekil 3.3: HPLC analizlerinde kullanılan 10-DAP, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel standart bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltilerinin kolondan çıkış sürelerini belirten kromatogramı.

3.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Besiyerlerindeki farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarının kallus frekansına olan etkisinin hesaplanması ve hücre süspansiyon kültürlerinde üreme eğrileri çıkartılması çalışmalarında deneyler üçer tekrarlı olarak yapıldı. Bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu üzerindeki etkileri ile ilgili sonuçların istatistiksel yöntemler ile değerlendirilmesinde Tukey testi ve çift yönlü ANOVA testleri uygulandı. Hücre süspansiyon kültürlerinde üreme eğrileri çıkartılmasında ise Korelasyon analizi kullanıldı. Hücrelerin üreme eğrilerinin çıkartılması çalışmalarında, hücre sayısı, kuru ve yaş ağırlık ölçümlerine ait tekrar deneylerinin sonuçlarının aritmetik ortalamaları kullanıldı.

$p < 0,05$ olarak hesaplanan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

HPLC analizleri 3 teknik tekrar kullanılarak yapıldı. ppm olarak elde edilen analiz sonuçları Denklem 3.5 kullanılarak $\mu\text{g/g}$ değerine dönüştürülerek hesaplandı. Tekrar sonuçlarının aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri Microsoft Office Excel 2016 programı kullanılarak analiz edildi.

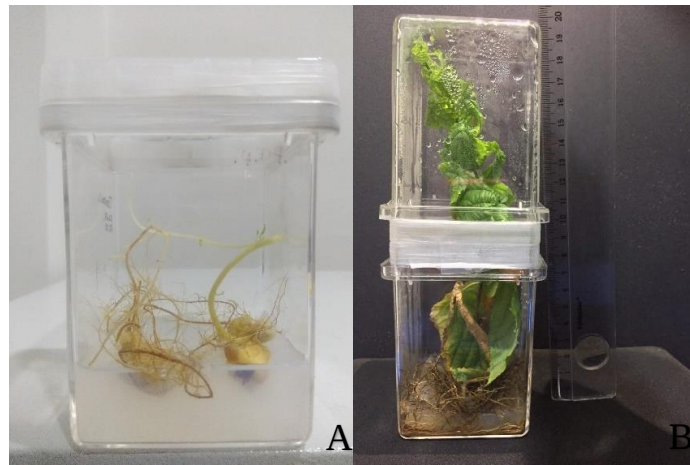
$$ppm = \mu\text{g/g} \quad (3.5)$$

4. BULGULAR

Bu tez kapsamında, Türkiye’de yetişen 5 farklı çeşit (Tombul, Sivri, Çakıldak, Palaz ve Kalıncara) ve 2 farklı fındık genotipi (Ham ve Sivri Yağlı Fındık) kullanıldı. Fındıkların tümünden 2,4-D, KİN ve BAP bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 3 farklı kombinasyonuna sahip 2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN, 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN ve 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP ve kontrol olarak kullanılan 2 mg/L 2,4-D MS besiyerinde kallus kültürleri kuruldu. Çalışılan fındıkların yedisinde de başarılı bir şekilde kallus elde edilmiş olup Kalıncara fındıkta elde edilen kalluslardan sıvı MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyerinde hücre süspansiyon kültürü kuruldu. Tombul fındık çeşidinde *in vitro* koşullarda steril olarak yetiştirilen bitkiciklerin kökleri hücre süspansiyon kültürü kurulması için kullanıldı. Hücre süspansiyon kültürleri kültürlemenin logaritmik fazın orta noktası olarak belirlenen 17. gününde Metil Jasmonat ve fenilalanin kullanılarak elisite edildi. Kültürlemeler 30. günde sonlandırıldı. Hücre süspansiyon kültürlerinden toplam ve hücre dışı taksan türevi moleküllerin analizi için ekstraksiyon yapıldı. 10- deasetil bakkatin III, sefalomannin, bakkatin III ve paklitaksel taksan molekülleri kalitatif ve kantitatif olarak HPLC cihazı ile analiz edildi.

4.1 IN VITRO BİTKİ YETİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında kullanılan 7 farklı fındık çeşidine ait tohumlar ekim gerçekleştirilene kadar 4 °C de buzdolabında bekletildi. Fındık tohumlarının ekimi Bölüm 3.2.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Şekil 4.1’de Tombul fındık bitkiciğinin farklı günlerdeki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1: Tombul fındık bitkiciğinin 2 aylık (A) ve 6 aylık (B) görüntüleri.

Tohum ekimini takiben ~30 günde tohumların standart MS besiyerinde çimlendiği gözlemlendi. Tohum ekimi gerçekleştirilen fındık çeşitlerinden Sivri fındık haricinde 6 çeşitte bitki yetiştirildi. *In vitro* koşullarda bitki yetiştirilmesine en iyi yanıt Tombul fındık çeşidinde görüldü. Benzer şekilde sekonder metabolit üretimi amacıyla kök kültürleri kurulacağından, kök sistemi en iyi gelişen çeşit Tombul fındık oldu. Yetiştirilen bitkiciğin 6. ayda uzunluğu yaklaşık 20 cm'ye ulaşmıştır.

4.2 FINDIK ÇEŞİTLERİNİN KALLUS OLUŞTURMA FREKANSI

Bu Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında Bölüm 3.3.2'de anlatılan yöntemler kullanılarak 5 çeşit ve 2 farklı genotipteki fındıkların tamamında katı besiyerlerine ekimi gerçekleştirilen eksplantlarda ekim gününü takiben 30-45 gün içerisinde kallus oluşumu gözlemlendi. Şekil 4.2'de aktif bölünme özelliği gösteren fındık kalluslarına ait örnek olarak Kalıncara fındığa ait fotoğraflar verildi.



Şekil 4.2: Kalıncara fındığa ait farklı besiyerlerinde gelişen 30 günlük kallusların görünümü. (A), MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyeri (B) MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN ve (C) MS + 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN.

Eksplantların ekimini takiben 30. günde oluşan kalluslar fiziksel özellikler (canlılık, gelişkin yapı, renk, doku, ağırlık) bakımından incelendi. Farklı çeşit ve genotiplerde değişkenlik göstermekle birlikte tüm fındıklarda yeşil-sarı renkli, ufalanabilir kalluslar elde edildi. Tablo 4.1'de belirtildiği gibi 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunda da tüm fındıklarda kallus oluşumu gerçekleşti.

Ancak bu tez süresi içerisinde ilerleyen deneylerde kullanılmak üzere aktif bölünme ve ufalanabilirlik bakımından Kalıncara fındığa ait kallusların kullanılmasına karar verildi.

Daha önce Kutlutürk (2019)'ün yapmış olduğu çalışmada en yüksek bakkatin III miktarı sırasıyla Tombul ve Kalıncara fındıklarının ince kabuklarında, en yüksek sefalomannin miktarı

Kalınkara fındığın meyve dokusunda, en yüksek paklitaksel miktarı sırasıyla Tombul ve Kalınkara fındıkların meyve dokusunda saptanmıştır.

Tüm fındıklar için oluşan kallusların, diğer besiyeri koşullarına göre gelişim özellikleri bakımından daha iyi olduğu belirlendi. Elde edilen kallus frekanslarına göre, ekimi yapılan tüm çeşit ve genotiplerde MS besiyerine eklenen oksin (2,4-D) ve sitokinin tipi (KİN ve BAP) bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumuna olumlu etkisi olduğu belirlendi.

Çoğu çeşitte yüksek frekansta kallus oluşumunu teşvik eden MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyeri sonraki kallus kültürlemeleri ve hücre süspansiyon kültürleri çalışmalarında kullanıldı. Kullanılan fındık çeşitlerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonunda kallus oluşturma frekansları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Sivri Yağlı fındık ve Ham fındık tüm besiyeri koşullarında kallus oluşturmurken, Tombul fındık, Sivri fındık, Çakıldak fındık, Palaz fındık ve Kalınkara fındık MS + 2 mg/L 2,4-D besiyeri koşulunda kallus oluşturmamıştır.

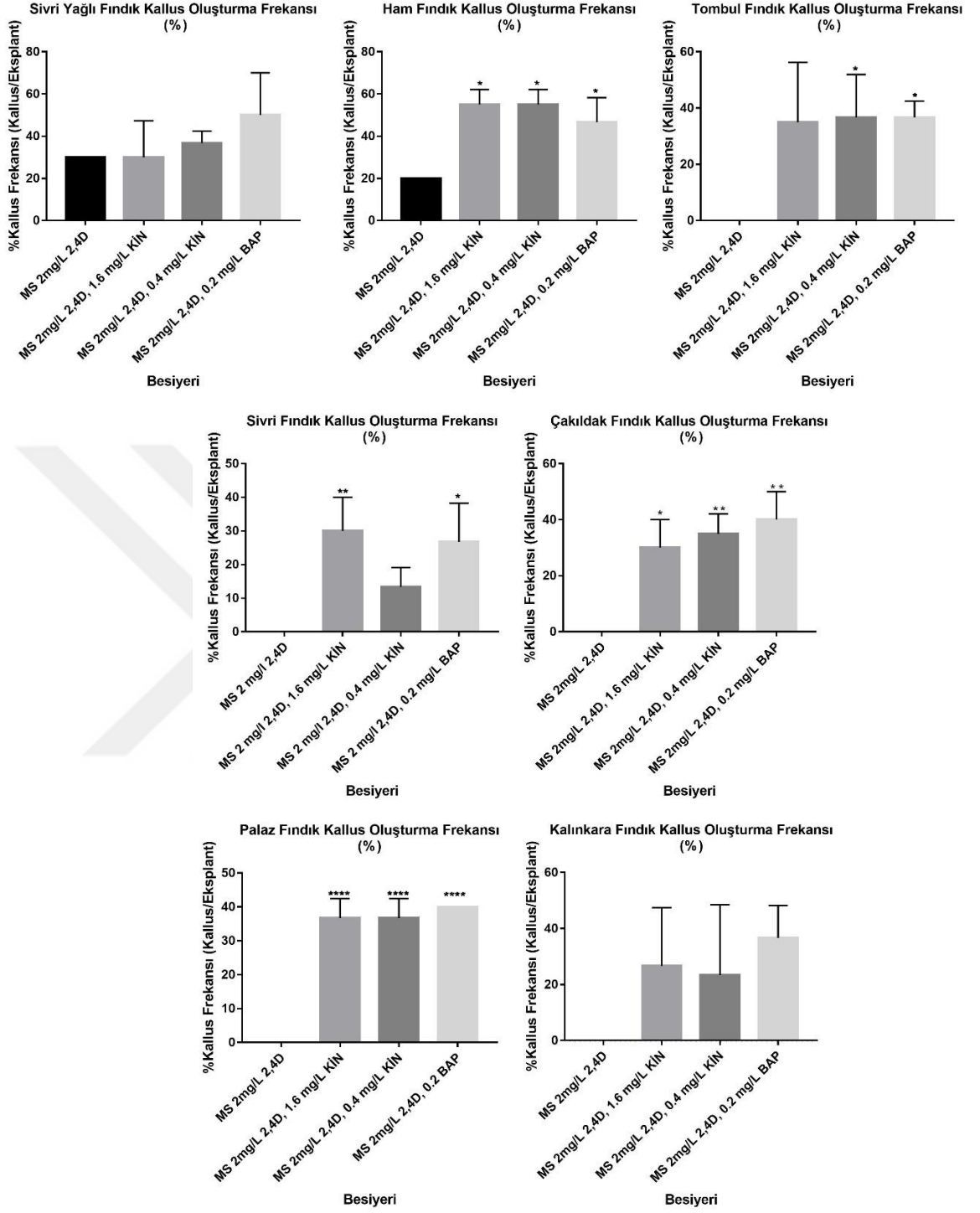
Tablo 4.1: Kullanılan fındık çeşit ve genotiplerinin kallus oluşturma frekansı.

Materyal/ Besiyeri	MS + 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN	MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN	MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP	MS + 2 mg/L 2,4-D
Sivri Yağlı Fındık	%30	%36	%50	%30
Ham Fındık	%43	%43	%46	%20
Tombul Fındık	%50	%36	%36	%0
Sivri Fındık	%30	%13	%26	%0
Çakıldak Fındık	%30	%26	%40	%0
Palaz Fındık	%36	%36	%40	%0
Kalınkara Fındık	%26	%23	%36	%0

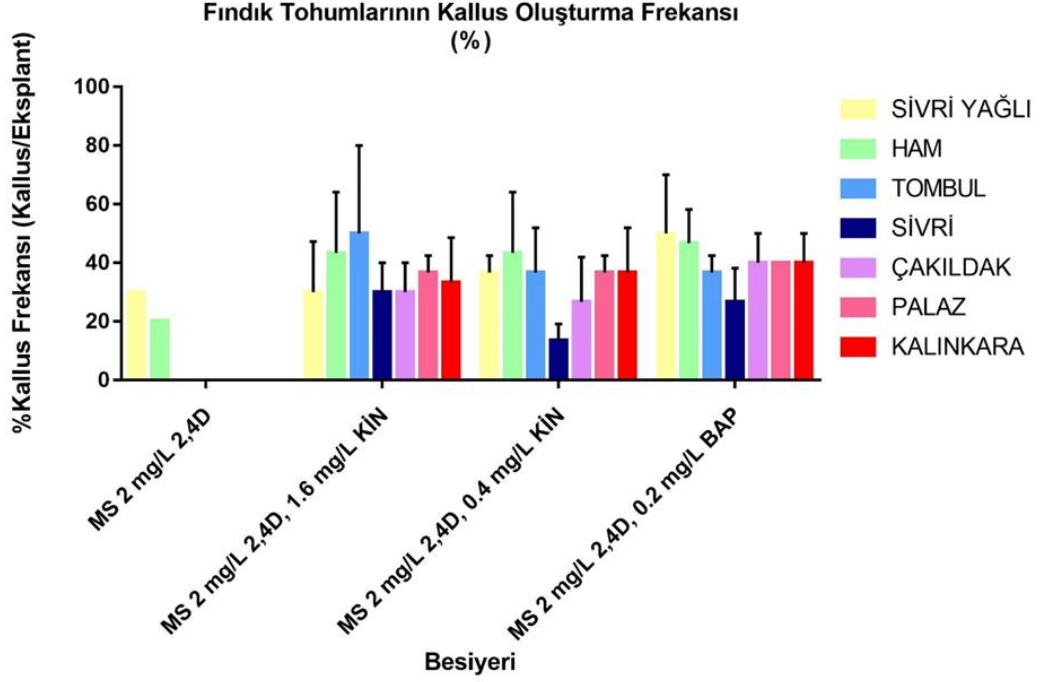
In vitro kallus kültürü kurma çalışmalarına denenen tüm bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri topluca değerlendirildiğinde en iyi kallus oluşturma yanıtının sırasıyla Ham fındık (%38) > Sivri Yağlı fındık (%36,5) > Tombul Fındık (30,5) > Palaz fındık (%28) > akıldak fındık (%24) > Kalınkara fındık (%21,25) ve Sivri fındık (%17,5) olduğu belirlendi.

Sivri Yağlı, Ham, akıldak, Palaz ve Kalınkara fındıklarında en yüksek kallus oluşumu MS + 2 mg/L 2,4-D +0,2 mg/L BAP besiyeri bileşiminde, Tombul ve Sivri fındıklarda ise en yüksek kallus oluşumu MS + 2 mg/L 2,4-D +1,6 mg/L KİN besiyeri bileşiminde görülmüştür.

Fındıkların farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde kallus oluşturma frekansları şekil 4.3'te her biri için ayrı ayrı, şekil 4.4'de ise topluca gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Fındık çeşit ve genotiplerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, KİN ve BAP) kallus oluşumuna etkisi.



Şekil 4.4: Fındıkların farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonunda besiyerlerinde kallus oluşturma frekansları.

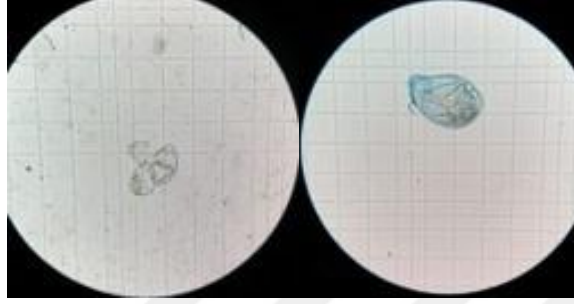
Yapılan fiziksel incelemeler (gelişkinlik, canlılık, fiziksel yapı vb.) sonucunda kallus oluşumu için en uygun besi yeri koşulunun tüm fındıklar için MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP olduğu belirlendi. Tüm fındıklarda KİN ve BAP uygulamasının kallus oluşturma frekansını arttırdığı; Çakıldak ($p = 0,0105$), Palaz ($p = 0,0001$), Sivri ($p = 0,0167$), Tombul Fındık ($p = 0,0272$) çeşitleri ve Ham Fındık ($p = 0,0225$) genotipinde ise kallus oluşturma frekansını istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttırdığı tespit edildi.

4.3 HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Bu çalışmada kullanılan hücre süspansiyon kültürlerinde üreme eğrilerinin oluşturulması amacıyla gerçekleştirilmiş olan Thoma Lamı ile hücre sayımı, yaş ve kuru ağırlık ölçümleri ve hücrelerin kültür süresince canlılığının takip edilmesi amacıyla yapılan Evans's Blue ile hücre canlılığının belirlenmesi deneyleri Kalinkara fındığa ait kallus kökenli hücre süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilmiştir.

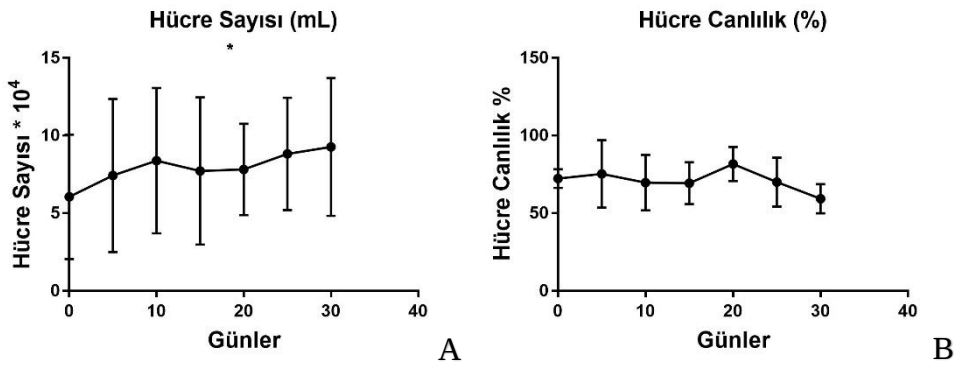
4.3.1 Hücre Sayımı ve Canlılığı Bulguları

Hücreler Thoma Lamı'nda büyük hacimli, kümeleşmeye eğilimli olarak gözlemlendi. Canlı hücreler şeffaf, açık renkli; ölü hücreler mavi, koyu renkli olarak belirlendi. Thoma Lamı üzerindeki canlı ve ölü hücrelerin görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5: Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürü örneklerinin Thoma lamındaki görüntüsü. Canlı hücreler şeffaf (A) ve ölü hücreler mavi (B) görünmektedir.

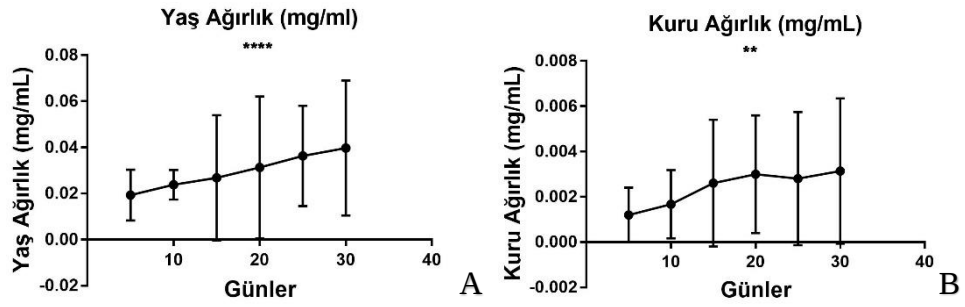
Thoma Lamı'nda yapılan hemositometrik sayıma göre kültür süresinin sonundaki Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerindeki hücre sayısının, başlangıç hücre sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ortalama 1,8 kat arttığı belirlendi. Şekil 4.6'da Kalınkara fındığın hücre süspansiyon kültürlerinde kültür süresince hücre sayısı ve hücre canlılıklarındaki değişimleri gösteren grafikler verilmiştir.



Şekil 4.6: Kalınkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde mililitrede bulunan hücre sayısı (A) ve hücre canlılık yüzdesi (B) grafikleri.

4.3.2 Kuru ve Yaş Ağırlık Ölçümlerine Göre Üreme Eğrileri Oluşturulması

30 günlük kültür süresi boyunca 5 günlük aralıklarla örnek alınarak yaş ve kuru ağırlık ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre Kalinkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde kültür süresi sonunda başlangıç değerlerine göre yaş ağırlığının ortalama 2,1 kat, kuru ağırlığının 2,5 kat arttığı belirlendi. Bir mililitre hücre süspansiyon kültürü örneğindeki yaş hücre ağırlıkları ve kuru hücre ağırlıklarındaki değişimleri gösteren grafikler Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Kalinkara fındığa ait hücre süspansiyon kültürlerinde kültürleme süresi boyunca yaş ağırlık (A) ve kuru ağırlık (B) değişimleri.

Elde edilen bulgulara göre hücre sayısının üssel olarak artış gösterdiği logaritmik fazı 15 ve 20. günler olarak belirlendi. Logaritmik üreme fazının orta noktası olarak 17. gün belirlendi ve elisitasyon uygulamaları 17. günde yapıldı. Kültürlemenin 20. gününden itibaren kültürdeki hücre canlılığının azalma eğiliminde olduğu belirlendi.

4.4 MEJA VE PHE ELİSİTÖRLERİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE TAKSAN TÜREVİ METABOLİT ÜRETİMİNE ETKİSİ

Bölüm 3.4.1’de tarif edilen yöntemlerin uygulanması ile hücrelerin logaritmik üreme fazının orta noktası kültür süresinin 17. günü olarak belirlendi. Kültürlemenin 17. gününde Bölüm 3.5’te tarif edilen şekilde elisitasyon yapıldı ve 30. günde kültür sonlandırıldı. Kültür sonunda alınan örnekler Bölüm 3.5.1.2 ve 3.5.1.3’te belirtilen şekilde ekstrakte edildi ve elde edilen ekstraktlar HPLC cihazıyla analiz edildi.

4.4.1 Elisitörlerin Toplam Üretilen Taksanların Miktarı Üzerindeki Etkileri

Toplam taksanların ekstraksiyonu ardından elde edilen ekstraktların HPLC analizleri gerçekleştirildi. Tablo 4.3'te Kalıncara ve Tombul fındık çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan taksanların HPLC analizi sonuçları verilmiştir. Tespit edilemeyen veriler T.E. ile gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Elisitörler varlığında Kalıncara ve Tombul fındık çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde toplam üretilen taksan miktarları ($\mu\text{g/g}$).

Materyal /Taksanlar	10- DAP	BAKKATİN	SEFALOMANİN	PAKLİTAKSEL
Kalıncara (Kontrol)	T.E.	16,72 $\pm$ 0,65	0,87 $\pm$ 0,12	4,61 $\pm$ 0,30
Kalıncara (100μM MeJA)	T.E.	T.E.	80,95 $\pm$ 3,47	4,58 $\pm$ 0,31
Kalıncara (3μM Phe)	T.E.	4,34 $\pm$ 0,11	0,81 $\pm$ 0,12	4,62 $\pm$ 0,37
Tombul (Kontrol)	4,68 $\pm$ 0,19	26,33 $\pm$ 2,10	T.E.	3,81 $\pm$ 0,30
Tombul (100μM MeJA)	2,69 $\pm$ 0,12	22,35 $\pm$ 1,27	0,95 $\pm$ 0,10	5,43 $\pm$ 0,31
Tombul (3μM Phe)	5,91 $\pm$ 0,15	29,07 $\pm$ 1,69	0,71 $\pm$ 0,13	5,95 $\pm$ 0,17

Kalıncara fındığın hem kontrol grubunda hem de her iki deney grubunda 10-DAP tespit edilememiştir (T.E.). Bakkatin III miktarı 3 μM Phe uygulanmış deney grubunda kontrol grubuna göre azalmış, 100 μM MeJA uygulanan deney grubunda ise tespit edilememiştir. Sefalomannin miktarı 100 μM MeJA uygulanmış kültürlerde kontrol grubuna göre artmışken, 3 μM Phe uygulanmış kültürlerde azalmıştır. Paklitaksel miktarı kontrol grubunda, 100 μM MeJA ve 3 μM Phe elisitasyonu yapılan deney gruplarında birbirine çok benzerdir.

Tombul fındıkta 10-DAP miktarı kontrol grubuna göre 100 μM MeJA elisitasyonunda azalmışken, 3 μM Phe elisitasyonunda artış göstermiştir. Benzer şekilde Bakkatin III miktarı

da kontrol grubuna göre 100 μM MeJa elisitasyonunda azalmışken, 3 μM Phe elisitasyonunda artmıştır. Sefalomannin miktarı herhangi bir elisitasyon yapılmamış kontrol grubunda tespit edilemeyip deney gruplarında tespit edilmiştir. 100 μM MeJa uygulanan deney grubunda tespit edilen Sefalomannin miktarı 3 μM Phe uygulanan gruba göre daha yüksektir. Tombul fındıkta bulunan Paklitaksel miktarının hem 100 μM MeJa ($5,43 \pm 0,31$) hem de 3 μM Phe ($5,95 \pm 0,17$) elisitasyonu yapılan deney gruplarında kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.4.2 Elisitörlerin Hücre Dışı Taksanların Üretimi Üzerindeki Etkileri

Hücre dışına salınan taksanların ekstraksiyonu ardından elde edilen ekstraktlar HPLC ile analiz edildi. Bu analizlere göre 10-DAP, Bakkatin III, Sefalomannin ve Paklitaksel molekülleri analizleri gerçekleştirilen iki çeşitte de hem herhangi bir elisitasyon yapılmamış kontrol gruplarında, hem de MeJa ve Phe elisitörleri uygulanmış deney gruplarında saptandı. Kalınkara ve Tombul fındık çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen ekstraktlarda yapılan hücre dışına salınan taksanların HPLC analizi sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Elisitörler varlığında Kalınkara ve Tombul fındık çeşitlerine ait ekstraktlarda bulunan hücre dışına salınan taksan türevlerinin miktarları ($\mu\text{g/g}$).

Materyal/ Taksanlar	10-DAP	BAKKATİN	SEFALOMANİN	PAKLİTAKSEL
Kalınkara (Kontrol)	41,71 $\pm$ 0,15	4,94 $\pm$ 0,17	2,65 $\pm$ 0,09	1,91 $\pm$ 0,18
Kalınkara (100μM MeJA)	45,83 $\pm$ 1,49	4,67 $\pm$ 0,17	1,79 $\pm$ 0,147	1,47 $\pm$ 0,2
Kalınkara (3μM Phe)	41,87 $\pm$ 0,7	17,31 $\pm$ 21,87	1,20 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,02
Tombul (Kontrol)	43,46 $\pm$ 0,10	19,65 $\pm$ 0,17	2,13 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,13
Tombul (100μM MeJA)	55,65 $\pm$ 0,16	28,23 $\pm$ 1,54	2,69 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,17
Tombul (3μM Phe)	39,13 $\pm$ 0,13	35,05 $\pm$ 0,74	2,71 $\pm$ 0,13	0,97 $\pm$ 0,13

Kalınkara fındıkta; kontrol grubuna göre 100 μ M MeJa ile elisite edilmiş kültürlerde bulunan 10-DAP miktarı 3 μ M Phe ile elisite edilmiş kültürlerle göre daha fazla artış göstermiştir. Bakkatin III, Sefalomannin ve Paklitaksel miktarları elisite edilmiş kültürlerde azalış göstermektedir. Fakat Bakkatin III nin 3 μ M Phe ile elisitasyonu ile elde edilen sonuçta artış görülmektedir. Buna karşın deney tekrarlarının standart sapması yüksektir.

Tombul fındıkta 10-DAP miktarı 100 μ M MeJa elisitasyonunda kontrol grubuna göre artmış, 3 μ M Phe elisitasyonu sonucunda ise azalmıştır. Bakkatin III ve Sefalomannin miktarları hem 100 μ M MeJa hem de 3 μ M Phe elisitasyonu sonucu artış göstermiştir. Paklitaksel miktarı ise her iki elisitasyon sonucunda azalmıştır.

Yapılan tüm analizlerde en yüksek 10-DAP miktarı Tombul fındığın 100 μ M MeJa uygulanmış kültürlerinde hücre dışına salınmış olarak ($55,65 \pm 0,16$ μ g/g), en yüksek Bakkatin III miktarı Tombul fındığın 3 μ M Phe uygulanmış kültürlerinde hücre dışına salınmış olarak ($35,05 \pm 0,74$ μ g/g), en yüksek Sefalomannin miktarı Kalınkara fındığın 100 μ M MeJa uygulanmış hücre süspansiyon kültürlerinde ($80,95 \pm 3,47$ μ g/g) ve en yüksek Paklitaksel miktarı Tombul fındığın 3 μ M Phe uygulanmış hücre süspansiyon kültürlerinde ($80,95 \pm 3,47$ μ g/ g) saptanmıştır.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde hücre dışına salınan taksanların analizi sonuçlarında;

10-DAP miktarı en yüksek $55,65 \pm 0,16$ μ g/g olarak Tombul fındığın 100 μ M MeJa ile elisite edilmiş kültürlerinde saptanmıştır. En düşük ise $39,13 \pm 0,13$ μ g/ g olarak yine Tombul fındığa ait 3 μ M Phe ile elisite edilmiş kültürlerinde saptanmıştır.

Kalınkara fındıkta 100 μ M MeJa uygulaması 10-DAP miktarını kontrol grubuna göre %10 arttırmıştır. Fakat 3 μ M Phe uygulaması yapılan kültür ekstraktlarında tespit edilen 10-DAP miktarı kontrol grubuna neredeyse eşittir.

Tombul fındıkta 100 μ M MeJa ile elisite edilmiş kültürlerde tespit edilen 10-DAP miktarı kontrol grubuna göre %30 oranında artış göstermiş, fakat 3 μ M Phe uygulaması sonucunda 10-DAP miktarı %10 oranında azalmıştır.

Bakkatin III miktarı en yüksek $35,05 \pm 0,74$ μ g/ g olarak Tombul fındığın 3 μ M Phe ile elisite edilmiş kültürlerinden elde edilen ekstraktlarda saptanmıştır. En düşük değer ise $4,67 \pm 0,17$ μ g/g olarak Kalınkara fındığın 100 μ M MeJa ile elisite edilmiş kültürlerinde saptanmıştır.

Kalınkara fındıkta 3 μM Phe uygulaması kontrole göre Bakkatin III miktarını %250 oranında arttırmıştır, fakat elde edilen bulgunun standart sapmasının çok yüksek olması deneyin tekrarlanmasını gerektirmektedir. 100 μM MeJa uygulaması sonucunda ise Bakkatin III miktarı kontrole göre %5 oranında azaltmıştır.

Tombul fındıkta 100 μM MeJa uygulaması Bakkatin III miktarını kontrol grubuna göre %45 oranında; 3 μM Phe uygulaması ise %80 oranında arttırmıştır.

Sefalomannin miktarı en yüksek $2,71 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$ olarak Tombul fındığın 3 μM Phe ile elisite edilmiş kültürlerinde saptanmıştır. En düşük miktar ise $1,20 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ olarak 3 μM Phe ile elisite edilmiş Kalınkara kültürlerinde saptanmıştır.

Kalınkara fındıkta hem 100 μM MeJa uygulaması hem de 3 μM Phe uygulaması sefalomannin miktarını azaltmıştır (sırasıyla %30 ve %55 oranlarında).

Tombul fındıkta 100 μM MeJa uygulaması sonucu Sefalomannin miktarı kontrol grubuna göre %25 ve 3 μM Phe uygulaması ile %30 artmıştır.

Paklitaksel miktarı en yüksek $1,91 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$ olarak Kalınkara fındığın kontrol grubunda saptanmıştır. En düşük miktar ise $0,97 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$ olarak Tombul fındığın 3 μM Phe uygulanmış kültürlerinde saptanmıştır.

Kalınkara fındıkta hem 100 μM MeJa uygulaması hem de 3 μM Phe uygulaması paklitaksel miktarını kontrol grubuna göre sırasıyla %20 ve %5 oranında azaltmıştır.

Tombul fındıkta da benzer şekilde 100 μM MeJa ve 3 μM Phe uygulamaları yapılmış, paklitaksel miktarı sırasıyla %30 ve %40 oranlarında azalmıştır.

Her iki fındık çeşidinde de hücre dışına salınan 10-DAP miktarının arttırılmasında 100 μM MeJa, Bakkatin III miktarının arttırılmasında 3 μM Phe uygulaması, Tombul fındıkta Sefalomannin miktarının arttırılmasında da her iki uygulama başarılı olmuştur. Hücre dışına salınan Paklitaksel miktarında artış sağlanamamıştır.

Toplam üretilen taksanların analizi sonuçlarında;

10-DAP miktarı, en yüksek $5,91 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ olarak de 3 μM Phe uygulanmış Tombul fındık örneklerinde saptanmıştır. Kalınkara fındığa ait kontrol ve deney gruplarında 10-DAP tespit

edilememiştir. Tombul fıncının 100 μ M MeJa uygulanmış kültürlerinde kontrol grubuna göre 10-DAP miktarı %40 oranında azalmış, 3 μ M Phe uygulaması yapılmış kültürlerde ise %25 oranında artmıştır.

Bakkatin III miktarı, en yüksek $29,07 \pm 1,69$ μ g/g olarak 3 μ M Phe uygulanmış Tombul fıncık kültürlerinde saptanmıştır. 100 μ M MeJa uygulanmış Kalıncara kültürlerinde ise tespit edilememiştir.

3 μ M Phe uygulanmış Kalıncara kültürlerinde belirlenen Bakkatin III miktarı kontrole göre %75 oranında azalmıştır.

100 μ M MeJa uygulanmış Tombul fıncık kültürlerinde kontrole göre %15 oranında azalış ve 3 μ M Phe uygulanmış kültürlerde %10 oranında artış saptanmıştır.

Sefalomannin miktarı, en yüksek $80,95 \pm 3,47$ μ g/g olarak 100 μ M MeJa uygulanmış Kalıncara kültüründe saptanmıştır. Tombul fıncının kontrol grubunda Sefalomannin tespit edilememiştir.

100 μ M MeJa uygulanmış Kalıncara kültürlerinde tespit edilen Sefalomannin miktarı kontrol grubuna göre büyük bir artış göstermiştir. 3 μ M Phe uygulanmış kültürlerde tespit edilen değer ise kontrol grubuna çok benzerdir.

Paklitaksel miktarı, en yüksek $5,95 \pm 0,17$ μ g/g olmak üzere Tombul fıncının 3 μ M Phe uygulanmış kültürlerinde ve en düşük $3,81 \pm 0,30$ μ g/g olarak Tombul fıncının kontrol grubunda tespit edilmiştir.

Kalıncara fıncıkta deney gruplarında tespit edilen paklitaksel miktarı kontrol grubu ile oldukça benzerdir.

Tombul fıncıkta 100 μ M MeJa ile elisite edilmiş kültürlerde kontrol grubuna göre %40 ve 3 μ M Phe ile elisite edilmiş kültürlerde %55 oranlarında artış saptanmıştır.

Toplam  retilen 10-DAP ve Bakkatin III miktarları yalnızca 3 μ M Phe uygulaması ile Tombul fıncıkta artış göstermiştir. Sefalomannin  retimi yalnızca Kalıncara fıncının 100 μ M MeJa ile elisite edilen kültürlerinde artış gözlenmiştir. Tombul fıncının toplam üretilme miktarı her iki elisitasyon sonucunda önemli oranlarda artmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser dünya çapında oldukça sık karşılaşılan, uzun süreli ve zorlu tedavi süreçleri gerektiren bir hastalıktır. Genetik ve çevresel faktörlere bağlı olması hastalığın tanısını zorlaştırmakta, tedavi sürecini karmaşıklştırmaktadır. Günümüzde kanser tedavisi için kullanılmakta olan birçok yaklaşım bulunmaktadır. Cerrahi operasyonlar, radyoterapi, kemoterapi ve son yıllarda geliştirilen immünoterapi bu tedavi yaklaşımlarının başında gelir.

Paklitaksel 1971 yılında *Taxus brevifolia* kabuğundan ekstrakte edilen önemli bir kemoterapötiktir. 1992'de Taxol®, yumurtalık kanserinin tedavisi için FDA tarafından onaylandı. Bunu 1994'te meme kanseri, 1999'da akciğer karsinomu ve 2014'te adenokarsinom için tedavi onayları izledi. Onaylanmasından bu yana, paklitakselden geliştirilen ilaçlar bir milyondan fazla hastaya uygulanmıştır. Zor gelişme sürecine rağmen, Taxol® ve ilgili taksan analogları, beş milyar doları aştığı bildirilen satışlarla önde gelen anti kanser ilaçları haline gelmiştir (McElroy ve Jennewein, 2017).

Taxol®, mikrotübüllerin β -tubulin alt ünitelerine bağlanan ve düşük sıcaklıklarda ve normalde depolimerizasyonu destekleyen kalsiyum iyonlarının varlığında bile polimerizasyonlarına neden olan güçlü bir anti-neoplastik bileşiktir. 10 nM'den daha yüksek dozlar, büyük, stabil tübülün demetlerinin birikmesine neden olarak hücre çoğalmasını engeller, daha düşük konsantrasyonlar ise apoptoza yol açar (Martin, 2014).

İlk paklitaksel ekstraksiyonu *T. brevifolia*'nın kabuklarından yapılmıştır. Ancak, ekstraksiyon protokolü oldukça düşük verimli olduğundan, artan hasta sayısı ve ilaca olan talebe yetersiz kalmıştır. Saflaştırma, bileşiğin hidrofobik doğasından dolayı zahmetli ve karmaşıktır. Orijinal kuru ağırlığın sadece 0.5 g kadar küçük bir miktarının etkili bir şekilde saflaştırılabildiği %0,004'lük düşük bir verim ile sonuçlanmıştır (McElroy ve Jennewein, 2017). Bu uygulama *T. brevifolia*'nın sayısında önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Tomrukçuluk, kabuğunun paklitaksel ekstraksiyonu için kullanılması gibi nedenlerle de şu anda ağacın doğal koşullarda sayısı “neredeyse tehdit altında” kategorisindedir. Bu ağaçların olgunluğa ulaşması için ~ 300 yıl gerektiğinden, kabuk hasadına ihtiyacın ortadan kaldırılması için paklitaksel üretiminde kullanılacak alternatif kaynakların veya yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Kimyasal sentez, Bakkatin III ve 10-deasetilbakkatin III gibi paklitaksel öncüllerinden yarı sentez, metabolizma mühendisliği ve öncül moleküllerin üretimi için hücre kültürleri, paklitaksel üretiminde başlıca yaklaşımlardır. Tüm paklitaksel sentez yolu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak öncü geranilgeranil difosfattan (GGPP) paklitaksele kadar 19 enzimatik adım gerektirdiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Kimyasal sentez gibi yöntemlerin karmaşıklığı ve yüksek maliyetli olması, ek olarak üretim sürecinde ortaya çıkan fazla miktarda istenmeyen yan ürünler olması büyük hacimli üretim için bu yöntemi kullanışsız kılmaktadır (McElroy and Jennewein, 2017).

Bitki hücre kültürleri kullanılarak öncül maddelerin üretilmesi ile yarı sentez yöntemi diğer yöntemlere kıyasla oldukça avantajlıdır. *In vitro* hücre kültürleri şeklindeki bitki materyalleriyle yarı sentez ile geliştirilmiş taksooidlerin ekstraksiyonu, klinik uygulamalar için Taxol® ve Taxotere®'in ticari üretimi için önemli bir çözüm olmuştur.

Paklitaksel üretiminde mevcut tercih edilen yöntem *Taxus* hücre kültürlerinden izole edilen paklitaksel öncülleri olan bakkatin III ve 10-deasetilbakkatin III ile yarı sentez yöntemidir. Bu yolla kontrollü koşullar altında yetiştirilen bitki materyali kullanıldığından üretim, çevresel olarak sürdürülebilir olup ve aynı zamanda maliyet düşürülmüştür (McElroy ve Jennewein, 2017). Günümüzde en büyük paklitaksel üreticisi olan Pyton Biotech firması da üretimini bu yöntemlerle gerçekleştirmektedir (News Medical, 2018).

1998 yılında taksan türevi anti kanser moleküllerin ilk kez fındık (*Corylus avellana*) bitkisindeki varlığı belirlenmiştir (Hoffman ve diğ., 1998). 2019 yılında tamamlanan bir çalışma (Kutlutürk, 2019) Türkiye’de yetişen fındık çeşitlerinde çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve, meyve dokularında taksan türevi moleküllerin varlığını göstermiştir. Ülkemiz topraklarında bol miktarda üretimi yapılan fındık bitkisinin oldukça temel anti kanser maddelerin üreticisi olması oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye’de yetişen 5 farklı çeşit ve 2 farklı genotipteki fındıklarda taksan türevi anti kanser özellikte bitkisel sekonder metabolitlerin üretimlerinin arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla 5 farklı çeşit (Sivri, Tombul, Çakıldak, Palaz, Kalınkara) ve 2 farklı genotipteki (Sivri Yağlı ve Ham) fındıkların *in vitro* kültürleri kurulmuş; *in vitro* kültürlemeye en iyi yanıtları veren Kalınkara ve Tombul fındıklar seçilerek bu çeşitlere ait hücre süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamalarının (100µM MeJa ve 3 µM Phe) hücre dışına salınan ve

toplam üretilen 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel moleküllerinin miktarlarına olan etkisi HPLC analizi ile saptanmıştır.

Fındık bitkisinde taksan türevi moleküllerin üretimi amacıyla yapılan doku kültürü çalışmaları oldukça sınırlıdır. Ottaggio ve diğ. (2006)'nin yapmış oldukları çalışmada çeşitli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarıyla desteklenen MS besiyeri ortamlarında kültürlen kök, yaprak ve tohumlardan başarıyla kallus kültürleri kurulmuştur. Salehi ve diğ. (2017) fındık bitkisinden kallus kültürleri kurulması için en uygun besiyeri koşulunu belirlemeyi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda 10 farklı besiyeri koşulu denenmiştir. Bir sonraki yıl yayınlanan çalışmada ise fındık hücre süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamaları yapılmıştır (Salehi ve diğ. 2018). Jamshidi ve Ghanati, (2017)'nin yapmış olduğu çalışmada fındık hücre süspansiyon kültürleri kurulmuş ve elisitasyon uygulamaları ile taksan miktarlarındaki değişim saptanmıştır.

Türkiye'de yetişen fındık çeşitlerinde antikanser taksanların biyoteknolojik üretimi amacıyla doku kültürlerinin kurulması ise ilk kez bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kurulan kallus kültürleri değerli sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretimi amacıyla dünyada en fazla tercih edilen kültür sistemlerinden biri olan hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması için önemli kaynaklardır.

Bu tez çalışmasında kallus kültürleri kurulması için 2,4-D, BAP ve Kinetin bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanılmasıyla oluşturulan 3 farklı besiyeri koşulu (MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyeri, MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN ve MS + 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN) uygulandı. Yedi fındık mataryelinde de kallus kültürleri başarıyla kuruldu.

İlk kallus oluşumları Ottaggio ve diğ. (2006) yapmış olduğu çalışmadan elde edilen bulgulara benzer şekilde 15-30 gün içerisinde görülmeye başlandı ve elde edilen kallusların beyaz ve dağılabilir özellikte olduğu gözlemlendi. Kalluslar 1-2 ay sonra çok yavaş büyüyen, kahverengi renkli bir yapı halini aldı. Yine aynı çalışmada araştırmacılar fındık kültürleri için pozitif kontrol olarak *T. baccata*'dan kallus kültürlerini oluşturulmuştur. Porsuk eksplantlarından kallus oluşumu genellikle kültürün 30. ila 60. günlerinde meydana gelen bir büyüme göstermiştir (Ottaggio ve diğ., 2006). Buna göre fındık bitkisinde kallus oluşumu porsuk ağacına göre daha hızlı olmaktadır.

Bitki doku kültürü çalışmalarında kallus gelişimi sekonder metabolitlerin sentezlenmesi amacıyla kurulan hücre süspansiyon kültürlerinde en önemli başlangıç materyallerinden biridir. Bu anlamda fındık bitkisi porsuk ağacına göre avantajlı konumdadır.

Kallus oluşturma frekansı bakımından tüm çeşitlerde en yüksek miktarda ve en uygun fizyolojiye sahip kallus oluşumu MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyerinde gözlemlendi. İkinci sırada MS + 2 mg/L 2,4-D + 1,6 mg/L KİN besiyeri ve en az kallus oluşumu MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,4 mg/L KİN besiyerinde gözlemlendi. Bu çalışmada kullanılan bitkilerde kallus oluşumunu en etkili uyaran bitki büyüme düzenleyicisi BAP olmuştur.

Bu çalışmada kullanılan fındık çeşitleri bakımından en yüksek kallus oluşturma yanıtı sırasıyla Ham fındık (%38) > Sivri Yağlı fındık (%36,5) > Tombul Fındık (30,5) > Palaz fındık (%28) > Çakıldak fındık (%24) > Kalıncara fındık (%21,25) ve Sivri fındık (%17,5) olarak belirlendi. Aynı tür içerisinde bulunan farklı fındık çeşitlerinin genetik yapıları çok yüksek oranda birbirlerine benzerdir. Ancak, tür içerisindeki bireylerin genetik yapısı birbirlerinden küçük farklılıklarda ayrılırlar. Her bir fındık materyalinin kallus oluşturma frekansında karşılaşılan farklılıkların farklı organizmaların genetik materyallerindeki değişikliklerin neden olduğu genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kinetin ve BAP'ın kallus oluşumuna olan etkisinin belirlenmesi için kontrol grubu olarak kullanılan MS + 2 mg/L 2,4-D besiyerinde Sivri Yağlı fındık (%30) ve Ham fındık (%20) kallus oluştururken diğer çeşitlerde kallus oluşumu gözlenmedi. Bu sonuçlara göre Kinetin ve BAP sitokin tipi bitki büyüme düzenleyicileri kallus oluşumunu olumlu etkilemektedir. Ottaggio ve diğ. (2006) yapmış oldukları çalışmada, yalnızca 2,4-D uygulaması ile kallus oluşumunun uyarılabildiğini ancak BAP ile birlikte kullanımında kallus oluşturma frekansının arttığını belirlemiştir. Ek olarak, BAP ile birlikte Naftalin Asetik Asit (NAA) kullanıldığında ise tohumlardan kallus elde edilme oranının %50'den fazla bir oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Kalıncara fındığının MS + 2 mg/L 2,4-D + 0,2 mg/L BAP besiyeri koşulunda gelişen aktif bölünme özelliğindeki kallusu ve Tombul fındığının standart MS besiyerinde yetişen bitkiciğine ait kök yapısı kullanılarak hücre süspansiyon kültürleri elde edildi. Bu kültürlerden Thoma Lamı ile hücre sayımı ve yaş, kuru ağırlık ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin sigmoidal bir üreme eğrisi çizdiğini gösterdi.

Hücre sayısı, Yaş ağırlık ve Kuru ağırlık ölçümleri sonucunda kültür süresinin sonuna doğru bitki hücreleri için tipik şekilde bir artış gözlemlendi. Hücrelerin artış karakterlerini belirlemede denenilen yöntemlerden en iyi sonuç verenin birçok bitkide hücre süspansiyon kültürlerinin üreme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan yaş/kuru ağırlık ölçümleri olduğu belirlendi (Gallego, 2015).

Sekonder metabolit üretimini arttırmakta ortam bileşimi, yetiştirme yönteminin değiştirilmesi, sıcaklık, pH, ışık ve belirli metallerin varlığı gibi diğer birçok faktör de etkilidir. Bitki stres yanıtı yollarını uyarmak için biyotik ve abiyotik elisitörlerin kullanılması da istenilen sekonder metabolitlerin üretimini uyarmada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Rezaei ve diğ. (2011)'nin yapmış olduğu çalışmada, Ultrasonikasyon (US), salisilik asit (SA) ve bunların birlikte kullanımının *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Elisitörlere en bilinen örneklerden biri jasmonatlardır. Jasmonatlar, bitkiler ve bazı mantarlar tarafından üretilen bir oksilipin ailesidir ve en iyi bilineni metil jasmonattır (MeJa). Metil jasmonat, jasmonik asit, koronatin, vanadyum sülfat, gümüş nitrat, salisilik asit, amonyum sitrat, kobalt klorür, siklodekstrin ve hatta metil jasmonat ve salisilik asit gibi birçok molekül bu sınıfa girer (McElroy ve Jennewein, 2017).

Jasmonatlar normal koşullarda bitki hücreleri tarafından savunma yanıtında sinyal molekülleri olarak üretilir ve sinyal iletim yollarında görev alırlar. Bununla birlikte *in vitro* koşullar altında sekonder metabolit üretiminin uyarılması amacıyla kültür ortamına dışarıdan eklendiğinde güçlü elisitörler olarak iş gördükleri belirlenmiştir. Örneğin Metil Jasmonat'ın *Taxus* türlerinde taksan biyosentezini uyardığı bildirilmiştir (Narayani & Srivastava, 2017).

Jasmonatlar gibi sinyal iletim yollarında görevli moleküllerin yanı sıra aminoasitler de sekonder metabolizma yollarında uyarıcı olarak görev alabilirler. Örneğin fenilalanin paklitaksel yan zincirinin sentezinde doğrudan rol oynayan önemli bir aminoasittir (Malik ve diğ., 2011).

Bölüm 2.1.1.1'de anlatıldığı üzere, genellikle bitkiler antosiyanin tip üreme gösterirler. Bu üreme modelinde hücre sayısı ve sekonder metabolitlerin üretimi zıt yönlü olarak değişir. Bu nedenle hücre sayısının üssel olarak arttığı logaritmik üreme fazının ortalarından itibaren üreme hızı yavaşlar ve sekonder metabolit üretimi artmaya başlar. Bu çalışmada da elde edilen hücre

üreme eğrileri kullanılarak hücrelerin logaritmik fazının orta noktası kültürlemenin 17. günü olarak belirlendi ve kültürlemenin 17. gününde kültürlerle 100 μM MeJa ve 3 μM Phe elisitasyonları yapıldı. Hücre dışına salgılanan ve toplam üretilen taksanların belirlenmesi için Gallego ve diğ., (2015) yapmış oldukları çalışmada uygulanan metanol ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elisitör varlığında hücre süspansiyon kültürlerinde üretilen taksan türevi moleküllerin kalitatif ve kantitatif analizleri HPLC metodu ile gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlara göre; hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan 10-DAP, Bakkatin III ve Sefalomannin molekülleri hücre dışına salınmış şekilde bulunurken, Paklitaksel birikimi hücre içerisinde olmaktadır.

Yapılan bir çalışmada farklı zamanlarda toplanan *T. baccata* bitkisine ait kırmızı meyvelerde taksan türevi sekonder metabolitlerin miktarları HPLC analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre bitki içeriğindeki taksan moleküllerinin sayısı ekstraksiyon yapılan bitkisel dokuya ve zamana göre değişmektedir. Elde edilen sonuçlar 10-DAP: $16,3 \pm 10,2 \mu\text{g/g}$; bakkatin III: $7,8 \pm 8,7 \mu\text{g/g}$; sefalomannin: $1,4 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$; paklitaksel: $1,1 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$ şeklindedir (Pietsch ve Siegle, 2018) ve bu tez çalışması kapsamında elde edilen toplam üretilen taksan molekülü sonuçları *T. baccata* bitkisine ait kırmızı meyve dokularından elde edilen sonuçlara göre oldukça yüksektir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre 10-DAP miktarı $55,65 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$; bakkatin III miktarı $35,05 \pm 0,74 \mu\text{g/g}$; sefalomannin miktarı $80,95 \pm 3,47 \mu\text{g/g}$ ve paklitaksel miktarı $5,95 \pm 0,17 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir. Bu da elisite edilmiş kültürlerde bulunan taksan türevi anti kanser moleküllerin miktarlarının *T. baccata* bitkisi meyvelerinden elde edilen bulgulara oranla sırasıyla %241, %349, %5682 ve %440 oranlarında arttığını göstermektedir.

Gallego ve diğ. (2015)'nin yapmış olduğu çalışmada *C. avellana* hücre süspansiyon kültürleri 100 μM MeJa ve 1 μM koronatin (Cor) ile kültürlemenin 7. ve 14. günlerinde elisite edilmiş ve paklitaksel ve bakkatin III miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. Kontrol gruplarında Bakkatin III yalnızca 14. günde olarak tespit edilmiştir ($22,7 \mu\text{g/L}$). MeJa ile elisite edilen deney gruplarında 7. günde $38,3 \mu\text{g/L}$ ve 14. günde $60,8 \mu\text{g/L}$ Bakkatin III tespit edilmişken; Cor ile elisite edilmiş kültürlerde 7. günde $368,4 \mu\text{g/L}$ ve 14. günde $609,3 \mu\text{g/L}$ Bakkatin III tespit edilmiştir.

Diğer yandan, kontrol gruplarında paklitaksel tespit edilemezken, 7. günde MeJA ve Cor ile elisite edilmiş kültürlerde sırasıyla 2,4 µg/L ve 2,6 µg/L ve 14. günde sırasıyla 10,04 µg/L ve 14,03 µg/L paklitaksel tespit edilmiştir. Kontrol grubunda, toplam biriken bakkatin III tespit edilirken, her iki elisitasyon uygulaması, her iki örnekleme zamanında da bakkatin III salgılanması %90'ın üzerine çıkarmıştır. Paklitaksel ise tüm koşullarda 7. günde salgılanmamakla birlikte, 14. günde MeJA elisitasyonu ile %14'e ve Cor ile %84'e yükselmiştir (Gallego ve diğ., 2015). Çalışmada taksan türevlerinin uyarılmasında koronatinin metil jasmonattan daha etkili bir elisitör olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında ise her iki fındık çeşidinde, kontrol ve deney gruplarında hem hücre dışı hem de toplam paklitaksel ve bakkatin III varlığı tespit edilmiştir. Yalnızca Kalıncara fındığa ait 100 µM MeJA ile elisite edilmiş deney grubunda paklitaksel tespit edilememiştir. Buna ek olarak, en yüksek bakkatin III ve paklitaksel miktarı Tombul fındıkta sırasıyla $35,05 \pm 0,74$ µg/g ve $5,95 \pm 0,17$ µg/g olarak 3 µM Phe ile elisite edilmiş kültürlerde tespit edilmiştir. Kalıncara fındıkta ise en yüksek bakkatin III ve paklitaksel miktarları $17,31 \pm 21,87$ µg/g ve $4,62 \pm 0,30$ µg/g olarak benzer şekilde 3 µM Phe ile elisite edilmiş kültürlerde tespit edilmiştir.

Gallego ve diğ. (2015)'nin yapmış olduğu çalışmaya benzer olarak bu tez çalışmasında da hücre süspansiyon kültürlerinde taksan moleküllerinin üretim yollarının uyarılması için 100 µM MeJA elisitasyonu uygulanmıştır. Ancak, elde edilen bulgular karşılaştırıldığında eşit konsantrasyonda MeJA uygulamasının taksan türevi moleküllerin miktarında aynı oranda artış sağlamadığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak da genotip etkisi, bitkinin yetiştirilme koşulları, elisitörün uygulanma süresi gösterilebilir. Hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan bakkatin III ve paklitaksel moleküllerinin üretimlerini arttırmakta Gallego ve diğ. (2015)'nin uygulamış olduğu iki elisitörden koronatin, MeJA'dan daha etkili olmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre Kalıncara ve Tombul fındıklarda bakkatin III ve paklitaksel moleküllerinin üretimlerini arttırmada ise 3 µM Phe uygulaması 100 µM MeJA uygulamasından daha etkilidir.

Ottaggio ve diğ., (2006)'nin yapmış olduğu çalışmada ise fındık hücre kültürlerinde esas olarak paklitaksel, 10-deasetiltakso ve 10-deasetilbakkatin III içerdiği bulunmuştur. Bakkatin III ve 7-ksilosiltakso de tanımlanmış, ancak bu taksanların düşük seviyesine bağlı olarak HPLC kantifikasyon limiti altında kesin olarak ölçülmemiştir. Bu kültürler MeJA veya MeJA + kitosan (Chi) kombinasyonu ile elisite edilmiştir. Elisitasyondan 2, 4 ve 6 gün sonra bu hücre

kültürlerinden HPLC analizi yapılmış ve paklitaksel, 10-deasetilbakkatin III, bakkatin III, 10-deasetiltaksol, 7-ksilosiltaksol dahil olmak üzere toplam taksan üretiminin, 6 günlük elisitasyondan sonra arttığı saptanmıştır. MeJa + Chi kombinasyonu ile yapılan uygulamalar, taksan üretiminin arttırılmasında tek başına MeJa kullananlardan daha etkili olmuştur (Ottaggio ve diğ., 2006).

Yapılan bir diğer çalışmada ise (Rezaei ve diğ., 2013) fındık hücre süspansiyon kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0.15 mM, 1.5 mM, 3 mM ve 6 mM) fenilalanin uygulamasının paklitaksel üretimine olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre 3 ve 6 mM fenilalanin uygulaması fındık hücre süspansiyon kültürlerinde paklitaksel üretimini arttırmıştır. 6 mM fenilalanin uygulaması sonucunda toplam ve hücre dışı taksan üretimleri sırasıyla 10 ve 3 kat artmıştır. Bu tez çalışması kapsamında Rezaei ve diğ. (2013)'ün yapmış olduğu çalışmanın tersine az miktarda fenilalanin ile gerçekleştirilen elisitasyon uygulamasının kültürlerde de taksan türevi moleküllerin üretiminde arttırdığı gözlenmiştir. 3 μ M Phe ile elisite edilen kültürlerde 10-DAP, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel moleküllerinin üretimlerinde sırasıyla %26, %78, %27 ve %56 oranlarında artış saptanmıştır.

Salehi ve diğ., (2017)'nin yapmış olduğu çalışmanın bulgularına göre, fındık hücre süspansiyonu ile paklitaksel üretimi, *Taxus* hücre süspansiyonlarında bildirilen kadar yüksek değildir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar da *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen taksan türevi sekonder metabolitlerin henüz *Taxus* türlerinden elde edilen miktar kadar yüksek olmadığını göstermektedir.

Benzer şekilde Kutlutürk (2019)'ün yapmış olduğu çalışmada da Türkiye'de yetişen fındık çeşitlerinde 5 farklı fındık dokusunda HPLC analizleri yapılmış ve bu fındıklarda taksan türevi antikanser moleküllerin miktarları belirlenmiştir. Çalışma kapsamında Kalınkara fındığın tüm dokularına bakıldığında, tespit edilen en yüksek 10-DAP miktarı $2,73 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$, en yüksek bakkatin III miktarı $7,53 \pm 1,44 \mu\text{g/g}$, en yüksek sefalomannin miktarı $0,86 \pm 0,58 \mu\text{g/g}$ ve en yüksek paklitaksel miktarı $1,80 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında Kalınkara fındıkta en yüksek 10-DAP miktarı $45,83 \pm 1,49 \mu\text{g/g}$, Bakkatin III miktarı $16,72 \pm 0,65 \mu\text{g/g}$, Sefalomannin miktarı $80,95 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$ ve paklitaksel miktarı $4,62 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$ olarak saptanmıştır.

Kutlutürk (2019)'ün yapmış olduğu çalışmada Tombul fıncığın tüm dokularında yapılan analizler sonucunda en yüksek 10-DAP yalnızca sert kabukta $5,77 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$, Bakkatin III miktarı $10,44 \pm 0,98 \mu\text{g/g}$, sefalomannin miktarı $1,16 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ ve paklitaksel miktarı $0,60 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise Tombul fıncıkta en yüksek 10-DAP miktarı $55,65 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$, Bakkatin III miktarı $35,05 \pm 0,74 \mu\text{g/g}$, Sefalomannin miktarı $2,71 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$ ve paklitaksel miktarı $5,95 \pm 0,17 \mu\text{g/g}$ olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanılarak hem Kalıncara hem Tombul fıncıkta anti kanser taksan moleküllerinin dış dokulara oranla hücre kültürlerinde oldukça yüksek bir oranla üretildiği söylenebilir.

Fıncık gibi daha hızlı büyüyen ve çok daha yaygın bir bitkiden elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinin kullanımı, şimdiye kadar kullanılan porsuk hücre kültüründen daha ümit vericidir. Özellikle, doğrudan fıncık tohumlarından kallus üretimi, kültür süresini kısaltmakta ve somaklonal varyasyonun kısmen üstesinden gelmektedir. Fıncık hücre süspansiyon kültürlerinin kullanılmasının bir başka avantajı, tohumlardan başlatılan *in vitro* kültürlerin, yapraklar, kökler ve kabuk gibi diğer farklılaşmış dokulardan elde edilenlere kıyasla kontaminasyon olasılığını daha aza indirmesidir (Ottaggio ve diğ., 2006).

Bununla birlikte, hızla büyüyen *in vitro* fıncık kültürünün oluşturulmasının, düşük olan paklitaksel verimini telafi edebileceğine dikkat çekmektedir. Gelecek vaat eden bir paklitaksel kaynağı olarak *C. avellana*'nın hücre süspansiyonu, ilaç tedavisinin yüksek maliyetini azaltmada etkili olabilir (Salehi ve diğ., 2017).

Bu tez çalışması süresi boyunca bitki hücrelerinin yavaş bölünme özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, kullanılan 7 farklı fıncık materyalinden Kalıncara ve Tombul fıncıkta taksan türevlerinin miktarlarının arttırılmasına yönelik uygulamaların başarılı bir yaklaşım olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Yapılan elisitasyon çalışmaları ile Türkiye'de yetişen fıncık çeşitlerinde 10-DAP, bakkatin III, sefalomannin ve paklitaksel moleküllerinin miktarları başarıyla artırılmıştır. Bu sonuç, ileri optimizasyon çalışmaları (farklı elisitörler, farklı dozlar, öncül madde uygulamaları) ile fıncık hücre kültürlerinde paklitaksel ve diğer taksan türevi molekülün üretimlerinin arttırılabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, optimize edilmiş bir yöntem geliştirerek, fındık türlerinin hem yeni terapötik ajanlar olarak hem de Taxol[®] ve/veya Taxotere[®] yarı sentezi için yeni öncüler olarak kullanılmak üzere yeni bir ticari taksan kaynağı olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Babaoğlu, M., Gürel, E. & Özcan, S., 2001, *Bitki Biyoteknolojisi-I: Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, ISBN: 975-6652-04-7
- Baloglu, E. & Kingston, D.G.I., 1999, A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *Journal of Natural Product*, 62, 1068-1071.
- Baque, A., Moh, S. & Lee, E., 2012, Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor, *Biotechnology Advances*, 30, 1255-1267.
- Bemani, E., Ghanati, F., Rezaei A. & Jamshidi, 2012, Effect of phenylalanine on Taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells, *Journal of Natural Medicines*, 67, 446-451.
- Bernabeu, E., Cagel, M., Lagomarsino, E., Moretton, M. & Chiappetta, D.A., 2017, Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead, *International Journal of Pharmaceutics*, 526, 474-495.
- Bernabeu, E., Gonzalez, L., Cagel, M., Gergic, E.P., Moretton, M.A. & Chiappetta, D.A., 2016, Novel Soluplus[®]-TPGS mixed micelles for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 403-411.
- Besteso, F., Ottagio, L., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Armirotti, A., Ledda, B. & Miele, M., 2006, *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *BMC Biotechnology*, 6, 45.
- Bhagwath, S.G. & Hjortsø, M.A., 2000, Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*, *Journal of Biotechnology*, 80, 159-167.
- Bhatia, S. & Bera, T., 2015, *Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell culture*, Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences, In: Bhatia, S., Chapter 7, Academic press, Hindistan, ISBN: 9780128022214, 231-291.
- Biggs, B.W., Lim, C.G., Sagliani, K., Shankar, S., Gregory, S. & Marjan, M., 2016, Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol[®] precursor synthesis in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113, 3209-3214.
- Brahn, E., 1996, Use of Taxol[®] in the treatment of rheumatoid arthritis, Google Patents.
- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., Smetanska, I., 2012, Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures, *Plant Cell Reports*, 31, 461-477.

- Ciddi, V., Srinivasan, V. & Shuler, M.L., 1995, Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of Taxol[®], *Biotechnology Letters*, 17, 1343-1346.
- Ciura, J., Szeliga, M. & Tyrka, M., 2015, Optimization of *in vitro* culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek, *Journal of Medicinal Plants*, 3 (3), 22-25.
- Clarke, D.J. & Gimenez, J.F., 2000, Checkpoints Controlling Mitosis, *Bioessays*, 22 (4), 351-363.
- Croteau, R., 1998, The discovery of terpenes, *Discoveries in Plant Biology*, 1, 329-343.
- Crown, J., O'Leary, M. & Ooi, W.S., 2004, Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: A review of clinical experience, *Oncologist*, 9, 24-32.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kraufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A. & Brielmann, H.L., 2006, *Natural Products from Plants*, Taylor&Francis Group, New York, ISBN: 978-0-8493-2976-0.
- Dadgar, S., Ramjan, Z. & Floriano, W.B., 2013, Paclitaxel is an inhibitor and its boron dipyrromethene derivative is a fluorescent recognition agent for botulinum neurotoxin subtype, *American Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 2791-2803.
- Denis, J.N., Greene, A.E., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., Mangatal, L. & Potier, P., 1988, Highly efficient, practical approach to natural Taxol[®], *Journal of American Chemical Society*, 110, 5917-5919.
- Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S. & Yang, A., 2006, Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of Cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with Cremophor-based paclitaxel, *Clinical Cancer Research*, 12, 1317-1324.
- Ehrlich, A., 2004, Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study, *Journal of American Academy of Dermatology*, 50, 533-540.
- Eknankul, W. & Ellis, B.E., 1988, *Rosmarinic acid: production in plant cell culture*, Medicinal and aromatic plants I; Biotechnology in agriculture and forestry, In: Bajaj, Y.P.S. (ed), Chapter II, Springer, Berlin, 310-329.
- Espinosa, C.A., Puente, C., A. & Garcia, S., 2018, *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds, *Planta*, 248 (1), 1-18.
- Esposito, T., Sansone, F., Franceschelli, S., DelGaudio, P., Picerno, P., Aquino, R.P. & Mencerini, T., 2017, Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: Phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2), 392.
- FAO, 2019, Kaynak: <http://www.fao.org/3/x4484e/x4484e03.htm>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].

- FAO, 2019, Kaynak: <http://www.fao.org/3/x4484e/x4484e03.htm>, [Ziyaret Tarihi: 15.05.2020].
- FDA 2010, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/201023lbl.pdf cabazitaxel, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- FDA, 2009, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021660s022lbl.pdf abraxine, [Ziyaret Tarihi: 11.05.2020].
- FDA, 2010, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/201023lbl.pdf cabazitaxel, [Ziyaret Tarihi: 11.05.2020].
- FDA, 2013, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/020449s071lbl.pdf taxotere, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- FDA, 2013, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/020449s071lbl.pdf taxotere, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- FDA, 2019, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020262s049lbl.pdf taxol, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- Foley, E.A. & Kapoor, T.M., 2013, Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 25-37.
- Furie, H., 2003, Chemotherapy Cancer Treatment During the Past Sixty Years, *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*, 30 (10), 1404-1411.
- Gallego, A., 2015, *Corylus avellana*: a new biotechnological source of anticancer agents, Doktora Tezi, Universitat Pompeu Fabra Departament de ciències experimentals i de la salut.
- Gallego, A., Malik, S., Yousefzadi, M., Makhzoum, A., Tremouillaux-Guiller, J. & Bonfill, M., 2017, Taxol® from *Corylus avellana*: Paving the way for a new source of this anticancer drug, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 129, 1-16.
- Gond, S., Kharwar, R. & White, J., 2014, Will fungi be the new source of the blockbuster drug taxol?, *Fungal Biology Reviews*, 28 (4), 77-84.
- Gongbao, 2000, Kaynak: http://www.gov.cn/gongbao/content/2000/content_60072.htm, Ziyaret Tarihi: 09.06.2020]
- Grech-Baran, M. & Pietrosiuk A., 2012, *Artemisia* species *in vitro* cultures for production of biologically active secondary metabolites. *Biotechnology Journal*, 93 (4), 371-380.
- Güven, A. & Gürsul, I., 2014, Bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.

- Haberlandt, G., 1902, Culturversuche mit isolierten Pflanzellen. Sitzungsber Akad Wiss Wien Math, *Nature*, 111, 69-91.
- Hoffman, A., 1998, Bioprospecting for Taxol in angiosperm plant extracts-Using high performance liquid chromatography thermospray mass spectrometry to detect the anticancer agent and its related metabolites in Filbert trees, *Spectroscopy*, 13(6), 22-32.
- Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biediger, R.J. & Boatman, P.D., 1994, First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring, *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 34(2), 103-117.
- Howat, S., Park, B., Oh, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. & Loake, G.J., 2014, Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects, *New Biotechnology*, 31, 242-245.
- Huang C, Qian Z-G, Zhong J-J ,2013, Enhancement of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by N,0-dicyclohexylcarbodiimide elicitation, *Journal of Biotechnology*, 165, 30-36.
- Huang, Q., Roessner, C.A., Croteau, R. & Scott, A.I., 2001, Engineering Escherichia coli for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9 (9), 2237-2242.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. & Iwase, A., 2013, Plant callus: mechanisms of induction and repression, *The Plant Cell*, 25(9):3159-73.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. & Puri, S., 2018, Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 26-38.
- Julsing, M.K., Koulman, A., Woerdenbag, H.J., Quax, W.J. & Kayser, O., 2006, Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*, 23, 265-279.
- Karaosmanoğlu, H. & Üstün, Ş., 2017, Organik ve Konvansiyonel Fındıkların (*Corylus avellana* L.) Bazı Fiziksel Özellikleri, *Akademik Gıda*, 15 (4), 377-385.
- Kasaei, A., Dehkordi, M.M., Mahjoubi, F. & Saffar, B., 2017, Isolation of Taxol-Producing Endophytic Fungi from Iranian Yew Through Novel Molecular Approach and Their Effects on Human Breast Cancer Cell Line, *Current Microbiology*, 74 (6), 702-709.
- Ketchum, R.E.B. & Gibson, D.M., 1996, Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46, 9-16.
- Khan, T., Krupadanam, D. & Anwar, S.Y., 2008, The role of phytohormone on the production of berberine in the calli cultures of an endangered medicinal plant, turmeric (*Coscinium fenestratum* L.), *African Journal of Biotechnology*, 7 (18), 3244-3246.
- Kliebenstein, D.J., 2012, Plant defense compounds: systems approaches to metabolic analysis, *Annual Review of Phytopathology*, 50, 155-173.

- Kutlutürk, G., 2019, Türkiye’de yetişen fındık (*Corylus avellana*) çeşitlerinde antikanser taksanların analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü.
- Lesterhuis, W.J., Cornelis, J.A.P., Hato, S.V., Dagmar, E.T., Bastiaan, J.H.J. & Stefan, N., 2011, Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice, *Journal of Clinical Investigation*, 121 (8), 3100.
- Liu, W. C., Gong, T. & Zhu, P., 2016, Advances in exploring alternative Taxol sources, *Royal Society of Chemistry Advances*, 6, 48800-48809.
- Lodha, D., Rathore, N., Kataria, V. & Shekhawat, N.S., 2014, *In vitro* propagation of female *Ephedra foliata* Boiss. & Kotschy ex Boiss.: an endemic and threatened Gymnosperm of the Thar desert, *Physiological Molecular Biology of Plants*, 20 (3), 375-383.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A.i Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaire, P., 2011, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, a division of Bedford, New York USA, Chapter 21, ISBN: 978-0-7167-7601-7.
- Lou, J., Niu, X.L., Yan, F., Pan, J. & Zhu, X.D., 2011, Recent progresses in the studies of taxol and taxane-producing fungi, *Mycosystema*, 30, 158-167.
- Mandai, T., Kuroda, A., Okumoto, H., Nakanishi, K., Mikuni, K., Hara, K.J. & Hara, K.Z., 2000, A semisynthesis of paclitaxel via a 10-deacetylbaaccatin III derivative bearing a β -keto ester appendage, *Tetrahedron Letters*, 41, 243-246.
- Martin, M., 2015, nab-Paclitaxel dose and schedule in breast cancer, *Breast Cancer Research*, 17 (1), 81.
- Merck, 2020, Kaynak: <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/murashige-skoog.html>, [Ziyaret Tarihi: 15.05.2020].
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Nagella, P. & Murthy, H.N., 2011, Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide- A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* Dunal, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 104, 119-124.
- Naik, P. & Khayri, J., 2016, *Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary metabolite production through invitro culture*, Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives, In: Shancer, A. (ed), Chapter 10, IntechOpen, Hindistan, 247-277.
- Narayani, M. & Srivastava, S., 2017, Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production, *Phytochemistry Reviews*, 16 (6), 1227-1252.

- Nasim, A.S., Dhir, B. & Kapoor, R., 2010, Allin production in various tissues and organs of *Allium sativum* grown under normal and sulphur-supplemented in vitro conditions, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 101, 59-63.
- Nature 2019b, Kaynak: <https://www.naturepl.com/search?s=taxus+brevifolia>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- Nature, 2019a, Kaynak: [https://www.naturepl.com/stock-photo/hazel-\(corylus-avellana\)-close-up-image-of-female-flower-hertfordshire/search/detail-0_01613664.html](https://www.naturepl.com/stock-photo/hazel-(corylus-avellana)-close-up-image-of-female-flower-hertfordshire/search/detail-0_01613664.html), [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- News Medical, 2018, Kaynak: <https://www.news-medical.net/health/Paclitaxel-Production.aspx>, [Ziyaret Tarihi: 05.05.2020].
- Ojedalopez, M.A., Needleman, D.J., Song, C., Ginsburg, A., Kohl, P.A. & Li, Y., 2014, Transformation of taxol-stabilized microtubules into inverted tubulin tubules triggered by a tubulin conformation switch, *Nature Materials*, 13 (2), 195-203.
- Onrubia, M., Cusidó, R.M., Ramirez, K., Hernández-Vázquez, L., Moyano, E., Bonfill, M. & Palazon, J., 2013, Bioprocessing of plant *in vitro* systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: paclitaxel and its derivatives, *Current Medicinal Chemistry*, 20 (7), 880-891.
- Pelvan, E., Alasalvar, C. & Uzman, S., 2012, Effects of roasting on the antioxidant status and phenolic profiles of commercial turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (5), 1218-1223.
- Pichersky, E. & Raguso, R., 2018, Why do plants produce so many terpenoid compounds?, *New Phytologist*, 220 (3), 692-702.
- Pickens, L.B., Tang, Y., Chooi, H., 2011, Metabolic engineering for the production of natural products, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 211-236.
- Raj, D., Kokotkiewicz, A. & Luczkiewicz, M., 2015, Production of therapeutically relevant indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* *in vitro* shoots maintained in liquid culture systems, *Applied Biochemical Biotechnology*, 175 (3), 1576-1587.
- Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M. & Dizaji, M.M., 2011, Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of Taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 1938-1947.
- Rivera, E. & Cianfrocca, M., 2015, Overview of neuropathy associated with taxanes for the treatment of metastatic breast cancer, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75, 659-670.
- Roberts, S.C., 2007, Production and engineering of terpenoids in plant cell culture, *Nature Chemical Biology*, 3, 387-395.

- Rusu, M., Fizeşan, I., Pop, A., Gheldiu, A.M., Mocan, A., Crişan, G., Vlase, L., Loghin, F., Popa, D.S. & Tomuta, I., 2019, Enhanced recovery of antioxidant compounds from hazelnut (*Corylus avellana* L.) involucre based on extraction optimization: Phytochemical profile and biological activities, *Antioxidants*, 8 (10), 460.
- Sahu, R., Gangopadhyay, M. & Dewanjee, S., 2013, Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1473-1481.
- Schiff, P.B., Fant, J. & Horwitz S.B., 1979, Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol®, *Nature*, 277, 665-667.
- Seca, A. & Pinto, D., 2018, Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 263.
- Shilpashree, H.P. & Rai, V.R., 2009, *In vitro* plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorens*, *International Journal of Integrative Biology*, 8 (1), 43-49.
- Spigel D.R., Patel, J.D., Reynolds, C.H., Garon, E.B., Hermann, R.C. & Govindan, R., 2015, Quality of life analyses from the randomized, open-label, phase III PointBreak study of pemetrexed-carboplatin-bevacizumab followed by maintenance pemetrexed-bevacizumab versus paclitaxel-carboplatin-bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patie, *Journal of Thoracic Oncology*, 10, 353-359.
- Steingroewer, J., Bley, T. & Georgiev V., 2013, Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems, *Engineering in Life Science*, 13, 26-38.
- Stierle, A., Strobel G., Stierle, D., 1993, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew, *Science*, 260, 214-216.
- Sudha, C.G., Reddy, B.O., Ravishankar, G.A. & Seenii, S., 2003, Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant, *Biotechnology Letters*, 25 (8), 631-636.
- Synder, L.R., 2000, HPLC: Past and Present, *Analytic Chemistry*, 72 (11), 412-420.
- T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2020, Kaynak: (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=26>), [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- T.C. Tarım Orman Bakanlığı, 2020, Kaynak: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/findik/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=4>, [Ziyaret Tarihi: 04.05.2020].
- T.C. Ticaret Bakanlığı, 2018, Kaynak: <https://ticaret.gov.tr/data/5d41e59913b87639ac9e02e8/5c41e34d540794faaa011bdfa3466ff3.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].

- T.C. Ticaret Bakanlığı, 2019, Kaynak: <https://ticaret.gov.tr/data/5d41e59913b87639ac9e02e8/5c41e34d540794faaa011bdfa3466ff3.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- Tabata, H., 2006, Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species, *Current Drug Targets*, 7, 453-461.
- Tassou, C.C., Chorianopoulos, N.G., Skandamis, P.N. & Nychas, G.J.E., 2012, *Herbs, spices and their active components as natural antimicrobials in foods*, Handbook of herbs and spices, In: Peter, K.V., (ed)., Chapter 2, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, 17-50.
- Temizkan, G. & Arda, N., 2018, *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler*, Nobel Tıp Yayınları, İstanbul, 9786053353621.
- Tisserat, B. & Berhow, M., 2009, Production of pharmaceuticals from *Papaver* cultivars *in vitro*, *English Life Science*, 9 (3), 190-196.
- USDA, 2020, Kaynak: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=COAV80>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- Vassileva, V., Allen, C.J. & Piquette-Miller, M., 2008, Effects of sustained and intermittent paclitaxel therapy on tumor repopulation in ovarian cancer, *Molecular Cancer Therapy*, 7, 630-637.
- Villarreal, M. O., Howat, S., Hong, S., Jang, M.O., Jin, Y.W., Lee, E.K. & Loake, G.J., 2016, Plant cell culture strategies for the production of natural products, *BMB Reports*, 49 (3), 149-158.
- Vrignaud, P., Semiond, D., Benning, V., Beys, E., Bouchard, H. & Gupta, S., 2014, Preclinical profile of cabazitaxel, *Drug Desing, Development and Therapy*, 8, 1851-1867.
- Wang, X.H., Zhang, L., Li, X.C., Kong, D., Hu, X. & Ding, X., 2018, Nanoformulated paclitaxel and AZD9291 synergistically eradicate non-small-cell lung cancers *in vivo*, *Nanomedicine*, 13(10), 1107-1120.
- Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P. & McPhail, A., 1971, Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-2327.
- Waters, J.C., Chen, R.H., Murray, A.W. & Salmon, E.D., 1998, Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension, *Journal of Cell Biology*, 141, 1181-1191.
- Weathers, P.J., Bunk, G., McCoy, M.C., 2005, The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 1 (1), 47-53.
- Weaver, B.A., 2014, How Taxol/paclitaxel kills cancer cells, *Molecular Biology of the Cell*, 25, 2677-2681.

- Weiss, R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H., Ohnuma, T., Gralla, R.J. & Trump, D.L., 1990, Hypersensitivity reactions from Taxol, *Journal of Clinic Oncology*, 8, 1263-1268.
- Wen, G., Qu, X.X., Wang, D., Chen, X.X., Tian, X.C., Gao, F. & Zhou, X.L., 2016, Recent advances in design, synthesis and bioactivity of paclitaxel-mimics, *Fitoterapia*, 110, 26-37.
- WHO, 2019, Kaynak: <https://www.who.int/cancer/en>, [Ziyaret Tarihi: 09.06.2020].
- Wu, J. & Lin, L., 2003, Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound methyl jasmonate and in situ solvent extraction, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 151-155.
- Wu, J., Wang, C. & Mei, X., 2001, Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum, *Journal of Biotechnology*, 85, 67-73.
- Xu, X., Wang, L., Xu, H.Q., Huang, X.E., Qian, Y.D. & Xiang, J., 2013, Clinical comparison between paclitaxel liposome (Lipusu®) and paclitaxel for treatment of patients with metastatic gastric cancer, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 2591-2594.
- Zhu, L. & Chen, L., 2019, Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 24 (1), 1-11.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İlayda GÖKTEPE
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	05.12.1995
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0(533) 045 6933
E-Posta Adresi	ilayda.goktepe@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Göktepe, İ. & Arı, Ş., 2019, Elicitor Treatments on Hazelnut Cell Cultures for Production of Taxanes, <i>II. International Green Biotechnology Congress</i>, 09-11 September 2019, İstanbul, 46. Arı, Ş., Kutlutürk, G.Z., Karagül, B., Göktepe, İ., Aksyoy, E.S. & Uğraş, H.İ., 2019, Anticancer Taxanes in Turkish Hazelnut, <i>17th Annual Symposium in Plant Biology</i>, 12 October 2019, Boston, Poster presenter list no: 2.	