



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN FINDIK (*Corylus avellana* L.)
ÇEŞİTLERİNDE ANTİKANSER TAKSANLARIN ANALİZİ**

Gülbahar Zehra KUTLUTÜRK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

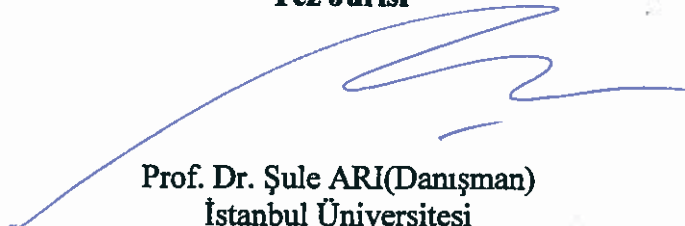
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şule ARI**

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



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



Prof. Dr. Sabriye PERÇİN
ÖZKORUCUKLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Trakya Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



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.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2018-31616 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda bana merak ettiğim konuyu araştırma fırsatı veren ve çalışmanın her aşamasında tecrübesini, bilgisini ve değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta destek olan ayrıca akademik hayatım boyunca yararlanacağım bilimsel çalışma disiplini öğreten çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Şule ARI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans ders dönemimde verdikleri bilgiler ile ufkumu açan İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın çok değerli hocalarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin laboratuvar imkânlarını bana sunan sayın Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ'a ve bu süreçte benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan çok değerli doktora öğrencileri Elif Sine DÜVENCİ ve Bora KARAGÜL'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam için gerekli olan bitki materyallerinin teminini sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nün çok değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Ümit SERDAR'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım olan ve eğitim hayatım boyunca maddi/manevi desteğini esirgemeyen, aldığım her kararda yanımda hissettiğim sevgili aileme, sevgi ve saygılarımı sunarım. Bu çalışma onlara ithaf edilmiştir.

Temmuz 2019

Gülbahar Zehra KUTLUTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1 KANSER.....	4
2.2 TAKSOL	5
2.2.1 Porsuk Bitkisi (<i>Taxus spp.</i>).....	5
2.2.2 Taksol'ün Tarihçesi	6
2.2.3 Taksol Üretimi.....	11
2.3 TAKSAN DİTERPENOİD KİMYASI.....	12
2.4 TAKSOL ETKİ MEKANİZMASI	15
2.5 TAKSOL ÜRETİMİ İÇİN ALTERNATİF YÖNTEMLER.....	17
2.6 FINDIK BİTKİSİ	20
2.6.1 Türkiye'de Fındık Üretiminin Önemi	20
2.6.2 Türkiye'de Yetiştirilen Fındık Çeşitleri	21
2.6.3 Fındıkta (<i>Corylus avellana L.</i>) Yapılan Taksan Türevi Maddelerin Tespit Çalışmaları.....	24
2.7 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (HPLC).....	27
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	31
3.2. ÖN HAZIRLIK	31
3.3. ÖĞÜTME İŞLEMİ	31
3.4. TARTMA İŞLEMİ.....	32
3.5. ÇÖZÜCÜ MUAMELESİ.....	32
3.5.1. Yağdan Arındırma	32

3.5.2. Metanol Ekstraksiyonu	32
3.6. SÜZME İŞLEMİ.....	33
3.7. EVAPORASYON İŞLEMİ.....	33
3.8. VİALLEME İŞLEMİ	33
3.9. HPLC (YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ) ANALİZİ	34
3.9.1 Taksan standartlarının HPLC analizi.....	34
3.9.2 Fındık çeşit ve genotip dokularının HPLC analizi	35
3.10. İSTATİSTİK ANALİZ	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. TAKSAN DİTERPENOID STANDARTLARININ HPLC ANALİZİ.....	38
4.2. KALİBRASYON EĞRİSİNİN ÇİZİLMESİ	38
4.3. 7 FARKLI FINDIK ÇEŞİDİNİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI.....	39
4.3.1. 10 - deasetil bakkatin III HPLC Analiz Sonuçları.....	41
4.3.2. Bakkatin III HPLC Analiz Sonuçları	42
4.3.3. Sefalomanin HPLC Analiz Sonuçları.....	44
4.3.4. Paklitaksel HPLC Analiz Sonuçları	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	60
EKLER	67
EK 1. Taxus türlerinde bulunan taksan türevi bileşiklerin miktarları ile, bu tez çalışmasında kullanılan ve Türkiye’de yetişen fındık dokularında (<i>Corylus avellana L.</i>) en yüksek miktarda tespit edilen taksan türevi bileşiklerinin karşılaştırılması (µg/g). Ortalama ± Standart sapma (n = 3), (µg/g kuru ağırlık).....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Akciğer kanserinin kemoterapi tedavisinde Taxol®'ün uygulanması (Carlina technologies, 2019).....	5
Şekil 2.2: Porsuk ağacı (<i>Taxus spp.</i>) (Impact Plants, 2019)	6
Şekil 2.3: Taxol üretim kronolojisi.. ..	10
Şekil 2.4: Taksan diterpenoidlerin (10-deasetilbakkatin III, bakkatin III, sefhalomanin ve paklitaksel) kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.5: Taksol iskeletinde yapı-aktivite ilişkisi (Kingston, 1994).	14
Şekil 2.6: Taksol'ün hücre mikrotübülünde β –tübüline bağlanması (McGrogan ve diğ., 2008).....	17
Şekil 2.7: Dünya Fındık Üretimi (ton) (TUIK, 2018).	21
Şekil 2.8: HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Okanongan, 2019).....	30
Şekil 3.1: 4 farklı standart bileşiğinin alıkonma zamanlarının karşılaştırılma kromatogramı.	35
Şekil 4.1: HPLC analizinde 228 nm'de standart bileşiklerinin alıkonma zamanını gösteren kromatogram.	38
Şekil 4.2: Kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.3: 10 - deasetil bakkatin III'ün en çok tespit edildiği Ham fındığın sert kabuk kromatogramı.	42
Şekil 4.4: 10 - deasetil bakkatin III'ün tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı dokusunda $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.	42
Şekil 4.5: Bakkatin III' ün en çok tespit edildiği Tombul fındığın ince kabuk dokusunun yakınlaştırılmış kromatogramı.....	44
Şekil 4.6: Bakkatin III'ün tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı bölgesindeki $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.....	44
Şekil 4.7: Sefalomanin'in en çok tespit edildiği Sivri Yağlı fındığın ince kabuk dokusunun kromatogramı.....	46
Şekil 4.8: Sefalomanin'in tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı dokusunda $\mu\text{g/g}$ miktarların sütun grafiği.	46

Şekil 4.9: Paklitaksel'in en fazla miktarda tespit edildiği Ham fındığın ince kabuklu meyvesinin yakınlaştırılmış kromatogramı.	48
Şekil 4.10: Paklitaksel'in tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı bölgesindeki $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.....	48



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Dünya Fındık Üretimi (ton) (TUIK, 2018)..	21
Tablo 3.1: Farklı fındık dokularında ekstraksiyon için kullanılan çözücüler ve uygulama koşulları.	33
Tablo 4.1: 5 farklı çeşit (Çakıldak, Kalıncara, Palaz, Sivri fındık) ve 2 farklı genotip (Ham, Sivri Yağlı fındık) fındığın her birinin 5 ayrı dokusunda yapılan HPLC analiz sonuçları.	40



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
nm	: Nanometre
µm	: Mikrometre
mL	: Mililitre
°C	: Santigrad Derece
h	: Saat
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
µg	: Microgram
L	: Litre
mg	: Miligram

Kısaltmalar	Açıklama
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
rpm	: Revolutions per Minute
km	: Kilometre
MetOH	: Metanol
ppm	: Parts per million
dk	: Dakika
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
CCNSC	: Kanser Kemoterapi Ulusal Hizmet Merkezi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
MeJA	: Metil jasmonat

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’DE YETİŞEN FINDIK (*Corylus avellana* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTİKANSER TAKSANLARIN ANALİZİ

Gülbahar Zehra KUTLUTÜRK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şule ARI

Taksan türevi bir madde olan Taksol, Taxol® adı altında tescilli bir kanser ilacıdır. Taksol, kanser tedavisi için 1960 yılında Amerika da başlatılan bitki tarama programı sonucunda ilk kez 1971 yılında *Taxus brevifolia* dan elde edilmiştir. Taxol® birçok kanser türünde mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayan bir kemoterapi ilacı olarak kullanılmaktadır. Porsuk ağacının üretilmesinin zor olması ve taksol ihtiyacının karşılanabilmesinde kullanılan hücre kültürü gibi biyoteknolojik yöntemlere karşın günümüzde halen farklı bitki türlerinde taksan türevi maddelerin araştırılmasına devam edilmektedir. Türkiye dünyanın en büyük fındık üreticisi ve ihracatçısıdır. Bu tezde Türkiye’de yetiştirilen Çakıldak, Sivri, Tombul, Palaz ve Kalıncara fındık çeşitleri ile Ham ve Sivri Yağlı fındık genotipleri kullanıldı. Bu fındıkların 5 ayrı dokusu (Çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve) bulundurdıkları taksan türevi maddelerin varlığı ve miktarı açısından ilk kez incelendi. Her fındığa ait 5 ayrı doku materyali metanol ile ekstre edildi ve ekstrelerde HPLC analizi ile taksan türevi bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı. Taksan türevlerinden 10 deasetilbakkatin III, bakkatin III ve sephalomanin, incelenen fındık çeşidi ve genotiplerin dokularında farklı

miktarlarda tespit edildi. Paklitaksel ise fındıklar arasında sadece Ham, Palaz, Kalıncara ve Sivri fındıklarda belirlendi.

10 deasetilbakkatin III'ün analizi yapılan tüm fındıklarda, diğer tüm dokulara göre en fazla sert kabuklarda bulunduğu belirlendi. Sırasıyla, 10 deasetilbakkatin III'ü en fazla içeren fındıklar ve miktarları Ham (9,48 µg/g), Tombul (5,76 µg/g), Sivri (4,75 µg/g), Sivri Yağlı (4,26 µg/g), Kalıncara (2,72 µg/g), Çakıldak (2,26 µg/g) ve Palaz (2,12 µg/g) olarak bulundu.

Analizi yapılan tüm fındıklarda bakkatin III'ün diğer fındık dokularına kıyasla en fazla ince kabuk dokularında bulunduğu tespit edildi. Sırasıyla, bakkatin III'ün en fazla tespit edildiği fındıklar ve miktarları Tombul (10,44 µg/g), Kalıncara (7,53 µg/g), Ham (6,21 µg/g) ve Sivri Yağlı (4,65 µg/g) olarak belirlendi.

Tüm fındıkların ince kabuklu meyve ve ince kabuk dokularında sefalomanin miktarının birbirine yakın değerlerde diğer dokulara kıyasla daha fazla bulunduğu belirlendi. Sırasıyla, Sivri Yağlı fındığın ince kabuğunda (6,37 µg/g) ve ince kabuklu meyvesinde (5,34 µg/g), Sivri (5,14 µg/g) ve Palaz (4,74 µg/g) ince kabuklu meyvesinde ve Ham ince kabuk dokusunda (4,31 µg/g) olarak bulundu.

Dünyada kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan Taxol® ilacının ham maddesi olan Paklitaksel ise, bu tez çalışmasında ilk kez analizi yapılan 5 farklı fındık çeşidinin ve 2 genotipin çotanaklarında diğer dokulara kıyasla belirgin olarak fazla miktarda bulundu. Paklitakselin analiz edildiği fındıkların çotanak dokularındaki miktarları sırasıyla, Palaz (3,37 µg/g), Ham (1,98 µg/g) ve Kalıncara (1,80 µg/g) dır. Paklitaksel analizi için önemli diğer bir sonuç ise Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde (4,36 µg/g) tespit edilen paklitaksel miktarının diğer dokulara kıyasla fazla bulunması oldu.

Bu sonuçlar, dünyada en yaygın kemoterapi ilacı olarak kullanılan Taxol® için fındığın (*Corylus avellana L.*) alternatif bir ham madde kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Temmuz 2019, 82 sayfa.

Anahtar kelimeler: Fındık, *Corylus avellana L.*, Taksan diterpenoid, HPLC, Antikanser.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ANALYSIS OF ANTICANCER TAXANES IN HAZELNUTS (*Corylus avellana* L.) GROWN IN TURKEY

Gülbahar Zehra KUTLUTK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Şle ARI

Taxol®, a taxane-derived substance was first obtained from *Taxus brevifolia* in 1971 as a result of the plant screening program initiated in the USA in 1960 for cancer treatment. Taxol® is used as a chemotherapy drug to stabilize microtubules in many types of cancer. As it is difficult to grow *Taxus spp.* and to use biotechnological methods such as cell culture in order to meet the need for taxol substances which are derivatives of taxane have been searched for in different plants. Turkey is the biggest hazelnut producer and exporter in the world. In this thesis, Çakıldak, Sivri, Tombul, Palaz, Kalınkara hazelnut varieties and Ham, Sivri Yağlı hazelnut genotypes were analysed in 5 different tissues of these hazelnut varieties and genotypes (green shells, hard shells, thin skins, thin skinned kernels and kernels) were examined in terms of their taxane types and their amount for the first time. Five tissues from each hazelnut varieties were extracted and the taxane derivative components in the extracts were analysed both qualitatively and quantitatively with HPLC. Different quantities of taxane derivatives 10 deacetylbaccatin

baccatin III and cephalomannine were identified in all hazelnuts. Paclitaxel was seen only in Ham, Palaz, Sivri ve Kalinkara hazelnuts.

10 deacetylbaccatin III was found in hard shell compared to all the other analysed hazelnut varieties and tissues mostly. Hazelnuts which included 10 deacetylbaccatin III with the highest amount were Ham (9,48 µg/g), Tombul (5,76 µg/g), Sivri (4,75 µg/g), Sivri Yağlı (4,26 µg/g), Kalinkara (2,72 µg/g), Çakıldak (2,26 µg/g) ve Palaz (2,12 µg/g) respectively.

Baccatin III was found to have the highest amount of thin skins compared to other hazelnut tissues. The highest amount of hazelnut and baccatin III was detected in Tombul (10,44 µg/g), Kalinkara (7,53 µg/g), Ham (6,21 µg/g) ve Sivri Yağlı (4,65 µg/g) respectively.

It was determined that the higher amount of cephalomannine was in thin skinned kernels and thin skins compared to other tissues of all hazelnuts. Cephalomannine was found mostly thin skins (6,37 µg/g) and thin skinned kernels (5,34 µg/g) of Sivri Yağlı, thin skinned kernels of Sivri (5,14 µg/g) and Palaz (4,74 µg/g), thin skins of Ham (4,31 µg/g) respectively.

Paclitaxel, the raw material of Taxol®, which is widely used for cancer treatment in the world. It was found to be significantly higher in the tissues of 5 different hazelnut varieties and 2 genotypes analyzed for the first time in this thesis than the other tissues. The quantities of paclitaxel were analyzed by Palaz (3.37 µg / g), Ham (1.98 µg / g) and Kalinkara (1.80 µg / g), respectively. Another important result for paclitaxel analysis was that the amount of paclitaxel detected in the thin skinned kernel of the hazelnut (4.36 µg / g) was higher than the other tissues.

These results showed that hazelnut (*Corylus avellana L.*) may be an alternative source of raw material for Taxol, which is the most common chemotherapy drug in the World.

July 2019, 82 pages.

Keywords: Hazelnut, *Corylus avellana L.*, Taxane diterpenoid, HPLC, Anticancer.

1. GİRİŞ

Vücudumuzun yapıtaşı hücrelerdir ve bütün organlarımız hücrelerden meydana gelir. Her hücrenin belirli bir ömrü vardır, ölen hücrelerin yenilenebilmesi için hücrelerin büyüme, bölünme ve ölüm (apoptoz) olayları arasında bir denge vardır. Bu denge çeşitli sebepler ile bozulursa hücreler kontrol dışı büyümeye başlar ve kanser gelişir. Kanser hücreleri birikerek kitlesel yapıda tümörleri oluştururlar. Tümörler bulundukları bölgede normal vücut işleyişini kesintiye uğratırlar, dokuya ve canlıya ölümle sonuçlanabilecek zararlar verirler (Vermeulen ve diğ., 2003). Kanser tedavisi için yıllardır bilimsel çalışmalar devam etmekle birlikte cerrahi müdahale, gen terapisi, immunoterapi, radyoterapi ve kemoterapi günümüzde tercih edilen tedavi uygulamalarıdır. Kemoterapi, kanser yelpazesinde gösterdiği yaygın etki ile diğer uygulamalardan daha çok tercih edilmektedir. Kemoterapide amaç kanserli hücrenin yok edilmesi ve metastazın engellenmesidir (Kütük, 2016). Bu amaç ile üretilecek Taxol® gibi etkili kemoterapötik ilaçlar önem arz etmektedir.

Dünyadaki ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ölümlerin en büyük nedeni kanserdir. Dünyada 6 kadından biri ve 5 erkekten biri hayatları boyunca bir kez kanser hastalığına yakalanmaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme, akciğer, serviks ve tiroid kanseri iken erkeklerde mide, prostat ve akciğer kanseri en yaygın olarak görülen türlerdir. Kanser 2018 yılında 9,6 milyon ölümün nedeni olmuş ve yapılan çalışmalar 2040 yılına kadar kanser nedeni ile gerçekleşecek ölümlerin 29,5 milyona ulaşacağını göstermektedir (WHO, 2019). Bu derece ciddi ölümlere neden olan hastalığın tedavisi için çeşitli yöntemler araştırılmaktadır. Bunlardan en önemli olanı doğal kaynaklardan elde edilen ham maddelerin ilaç olarak kullanılmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunu %80'inin herhangi bir sağlık sorununda ilk önce bitkisel ilaç ve kaynaklarla çözmeye çalıştıklarını bildirmektedir. Ayrıca WHO, "Geleneksel Tıp Stratejileri" programını başlatarak modern tıbbı destek olacak şekilde geleneksel tedavi yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşmasını teşvik etmektedir. Tıbbi bitkilerin kullanımı tarih boyunca insanların hayatında var olmuştur. Mitolojide tanrının insanlara verdiği en değerli hediye bitkiler olduğundan bahsedilmektedir (Qi, 2013). Yapılan çalışmalarda ölümlerin tekrar yaşama döndüğünde kullanabilmesi için mezarlarına kanarya otu, civanperçemi, gül hatmi gibi bitkilerin konulduğu tespit edilmiştir. Bu durum bitkilerin şifalı ve yenenler diye o zamanlarda da gruplandırıldığı düşünülmektedir. Bu

bitkilerin bir kısmı günümüzde de şifalı / tıbbi bitki olarak önemini korumakta ve kullanılan birçok ilacının hammaddesini oluşturmaktadır. Örneğin; söğüt ağacından elde edilen aspirin, yüksük otundan digoksin ve Afyon haşhaşından morfin günümüzde sıklıkla kullanılan ilaçlardır Dünya ilaç pazarının %30'a yakını doğal hammadde kaynaklıdır ve ayrıca ABD'de reçeteli ilaç olarak satılan ilaçların %25'i bitkilerden elde edilmiş en az bir aktif bileşen içermektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Hastalıkların tedavisinde bitkilerin yeri bu kadar önemliyken modern kanser tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapi ilacı olan Taxol®'ün üretiminde kullanılan Paklitakselin keşfi ve geliştirilmesi tıpta çığır açan doğal ürünlerin modern bir örneği olmaktadır. ABD'de kanser tedavisi için başlatılan "Bitki Tarama Programı" kapsamında porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) kabuğundan antikanser etkili paklitaksel izole edilmiştir. Taksol®; lenfoma, lösemi, prostat kanseri gibi birçok kanser türünde kullanılan kemoterapik bir ilaçtır. Taksol®, hücre döngüsünde mikrotübüllerin depolimerizasyonlarını stabilize ederek hücre döngüsünde metafaz / anafaz geçişini engeller. Böylece hücre bölünmesinin engellenmesiyle hücre apoptoza gider (Walsh ve Le Roux, 2004; Schiff ve diğ., 1979). Kanserle mücadele eden hasta sayısının gün geçtikçe artması, Taxol® ve Taksol analogu ilaçlara olan ihtiyacı arttırmaktadır. Klinik çalışmalar gerekli görülen taksol miktarının hastanın durumu ve kanser türüne göre kişisel bir doz olarak kullanıldığını göstermiştir. 1 kg ham paklitaksel elde edebilmek için 10 ton porsuk ağacı kabuğuna ihtiyaç vardır ve bunun için yaklaşık 3000 porsuk ağacının kesilmesi gerekmektedir. 1 kg taksol sadece 500 hasta için kullanılabilir (Żwawiak ve Zaprutko, 2014). Gerekli olan miktarların fazlalığı ve her yıl 6 ölümden 1' inin nedeninin kanser olması (WHO, 2019) büyük bir taksol ihtiyacını karşımıza çıkarmaktadır.

Araştırmacılar tarafından alternatif taksol kaynağı bulabilmek amacı ile çalışmalar yapılmaktadır. Kimyasal sentez, yarı sentez, moleküler yaklaşımlar, endofitik mantarlardan üretim ve hücre kültürü gibi alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, yüksek maliyet, zorlayıcı süreç, uzun sentez basamakları gerektirdiğinden endüstriyel üretim için tercih edilecek verimlilikte değildir. Ancak, bunlar arasında bitki biyoteknolojisi ve moleküler yöntemler ile geliştirilmiş *Taxus spp.* hücre kültürleri, ilaç üretimi için kullanılan en etkin yöntemdir. *Taxus* türlerinde halen devam ettirilmekte olan elisitör uygulamalarından sistem biyolojiye kadar metabolizma mühendisliğini de kapsayan modern iyileştirme çalışmaları ile ürün miktarı 153 mg/L'ye kadar çıkarılabilmektedir. Üretimin artırılması hedefli çalışmalar, özellikle metabolizma mühendisliği kapsamlı iyileştirmelerin önemini ve heterolog P450 enzimlerini kaynakları olabilecek genlere olan ihtiyacı ortaya koymaktadır (McElroy ve Jennewein, 2018). Bu nedenle

Taxol®e olan artan ihtiyacın karşılanması için alternatif taksol üreticisi bitkilerin araştırılması çalışmaları önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Fındığın taksol üreticisi alternatif bir bitki olabileceğinin ortaya konulabileceğiyle ilgili ilk çalışma Hoffman ve diğ. (1998) tarafından yapılmıştır. Ardından Shahidi ve diğ. (2004), Türk fındık çeşitlerinden Tombul'un yaprak, çotanak, sert kabuklarının taksan bileşiklerini içerdiğini göstermişlerdir. Taxus türlerine benzer şekilde hücre kültürlerinden taksol üretiminde yönelik çalışmalar ise Bestoso ve diğ.(2006) nin fındık hücre kültürlerini kurmaları ile başlamıştır. Bu kültürlerdeki taksan miktarının arttırılmasına yönelik olarak ise Gallego ve diğ. (2015) tarafından elisitör uygulamaları yapılmıştır.

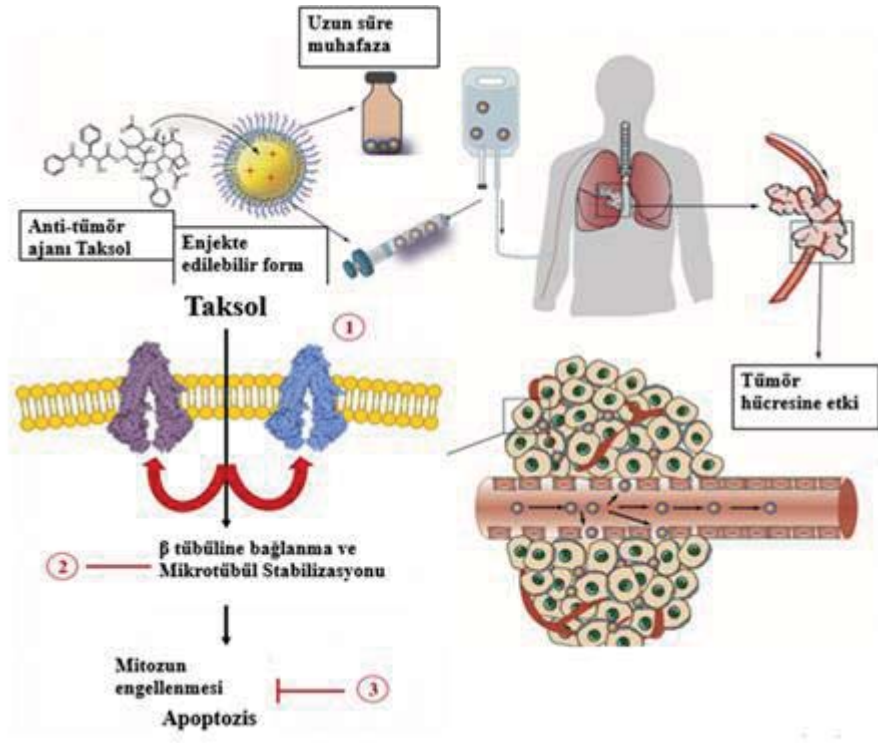
Türkiye zengin fındık çeşitliliğine sahip bir ülkedir ve dünya fındık ihtiyacının yaklaşık % 72,9'unu karşılayan çok büyük bir üreticidir (FAO, 2019). Türkiye'de yetiştirilen fındık çeşitlerin incelenmesi ve içerdiği taksan türevi maddelerin mevcudiyeti ve miktarı önem kazanmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi fındığın taksan içerdiği ve hücre kültürü yöntemleri ile bu bileşiklerin miktarının arttırılabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Ancak Türkiye'de üretilen fındıkların taksan türevi maddeleri içerdiği ile ilgili çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalar Tombul fındık çeşidinin (Shahidi ve diğ., 2004) ve Türkiye'de 19 farklı bölgeden toplanan çotanak ve sert kabuk karışımında (Oğuzkan ve diğ., 2018) ibarettir. Bu tez çalışmasında ise; ilk kez fındık üzerinde kapsamlı bir şekilde taksol ve taksan türevi bileşiklerin analizi yapılmıştır. Türkiye' de yetiştirilen fındıklardan 5 farklı çeşit (Çakıldak, Sivri, Tombul, Palaz ve Kalinkara fındık) ve 2 farklı genotip (Ham fındık, Sivri Yağlı fındık) incelenmiştir. Bu fındıkların herbirinin 5 ayrı dokusunda (Çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve), 4 farklı taksan türevi madde (10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sephalomanin ve paklitaksel) HPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ileride yapılacak fındık hücre kültürü ve metabolizma mühendisliği gibi çalışmalara temel oluşturabilir. Tezin verileri ışığında en çok taksan türevi içeriğine sahip olan fındıkların hücre süspansiyon kültürleri kurularak uygun elisitörler ile bu bileşiklerin miktar arttırma çalışmaları yapılabilir. Tez çalışması, ilaç endüstrisinin kullanabilmesi için Türkiye'de yetiştirilen fındıkların (*Corylus avellana L.*), Taxol® üretiminde potansiyel bir alternatif kaynak olduğunu göstermektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 KANSER

Vücudumuzun yapıtaşı hücrelerdir ve bütün organlarımız hücrelerden meydana gelir. Her hücrenin belirli bir ömrü vardır, ölen hücrelerin yenilenebilmesi için hücrelerin büyüme, bölünme ve ölüm (apoptoz) olayları arasında bir denge vardır. Bu denge çeşitli sebepler ile bozulursa hücreler kontrol dışı büyümeye başlar ve kanser gelişir. Kanser hücreleri birikerek kitlesel yapıda tümörleri oluştururlar. Tümörler bulundukları bölgede normal vücut işleyişini kesintiye uğratırlar ve dokuya ölümle sonuçlanabilecek zararlar verirler (Vermeulen ve diğ., 2003).

Kanser tedavisi için yıllardır bilimsel çalışmalar devam etmekle birlikte cerrahi müdahale, aşı, gen terapisi, immunoterapi, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, radyoterapi, hormon tedavisi ve kemoterapi günümüzde tercih edilen tedavi uygulamalarıdır. Kemoterapi, kanser hücrelerinin öldürülmesi amacıyla vücuda güçlü ilaçların verilmesi ile tedavinin sağlandığı ve bütün vücuda etki eden tek tedavi yöntemidir. Bu nedenle vücudun birçok dokusunu etkileyen bir hastalık olan kanserin tedavisinde vazgeçilmez bir yöntemdir (Kütük, 2016). Yöntemin daha etkili ve kullanışlı olabilmesi için üretilen etkili kemoterapötik ilaçlar önem arz etmektedir. Taxol®, Taxotere®, Jevtana® ve Abraxane® günümüzde kullanılan en etkili kemoterapötik ilaçlardır. Şekil 2.1’de akciğer kanseri olan bir hastaya, kemoterapi tedavisinde kullanılan Taxol ilacının uygulaması örnek olarak gösterilmektedir. Bu kemoterapötik ilaçlar hücre bölünmesinin metafaz fazına etki ettiği için mitotik inhibitör olarak adlandırılır. Hücrenin bölünmesinden sorumlu olan mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayarak kanser hücrelerinin bölünmesini engellemektedirler. Böylece yeni hücreler oluşmadan apoptozun başlaması sağlanmaktadır. Taxol®, Taxotere®, Jevtana® ve Abraxane® gibi mikrotübül oluşumunu engellemek üzere geliştirilmiş mitotik inhibitörler sayesinde meme, prostat, akciğer kanser çeşitleri başarıyla tedavi edilebilmektedir (McElroy ve Jennewein, 2018; Ojima ve diğ., 2015).

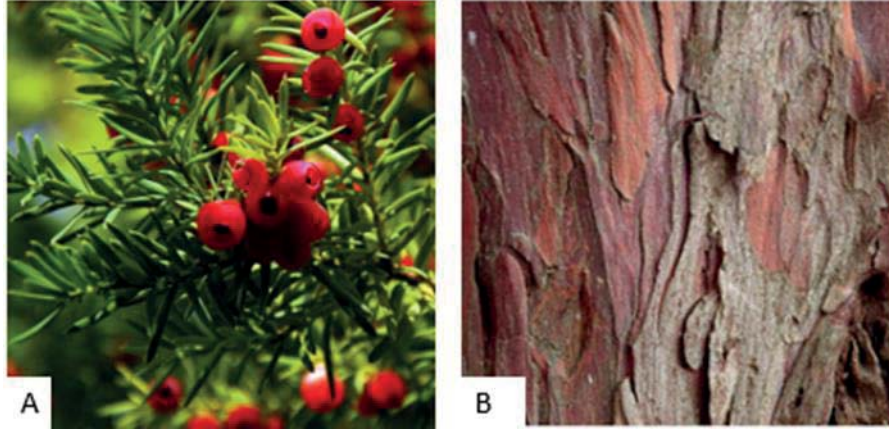


Şekil 2.1: Akciğer kanserinin kemoterapi tedavisinde Taxol®'ün uygulanması (Carlina technologies, 2019).

2.2 TAKSOL

2.2.1 Porsuk Bitkisi (*Taxus spp.*)

Porsuk bitkisi, Taxaceae (porsukgiller) familyasının *Taxus L.* cinsi olarak bilinmektedir (Conifers, 2019). Porsuk bitkisi her mevsim yeşil iğne şeklinde yapraklara sahip olmakla birlikte ağaç ve çalı formunda bulunmaktadır. Porsukların gövde kabukları kırmızı, kahverengi veya kırmızı menekşe rengindedir, ayrıca plakalar halinde dökülebilen ince pullara sahiptirler (Yaltırık ve Efe, 1994). Şekil 2.2'de porsuk ağacının yaprak, arillus, çekirdek ve gövde kabuğu gösterilmiştir. Kozalak yerine meyve oluştururlar ve bu meyve "Arillus" denilen bir örtü tarafından sarılmaktadır. Bu örtü kırmızı renkte, etli, tadı hoş ve yenilebilen bir yapıdadır. Arillus zehirsiz olmasına rağmen tohum, kabuk ve yapraklar zehirlidir (Krenzelok ve diğ., 1998). Zehirli olmasının nedeni arillus dışındaki bütün bölgenin zehir etkisine sahip "Taxin" adında bir alkaloid bulundurmasıdır. Tohum ve yaprakları yiyen insanlarda mide asidi ile parçalanarak zehirli alkaloidler kuvvetli bir zehirlenme ile birlikte ölüme neden olmaktadır (Wilson ve diğ., 2001). Porsuk ağacının çimlenmesi kuşların zehirsiz meyveyi yiyip, zehirli olan tohumu dışkılamasıyla gerçekleşmektedir (Hulme, 1996).



Şekil 2.2: Porsuk ağacı (*Taxus spp.*). A) Porsuk ağacı, iğne şeklinde yapraklara sahiptir. Çekirdek zehirli olmasına rağmen kırmızı renkli arillus denilen zehirsiz bir örtü ile kaplıdır. B) Porsuk ağacının kabuğu, taksan türevi madde miktarı bakımından zengindir (Impact Plants, 2019).

2.2.2 Taksol'un Tarihçesi

1937 yılında Amerika hükümetinin desteği ile kanser hastalığının çözümü için Ulusal kanser enstitüsü (NCI) kurulmuştur. Başlangıçta düşük bir bütçe ile kurulan kurum II. Dünya savaşı (1939-1945) sırasında ölümlerin çoğunun kanser hastalığından kaynaklanması ile kanser araştırmalarına ve tedavi yöntemlerine yoğunlaşmıştır. 1955 yılında NCI içinde Kanser Kemoterapi Ulusal Hizmet Merkezi (CCNSC) kurularak "Hedefli bir ilaç geliştirme" programı kapsamında 30.000 den fazla bileşik taranmıştır. Bu süreçte hayvan yetiştiriciliğinden klinik deneylere kadar çok kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Ulusal Kanser Enstitüsü ve ABD Tarım Bakanlığı iş birliği ile 1960 yılında başlayıp 1981 yılına kadar devam eden Bitki Tarama Programı başlatılmıştır. Bitki Tarama Programının amacı, dünya üzerinde mümkün olan bütün bitkileri taramak ve anti-kanser özelliğe sahip bileşikleri tespit edebilmektir. Program kapsamında 15.000 bitki özü taranmıştır (Walsh ve Le Roux, 2004).

Bitki Tarama Programı kapsamında 20 yıl devam eden araştırmalar süresince kliniğe ulaştırılan tek ilaç Taxol® olmuştur. 1962 yılında Monroe Wall'ın laboratuvarında porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) sap, iğne, dal ve meyve dokuları incelenirken porsuk kabuğundan saf kristalimsi bir bileşik (paklitaksel) izole edilmiştir ve antikanser özelliği olan bu bileşik Taxol® olarak adlandırılmıştır. 1971 yılında çalışma sonuçları yayınlanmıştır ve bileşik daha ileri çalışmalar için NCI'ya devredilmiştir. Taksol, tarama ve ilaç geliştirme programı kapsamında elde edilen etkili bir kemoterapik ilaç (Taxol®, Bristol-Myers Squibb Company, New York) olarak üretilmeye başlanmıştır (Wani ve diğ., 1971; Walsh ve Le Roux, 2004). Taxol® FDA

tarafından, 1992 yılında ovaryum ve 1994 yılında ise meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Günümüzde birçok kanser çeşidinin tedavisi için Taxol® kemoterapi ilacı olarak kullanılmaktadır (FDA, 2019a). Taksol ilk kez porsuk ağacının kabuğundan yaklaşık %0.004'lük düşük bir verim ile (12 kg kuru ağaç kabuğuna karşılık 0.5 gr saf madde) elde edilmiştir (Wani ve diğ., 1971).

Kanser tedavisi için araştırmalar Monroe Wall'ın laboratuvarında devam ederken eş zamanlı çalışmalar Fransa'da Pierre Potier ve ekibi tarafından yapılmıştır. Potier ve ekibi, antikanser etkili bir ilaç üzerinde çalışırken eş zamanlı Wall'ın çalışmalarını da takip etmişlerdir. Porsuk ağacının kabuğundan elde edilen taksol miktarının az olması sebebi ile kanser tedavisi için ihtiyaç duyulan taksan türevini yüksek miktarda üretilecek çalışmalar başlatmışlardır (Walsh ve Le Roux, 2004).

Yapılan çalışmalarda, Avrupa'da yetişen *Taxus baccata*'nın iğnelerinden ekstre edilen 10-deasetilbakkatin III'den yarisentez sonucu Taxotere adı verilen taksol analogu sentezlenmiştir. Dosetaksel (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc. , Collegeville, PA) ile ilgili bu çalışma, 1996 yılında FDA tarafından lisans almıştır (Walsh ve Le Roux, 2004; FDA, 2013). Paklitaksel (Taxol®) ve yarisentetik türevi olan dosetakselin (Taxotere®) etki mekanizması; hücrelerin mikrotübüllerine bağlanarak mitoz sırasında mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonu engelleyerek stabil mikrotubul toplulukları oluşturmaktır. Böylece mitozu durdurarak hücreyi apoptoza götürmektedir (Schiff ve diğ., 1979; Ringel ve Horwitz, 1991). Günümüzde Taxol® ve Taxotere®, meme kanseri, mide kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, kaposi sarkomu, özofagus kanseri, mesane kanseri olmak üzere çok çeşitli kanser yelpazesinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardır (FDA, 2019b).

Taxol® ve Taxotere® kemoterapi ilaçlarının kanser tedavisindeki iyileştirici etkileri araştırmacıların dikkatini çekmektedir ve porsuk ağacı üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Dünyanın her yerinden araştırmacılar porsuk ağacından antikanser etkili yeni taksan türevi maddelerin elde edilmesi ve etkinliğinin araştırılması üzerinde çalışmaktadır (Walsh ve Le Roux, 2004). Birinci nesil taksan antikanser ajanları olarak üretilen Taxol® ve Taxotere® ilaçları kemoterapi tedavisinde çok aktif olarak kullanılmasına rağmen çoğu zaman bu ilaçların yan etkilerinden dolayı tedaviden tam verim alınamamaktadır. Bu ilaçlar zayıf ilaç çözünürlüğü, alerjik reaksiyonlar, kemik iliğinde kan hücreleri yapımının engellenmesi, sinirlerin hasar görmesi ile el ve ayaklarda uyuşma, şiddetli ağrılar ve nihai olarak ilaç

direncinin gelişmesi gibi çeşitli klinik problemlere neden olmaktadır. İlaçların yan etkilerini azaltmak, daha az nörotoksik türevlerin keşfi ve yüksek antitümör aktivitesine sahip taksan analoglarının üretilmesi amacıyla son yıllarda çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmalar sonucunda ikinci nesil taksan antikanser ajanları olarak Jevtana® (Kabazitaksel) ve Abraxane® (Nanotanecik albumin-bağlı Paklitaksel) üretilmiştir (Yared ve Tkaczuk, 2012).

Kabazitaksel, Dosetakselin yarı sentetik türevi olarak üretilmiştir (Jevtana®, Sanofi-Aventis). Ekstra metoksi yan zincirinin Dosetaksel omurgasında olması, Kabazitakselin kan ve beyin bariyerini geçme kabiliyetini arttırmıştır ve bu sayede tümör yanıt hızları yüksektir (De Bono ve diğ., 2010). Hormon tedavisine dirençli prostat kanseri tedavisinde kullanılmak üzere 2010 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (FDA, 2010). Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en çok ölüme neden olan kanser çeşididir (WHO, 2019). Androjen bağımlı bir kanser çeşidi olan prostat kanserinin tedavisi için androjen baskılayıcı tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde öncelikle hormon sonrasında Taxotere temelli kemoterapi tedavisi uygulanır. İlerleme gösteren metastatik prostat kanserli hastalarda ise Taxotere tedavisinden sonra Kabazitaksel prednizolon ile kombine olarak kullanılmaktadır (Galsky ve diğ., 2010).

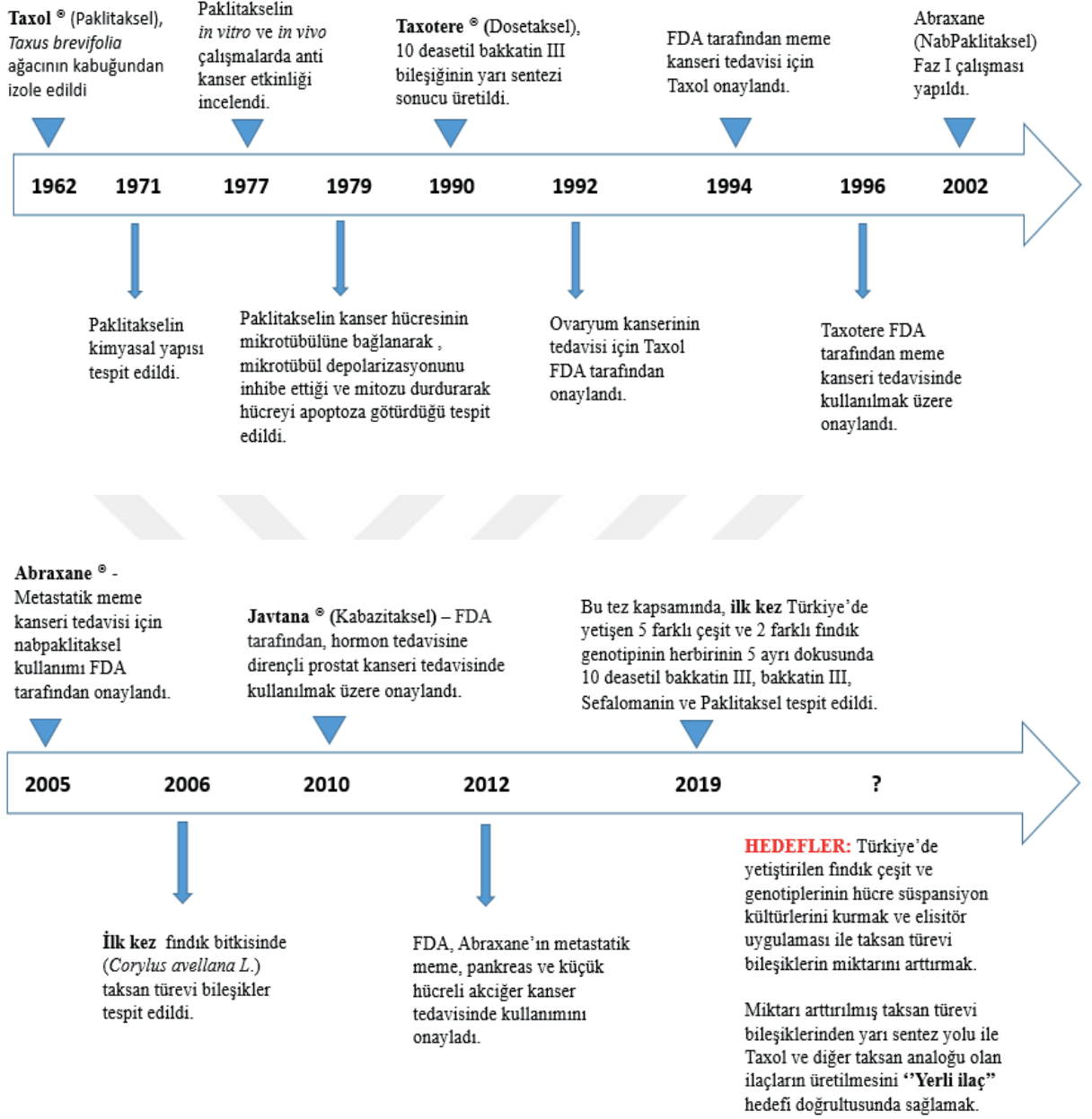
Abraxane® (nab-paklitaksel ABI-007 veya Celgene Inc.), paklitakselin nanoteknoloji kullanılarak hazırlanmış bir formülasyonu olarak üretilmiştir. İnsan serum albümininin (% 3-4 konsantrasyonunda) paklitaksel ile homojenleştirilmesi ile hazırlanan koloidal bir süspansiyondur (Miele ve diğ., 2009). İlk olarak 2005 yılında metastatik meme kanseri tedavisinde ve sonrasında ise ileri evre meme, akciğer ve pankreas kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (FDA, 2009). Nanotanecik albumin-bağlı Paklitaksel (nab-Paklitaksel) yaklaşık 130 nm'dir ve kılcal damardan blokaj riski olmadan geçerek istenilen hedef tümör dokusuna daha hızlı bir şekilde ulaştırılmaktadır. Böylece mitoz bölünme sırasında mikrotübüllere bağlanarak çalışmasını inhibe eder ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller. Abraxane ayrıca paklitaksele kıyasla çok daha küçük bir hacimle sulandırılabilir ve bu nedenle standart 180 dakika olan infüzyonun aksine daha kısa sürede (30 dakika) infüzyon gerçekleşir (Green ve diğ., 2006).

Birinci nesil taksan antikanser ajanları olarak üretilen Taxol® ve Taxotere® kemoterapi ilaçları yan etkilerine karşın halen mevcut kanser kemoterapisinde ve endikasyonların iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Devam eden ilaç geliştirme

alışmaları bu sorunların üstesinden gelmek için yeni formölasyonlarla daha az toksik ve daha aktif analoglar üretmek amacıyla ikincil nesil taksan antikanser ajanları olarak Jevtana ve Abraxane kemoterapi ilaçları üretilmiştir (Ojima ve diğ., 2015).

1962 yılında taksol'ün keşfi ile başlayan araştırmalar aktif olarak devam etmektedir ve yeni üretimler teşfik edilmektedir. 2018 yıllık satış raporlarına göre Taxol®-1,5 milyar dolar (Forbes, 2019), Taxotere®-166 milyon avro, Javtana® 422 milyon avro (Sanofi, 2019), Abraxane® 1,062 milyon dolarlık (Celgene, 2019) satış yapılmıştır. Kanseri hastaları için Taksol ve taksol analogu ilaçlar etkilidir ve etkili olmaya devam ettikçe her zaman taksol kaynağına ihtiyaç duyulacaktır.

Taksan türevi bileşiklerinin temin edildiğı *Taxus* türlerinde bu miktarın az olması, porsuk ağacının neslinin tükenmekte olması ve ağacın olgunlaşma süresinin uzun olması nedenlerinden dolayı taksan türevi maddelerin temini için farklı yöntemler araştırılmaktadır. Şekil 2.3'te Taxol® ve diğeri taksan analogu olan ilaçların üretim kronolojisi gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Taxol üretim kronolojisi. Taksol ve taksan türevi maddelerin yarı sentezi sonucu üretilen kemoterapi ilaçlarının kronolojisi ve Taxol® üretimi için alternatif ham madde olacak *Corylus avellana L.*'da taksan türevi maddelerin analiz çalışmaları yıllara göre gösterilmektedir.

2.2.3 Taksol Üretimi

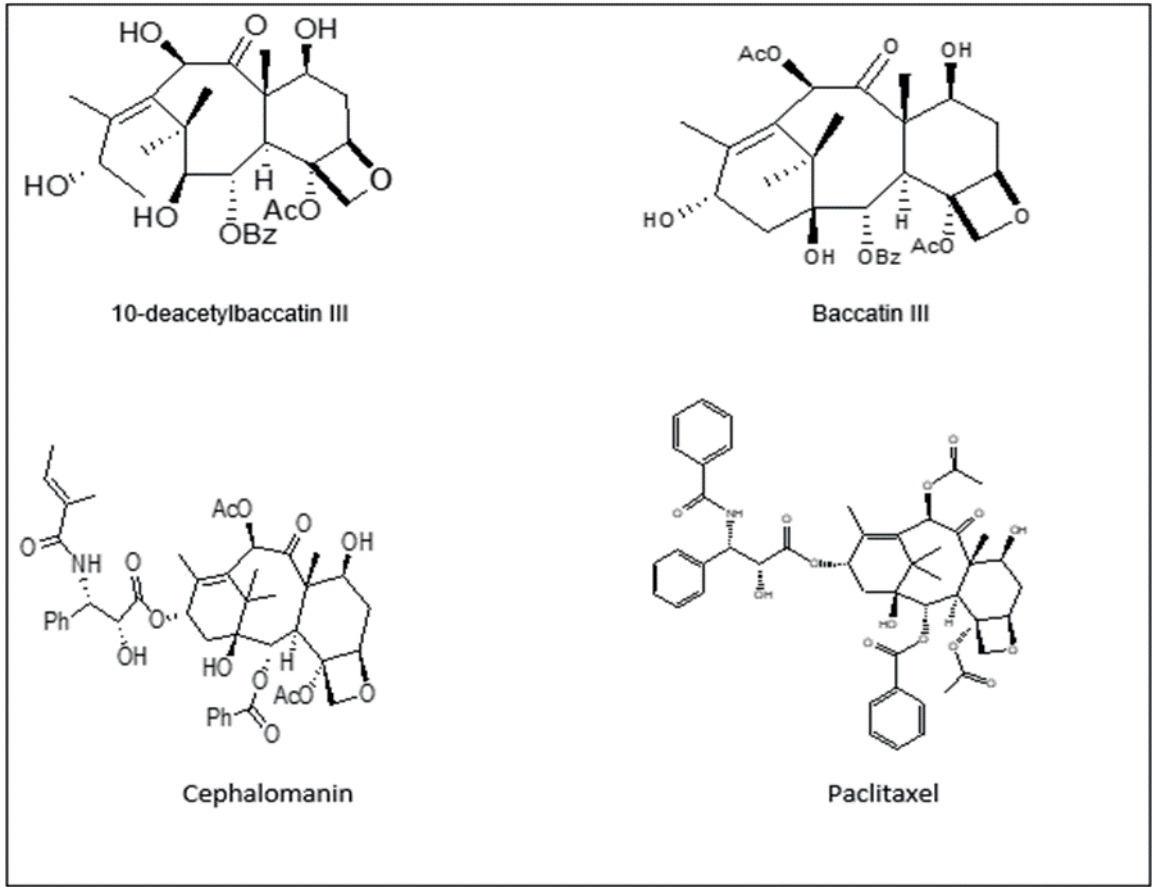
Taxol® Dünya Sağlık Örgütü'nün "Temel İlaçlar Listesi"nde yer almaktadır (WHO, 2011). Kanseri hastalığının artması ile Taxol üretimine olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde büyük ölçekli ilaç endüstrisinde Taxol üretimi, *Taxus spp.* türlerinin biyoteknolojik yöntemler ile hücre kültürünün kurulması ve uygun elisitörler ile taksan miktarının artırılması ile yapılmaktadır. *Taxus spp.* hücre süspansiyon kültüründen taksol öncülleri 10-deacetylbaaccatin III, baaccatin III ve sefalomanin izole edilerek yarı sentez yoluyla Taxol® ve diğer ilaçlar üretilmektedir. İlaçların üretilmesinde *Taxus* türlerinin hücre süspansiyon kültürleri endüstriyel olarak tercih edilen bir yöntemdir (McElroy ve Jennewein, 2018). Bunun birçok avantajı vardır; optimize edilmiş kültür koşulları korunabilir, verimlilik tutarlıdır, ekolojik olarak sürdürülebilir, diğer yöntemlere göre uygun maliyettedir ve büyük ölçekli üretim platformları daha fazla biyokütle üretimine izin vermektedir (Georgiev ve diğ., 2009). *Taxus cuspidata*'nın yüksek taksol üreten hücre hatlarının belirlenmesinin ve seçilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, *Taxus cuspidata*'nın kök dokularından süspansiyon hücre kültürleri oluşturmak için 9 kez alt kültür yapılmıştır. 2 yıllık çalışma sonucunda verimlilik artışı sırasıyla %346,3 - %382,5 - %409,2 olan 3 hücre hattı seçilmiştir (CL5, CL12 ve CL21). Seçilen yüksek verimli hücre hatları, taksol'ün büyük ölçekli endüstriyel üretimi ve hücre kültürünü kullanarak biyoteknolojik üretiminin sağlanmasını amaçlayan seri üretim için uygun görünmektedir (Wang ve diğ., 2017). Elisitörlerin birlikte kullanımının taksan üretimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Taxus baaccata* kallus kültürüne önce salisilik asit uygulanmış daha sonra farklı konsantrasyonlarda glukoz ilave edilmiştir. Kontrol ile kıyasla taksol'de 5.1 kat ve toplam taksan miktarında 3.5 kat artış sağlanmıştır. Diğer bir çalışmada ise, kuraklık stresine neden olan polietilen glikol (PEG) elisitörünün *Taxus baaccata* kallus kültüründe paklitaksel ve 10 - deasetil baaccatin III üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir ve taksol üretiminin kontrolden 2,5 kat arttığı gözlemlenmiştir (Sarmadi ve diğ., 2019). Taksan türevi bileşiklerin sentezini arttırmak için kültür koşullarının optimize edilmesi önemlidir. Belirli maddelerin varlığı, sıcaklık, ortam şartlarının değiştirilmesi, pH gibi pek çok faktör verimliliği etkilemektedir. Kullanılan elisitörlerin miktarı ve çeşitliliği de taksan türevi bileşiklerinin miktarını arttırmak için çok önemli faktörlerdir (Naik ve Al-khayri, 2016). Günümüzde, hemen hemen tüm Taxol® üreticileri (Genex, ESCAgenetic, Nattermann, Samyang ve Phyton Biotech) hücre kültürü temelli biyoteknolojik yöntemleri kullanmaktadır (Gallego ve diğ., 2017). Büyük ölçekli Taxol® üretimi için geliştirilen ve ilaç endüstrisinde

kullanılan en son teknoloji bitki hücre fermentasyon tekniğidir (PCF ®). İhtiyacın 1/3'ünün karşılandığı bu teknik ile yılda yaklaşık 1.000 kg ham paklitaksel üretilmektedir. *Taxus chinensis* v. *Marei* türlerinin bitki hücreleri kullanılarak elde edilen tanımlanmış, yüksek verimli ve tescillenmiş hücre hattı kullanılmaktadır. Optimize edilmiş kontrollü bir fermentasyon ortamında bitki hücre büyümesi ve yarı sentez yöntemi kullanılmaktadır. Paklitaksel üretimi, plantasyon biyokütlesinin hasadı olmadan hücre bankalarının kullanılması veya 10-deasetilbaccatin III' ten yarı sentez yolu ile yapılmaktadır. Geliştirilen teknik ile dondurulmuş olarak korunan bir hücre bankası kullanılmaktadır. Hücre bankaları sabit bir şekilde depolanmaktadır ve değerli porsuk ağaçları bu şekilde korunarak sonsuz bir şekilde çoğaltılabilen bir başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Hücre bankalarının kullanılması, plantasyonlardan veya yabani bitki materyali toplanması sırasında meydana gelen problemlerden etkilenmeden başlangıç materyali sağlamaktadır. Plantasyon ve yabani porsuk ağacının üretilmesi sırasında meydana gelen olumsuz çevre şartları, dalgalı verim ve düşük kalite, iklim ve patojen kaynaklı riskler nedeniyle ham maddenin elde edilememesi sorunu ortadan kaldırılmış olmaktadır. 75.000 L kapasiteli biyoreaktörler endüstriyel üretim için avantaj sağlamaktadır (Phyton Biotech, 2019).

Taksan türevli ilaçların elde edilmesinde kullanılan bitki doku kültürü yöntemleri ve hücre süspansiyon kültürlerinin yüksek verimine rağmen bitkinin yavaş büyümesi, maliyetin fazla olması, kontaminasyon riskleri gibi problemlerin üstesinden gelmek zordur. Özellikle de gün geçtikçe artan kanser hastalıkları için taksol ilacına olan talebin artmasıyla, yeni kaynak ve yöntem arayışları devam etmektedir (Gallego ve diğ., 2017).

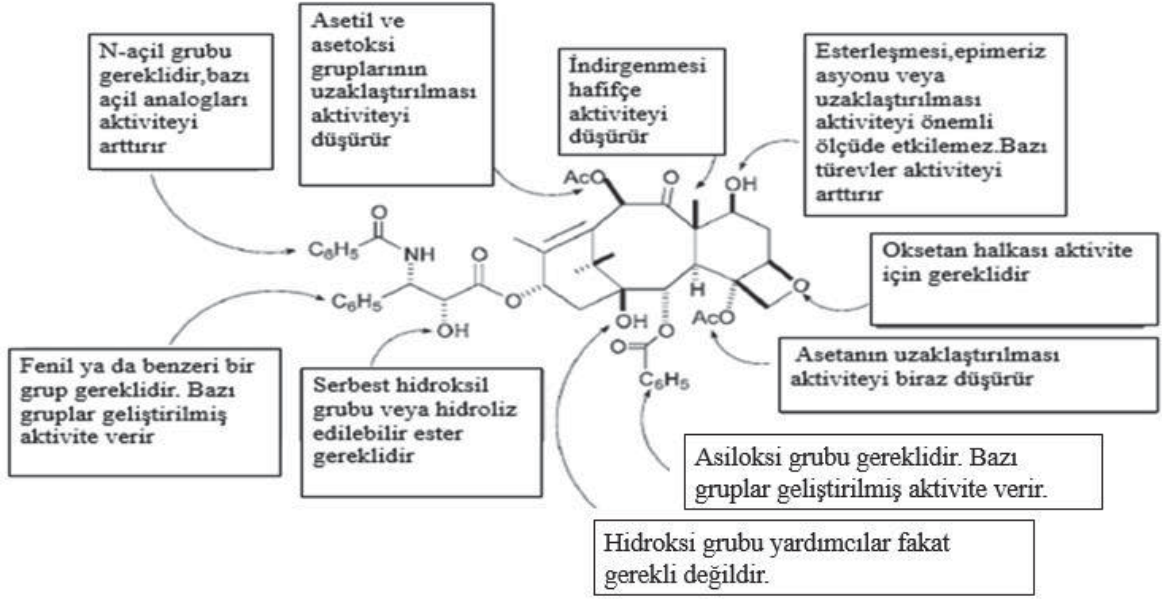
2.3 TAKSAN DİTERPENOID KİMYASI

Taksan diterpenoidler; orijinal diterpen iskeletine sahip olan, çoğunlukla bitkilerden elde edilen terpenoid grubuna bağlı bir sekonder metabolit çeşididir (Roberts, 2007; Lythgoe, 1964) ve 500' den fazla taksan diterpenoid tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2011). Kemoterapi ilacı olarak günümüzde çok tercih edilen Taxol® ilacının ham maddesini oluşturan Paklitaksel ve yarı sentezi için ara ürün olarak kullanılan 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefhalomanin önemli taksan diterpenoidlerdendir (Gallego ve diğ., 2017). Şekil 2.4'de bu taksan bileşiklerinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Taksan diterpenoidlerin (10-deasetilbakkatin III, bakkatin III, sefhalomanin ve paklitaksel) kimyasal yapısı.

Taksolün antitümör aktivitesi temel olarak; A halkası, ester yan zinciri, C2 benzoil grubu ve dört üyeli oksetan halkasından kaynaklanmaktadır. Antitümör Aktivitesi, C13 zincirinde yer alan C2'deki hidroksil grubu tarafından artırılırken C3 amid-asil grubu tarafından da korunur (Guenard ve diğ., 1993; Kingston ve diğ., 2002). Şekil 2.5'de taksol iskeletinde antitümör aktiviteye neden olan noktalar gösterilmiştir.



Şekil 2.5: Taksol iskeletinde yapı-aktivite ilişkisi (Kingston, 1994).

Taksol iskeletinin yapısında; C- pozisyonundaki serbest hidroksi grubu içeren C-13 yan zinciri, oksetan halkası ve rijit taksan yapısı C2 ve C-4 pozisyonlarındaki ester grupları aktivite için önemlidir (Trmcic ve diğ., 2012). Taksol'un kuvvetli antikanser etkisini, oksetan halkası içeren molekülün ve C-14 ve C-15'in dâhil olduğu güney kısmındaki değişiklikler önemli ölçüde etkilemektedir. Taksol'un biyolojik aktivitesinde kritik rol oynayan 4 yapıdan biri oksetan halkasıdır (Kingston, 1994).

Bitkiler ile ilgili yazılı kaynaklarda çok eski tarihlerden itibaren bitkilerin şifa kaynağı olarak hastalıkların tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir. Şifalı bitkilerin kullanım şekli doğrudan bitkinin kendisi veya değişik işlemler ile elde edilen özütlerinin kullanılması ile olmaktadır. Günümüzde ise WHO'nun araştırmalarına göre hastalıkların tedavisi için tıbbi bitkiler kullanılarak ilaç temin edilmektedir (WHO, 2011). Dünyada yaygın olarak kullanılan Aspirin, tıbbi bitkilerden (*Salix sp.* ve *Populus sp.*) elde edilen glikozit salisinden üretilmektedir (Strobel ve Daisy, 2003). Sekonder metabolit kökenli diğer bir ilaç ise dünyada çok yaygın olarak kullanılan Taxol®'dür. *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen ham maddenin (paklitaksel) kullanılmasıyla elde edilen ilaç kanser tedavisinde tercih edilen önemli bir kaynaktır (Wani ve diğ., 1971). Afyon haşhaşından morfin, yüksük otundan digoksin, Maranham Jaborandi çiçeğinden pilokarpin hala çok tercih edilen bitkisel kaynaklı ilaçlardır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanılan bu özelliği onların sekonder metabolit denilen kimyasal maddeler bulundurmasıyla ilişkilidir. Sekonder metabolitler; primer metabolitler (karbonhidrat, protein ve yağ) gibi bitkinin büyüme, fotosentez, solunum gibi yaşamsal işlevlerinde yer almazlar onun yerine en az bu fonksiyonlar kadar önemli olan bitkinin savunma, patojenlerden ve herbivorlardan korunma, stres durumlarında hayatta kalma yaşadığı ortama uyum sağlama fonksiyonlarında yer alarak özelleşmiş, karmaşık kimyasal maddelerdir. Bitkisel temelli sekonder metabolitler; terpenler (terpenoid), fenolik bileşikler ve azotlu bileşikler olarak gruplandırılmaktadır. Bu gruplar kimyasal olarak birbirlerinden farklıdır. Terpenoidler çeşitli bitkilerden sentezlenebilen sekonder metabolit ürünlerinin en geniş sınıfını oluşturmaktadır. Terpenoidler renklendirici, tıbbi ham madde ve savunma işlevleri ile ticari olarak dikkat çekmektedir (Roberts, 2007; Croteau ve diğ., 2000).

Terpenoidler, doğal kaynak sağlayan bitki dünyası içinde, insan sağlığı için birçok işlevi olan çeşitli doğal ürünlerdir. Bu işlevlerinin yanında ayrıca farmasötik aktiviteye de sahiptirler. Kanseri hastalığında antikanser ajanı olarak kullanılan Taxol® ilacının ham maddesi olan paklitaksel *Taxus* türlerinden elde edilen bir terpenoid türevidir. Doğal kaynaklardan elde edilen terpenoid bileşiği düşük miktarda bulunur. Örneğin; Taksol için 12 kg porsuk ağacının kuru kabuğundan 0,5 gr saf madde yani % 0.004 gibi oldukça düşük miktarda elde edilmiştir (Wani ve diğ., 1971). Bu sebepler ile bitkilerde yapılan metabolik mühendisliği çalışmaları terpenoid verimini arttırmak ve ürün özelliğini iyileştirmek için önem taşımaktadır. (Roberts, 2007). Terpenoid türevli ürünlerin klinik değerlendirme, hasta tedavisi gibi yüksek ihtiyaçları karşılaması için doğal kaynaklardan temini büyük önem arz etmektedir. Terpenoid temini için kullanılacak kaynak bitki hasat yeri, mevsimi ve bilinmeyen çeşitli çevresel koşullar gibi faktörlerden dolayı olumsuz etkilenebilir ve elde edilecek ekstraksiyon verimli olmayabilmektedir (Croteau ve diğ., 2000). Doğal kaynakların hasatında yaşanan sorunlar neticesinde güvenilir, çevre dostu üretim yöntemleri geliştirilmektedir.

2.4 TAKSOL ETKİ MEKANİZMASI

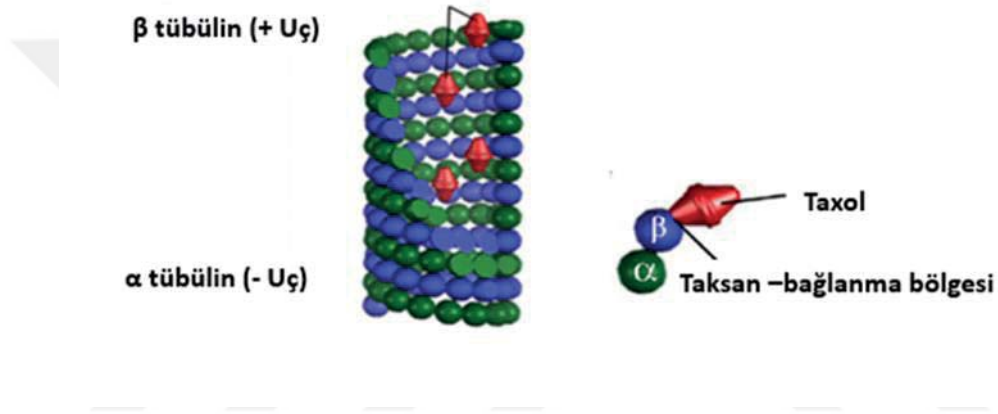
Mikrotübüller hücre şeklini koruma, hücre hareketi sağlama, hücre sinyalleşmesi ve bölünme olmak üzere hücrede önemli görevleri olan yapılardır. Mikrotübül alt birimi; alfa tübülün ve beta tübülün olmak üzere 2 proteinden oluşmaktadır ve bu 2 protein bir araya gelerek tübülün dimerlerini (heterodimer) oluşturur. Dimerler düzlemsel bir şekilde uzun polimer zincirlerini (protofilamentleri) meydana getirir ve polimer zincirleri kendi ekseninde katlanma yaparak bir

tüp şeklinde mikrotübülü oluşturur. Tam bir dönüşte toplam 13 birim bulunmaktadır. Bir mikrotübülün çapı yaklaşık 24 nm'dir ve merkezinde 14 nm genişliğinde boşluk bulunur. Mikrotübülün bir ucu mikrotübül organizasyon merkezine bağlıdır ve bu merkezden yönlendirilmektedir. Üç adet mikrotübül organizasyon merkezi bulunmaktadır (siller, bazal cisimler ve sentrozomlar). Mikrotübüller oluştukları mikrotübül organizasyon merkezine göre farklı görevler üstlenmektedirler. Sentrozomdan oluşan mikrotübüllerde; Sentrozomlar 2 adet sentriyolden, her sentriyolde 27 adet mikrotübülden oluşmaktadır. Sentriyoller mikrotübül üçlülerinden oluşur ve 3 lü mikrotübüllerden 9 tanesi bir araya gelerek sentriyolleri oluşturur. Hücre bölünmesinde iğ ipliklerini oluşturan yapılar sentrozom ya da sentriollerdir. Bu iğ iplikleri kinetokor denilen proteinlere tutunur. Mikrotübülün organizasyon merkezi olarak bir ucu sentrozoma bağlıyken (negatif uç), diğer ucu (pozitif uç) ise mitoz sırasında uzayıp, kısalmasında görevlidir. Bu uca dimerler çok hızlı bir şekilde eklenerek (polimerizasyon) mikrotübülün uzamasına neden olmaktadır ya da bu bölgedeki dimerler ayrılıp (depolimerizasyon) hızla mikrotübülün kısalmasına neden olmaktadır. Ca^{+2} ve mikrotübülle ilişkili proteinlerin (MAPler) kontrolü ile tübülün düzenlenmesi gerçekleşir. Mikrotübüllerin dinamik bir şekilde uzayıp kısalması sayesinde mitoz bölünme sırasında kromozomların birbirinden ayrılmasına neden olmaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2005).

Taksol, mikrotübülleri stabilize ederek metafazdan anafaza geçişi bloke eder ve mitozu engeller. Hücre bölünmesinde sorun olduğunun algılanmasıyla hücre apoptoz sinyali alır ve apoptoza gider. Mitokondriyal sinyal yolağı (hücre içi sinyaller) ile süreç devam eder. Canlılığın devamı için hücrelerin ve dokuların yenilenmesi gerekmektedir. Yenilenme olayı apoptozis (ölüm) ve mitoz (yeniden yapım) arasındaki dengenin kurulması ile bir ömür apoptotik hücrelerin oluşması anlamına gelmektedir. Bu dengenin kurulması hücre ve doku homeostazisi için önemlidir çünkü her hücre doğar, çoğalır ve farklılaşarak en sonunda ölür. Dengenin bozulması birçok hastalığın nedeni olarak görülmektedir. Örneğin, proliferasyondaki artış ve apoptozisteki azalış karsinogeneze neden olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir. Homeostazinin sürmesi gerekli olan programlı hücre ölümünün (apoptozis) aktivasyon ve inhibisyon mekanizması üzerinde yapılan çalışmalar kanser gibi hastalıkların tedavisi için üretilen ilaçlara yön verecektir (Schiff ve diğ., 1979; Elmore, 2007).

Kanser tedavisi için kullanılan ilaçların çoğu, tümör hücrelerinin DNA'sına müdahale ederek etki etmesine karşın taksol mikrotübüllere etki ederek hücre bölünmesini bloke eder (Florea ve

Büsselberg, 2011). Taksol için hücresel hedef β -tübülün üzerindeki taksan bölgesidir. Bu bölge β -tübülün yüzeyinin yakınındaki hidrofobik bir yarık içinde bulunur ve paklitakselin, hidrojen bağı ve hidrofobik temas yoluyla proteinlerle etkileşime girmesine izin verir. Bu etkileşim ile depolarizasyonu bloke eder ve mitozda kinetokor üzerindeki gerilimi değiştirerek iç mikrotübül dinamiklerini baskılar ve mikrotübülleri stabilize eder. Bu sayede mitoz bölünmenin metafazdan anafaza geçişini bloke ederek hücre bölünmesini inhibe etmiş olur ve böylece kanser hücresinde apoptozu indükler (McGrogan ve diğ., 2008).



Şekil 2.6: Taksol'ün hücre mikrotübülünde β -tübüline bağlanması. Taksol ve taksan türevi bileşikler hücre bölünmesinin metafaz evresinde mikrotübüllerin β tübülün bölgesine bağlanırlar (McGrogan ve diğ., 2008).

2.5 TAKSOL ÜRETİMİ İÇİN ALTERNATİF YÖNTEMLER

Porsuk ağacından temin edilen taksol miktarının düşük olması, ağacın olgunlaşması için uzun yıllar gerekmesi, ağacın kesim sırasındaki çevreye verdiği zararlar nedeniyle alternatif taksol üretim yöntemleri geliştirmek için çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca günümüzde ilaç endüstrisinde kullanılan *Taxus spp.* hücre kültür yöntemlerinin uzun inkübasyon sürelerine, özel tekniklere ihtiyaç duyulma ve hergün artan taksol ihtiyacını tam olarak karşılayamaması nedenleri ile hala alternatif yöntemler araştırılmaktadır (Gallego ve diğ., 2017).

Alternatif taksol üretimi için yapılan çalışmalardan biri kimyasal sentez yöntemidir. Eş zamanlı olarak Nicolaou (1994) ve Holton (1994) tarafından taksolün kimyasal sentez çalışmaları başlatılmıştır. Nicolaou grubu en az 40 adımda gerçekleşen sentez yöntemi geliştirirken, Holton grubu çeşitli modifikasyonlar yapmıştır. Elde edilen verim sırasıyla %2.7 ve % 0.07'lik çok

düşük oranda olmasına rağmen aynı anda taksolün kimyasal sentezini başarmışlardır. Sentez basamaklarının azaltılıp verimin artırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Çalışmalarda 37 basamakta taksol'ün kimyasal sentezi gerçekleştirilmiştir, bu bildirilen en kısa sentez basamağıdır, ancak % 0.22'lik çok düşük bir verim sağlanmıştır (Nakada, 2019). Kimyasal sentez tekniklerinin gelişmesine rağmen karmaşık bir yapıya sahip olması, maliyetinin büyük çaplı bir üretime izin vermemesi ve elde edilen verimin düşük olması sebepleri ile henüz endüstriyel ilaç üretimi için uygun bir yöntem değildir (McElroy ve Jennewein, 2018).

Yüksek miktarda taksol üretimini mümkün kılmak amacı ile yapılan çalışmalardan diğeri ise, endofitik mantarlardan taksol üretim çalışmalarıdır. İlk kez Stierle (1993) tarafından *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan endofitik mantar olan *Taxomyces andreanae* izole edilerek *in vitro* kültür koşullarında taksol ürettiği (0.024–0.05 ng / mL) keşfedilmiştir. Başlangıçta bu keşif taksol üretimi için endofitik mantar biyoteknoloji çağının doğuşu olarak tasarlanmıştır. Endofitik mantarların potansiyel avantajları arasında kolay genetik manipülasyon, kültür ortamlarında hızlı büyüme, güvenilir ve yüksek paklitaksel üretimi gibi özellikler bu yöntemin endüstriyel üretim için tercih edilmesinin önemli noktalarıdır. İlaç şirketleri endüstriyel fermentasyon yoluyla endofitik mantarlarda taksol üretim olasılığı üzerinde araştırma yapmaktadır (Flores-Cotera, 2010). Her yıl yapılan araştırmalarda tahmini bir milyon endofitik mantar türü kültürlenmiş ve elenmiştir (Suryanarayanan ve diğ., 2009). Yaklaşık 200 endofitik mantar çeşidinin taksol ürettiği rapor edilmesine (Kharwar ve diğ., 2011) rağmen hiçbir çalışma başarılı bir şekilde endüstriyel biyoproseslere dönüştürülememiştir (Kusari ve diğ., 2014). Ayrıca Staniek ve diğ. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada “Endofitik mantarlar taksol üretir” hipotezini çürütebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada, *Taxomyces andreanae* izolatının metabolik ayrıntılı analizi yapılmıştır ve endofitik paklitaksel üretimini doğrulayacak bir veriye rastlanılmamıştır. “Taksol için bir mantar fabrikası” görüşü, sürdürülebilir ve ekonomik paklitaksel kaynağına duyulan arayışının neticesinde bir erken sonuç çıkarımı olarak yorumlanmaktadır. Diğer çalışmalarda; izole edilen endofitik mantarda taksol miktarı 0,001 ng/mL kadar çok az verimlilikte elde edilmiştir ve tek başına bir üretim gözlenmemiştir. Bu nedenle, endofitik mantarların taksan üretilip üretilmediği, immünolojik ve analitik yöntemlerle yanlış tanılama yapıldığı konusunda ki belirsizlikler devam etmektedir (Flores-Cotera, 2010). Cevaplanmamış sorulara rağmen uzun vadeli ve uygulanabilir bir yöntem olarak endofitik

mantarların taksol üretme çalışmaları devam etmektedir. Ancak hala endüstriyel ölçekli Taxol® üretimi sağlanamamaktadır (McElroy ve Jennewein, 2018).

Sekonder metabolitlerin moleküler biyoloji temeline dayalı yöntemler kullanılarak arttırılması kapsamındaki çalışmalardan taksol ile ilişkili olanlarda, en ümitvar yaklaşımların gen anlatımı değişimleri ile paklitaksel üretiminin arttırılmasıdır. Bu kapsamda gen anlatımı değişimlerine yönelik olarak sentetik biyoloji ve heterolog gen aktarımı yaklaşımları ve hücre kültürü tekniklerinin iyileştirilmesiyle paklitaksel üretimi daha verimli hale getirilmektedir. Moleküler düzeydeki çalışmalar gelecek vaatmesine karşın henüz endüstriyel düzeydeki taksan üretimine yansıtılamamıştır (McElroy ve Jennewein, 2018).

Diğer bir alternatif yöntem ise paklitakselin öncüsü olan 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomanin bileşiklerinin yarı sentezinden taksol üretimidir (Wang ve diğ., 2011; Kingston ve Molinero, 1994). Bu üretim ilk defa Avrupa'da yetişen *Taxus baccata*'nın iğnelerinden ekstre edilen 10-deasetilbakkatin III'den yarısentez sonucu Taxotere adı verilen taksol analogunun sentezlenmesi ile yapılmıştır (Colin ve diğ., 1990). Bu yöntem pahalı olmasına rağmen günümüzde ilaç endüstrisinin tercih ettiği tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Gallego ve diğ., 2017). Ayrıca Qiao ve Kondo (2018) tarafından yapılan bir çalışmada sefalomanin'nin paklitaksel öncüsü özelliği olmasının yanı sıra glioblastoma tümör hücrelerinin canlılığını azaltmasını sağladığı belirtilmiştir. Glioblastoma (GBM) erişkinlerde sık görülen merkezi sinir sisteminin malign primer tümörüdür. GBM tedavisindeki ilerlemelere rağmen hastaların prognozu kötü olmaya devam etmektedir ve acilen yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Sefalomanin, GBM hücre soylarında yüksek inhibisyonlara neden olmuştur. Sefalomaninin GBM tümör hücrelerinin canlılığını azaltabildiği ve GBM tedavisinde sefalomaninin kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Dünyada gün geçtikçe artan taksol ihtiyacının karşılanabilmesi için yeni alternatif kaynaklar aranmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda fındık (*Corylus avellana* L.) bitkisinde paklitaksel bileşiğinin bulunduğu keşfedilmiştir (Hoffman ve diğ., 1998). Bu keşif araştırmacıların dikkatini çekmiştir ve fındığın potansiyel taksol kaynağı olabileceği umuduyla çalışmalar başlatılmıştır. Bugüne kadar fındık bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar gıda değerleri üzerine olmasına rağmen bu keşif ile hastalara umut olacak yeni bir kapı açılmıştır ve taksol ihtiyacını karşılayabilecek bir kaynak olması umulmaktadır (Gallego ve diğ., 2017). Fındık bitkisinin yaprak, çotanak, sert kabuk dokularında yapılan taksan türevi bileşiklerinin

analizinde, bu bileşiklerin tespit edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Shahidi ve Alaşalvar, 2004; Ottaggio ve diğ., 2008; Hoffman ve Shahidi, 2009; Oğuzkan ve diğ., 2018). Bu çalışmalar, 2.7.3 bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2.6 FINDIK BİTKİSİ

Fındık hem önemli bir besin maddesi hem de değerli bir ilaç birleşimi olarak antik çağdan günümüze kadar gelen bir bitkidir. Uygur destanından El Kanun Fi't-Tıbb eserine kadar birçok seyahatname, bilim, tarih, tıp eserlerinde fındıktan söz edilmiştir (Duman, 2010). Çin ve İran kaynaklarından edinilen Uygur destanında; fındık meyvesinin Tanrı'nın armağanı olarak gönderdiği beş meyveden biri olduğu yer almaktadır (Banarlı, 1971).

Fındık bitkisi, Fagales (Kayıngiller) takımının, Betulacea (Huşgiller) familyasının, *Corylus* L.cinsi içerisinde yer almaktadır. Meyveleri yenilebilen, çalı ve ağaç formunda gelişebilen, kuzey yarı kürenin ılıman iklim bölgelerinde yetişen türlerinin bulunduğu belirtilmektedir. *Corylus avellane* L. (Adi fındık), *Corylus maxima* Mill. (Lambert fındığı) ve *Corylus colurna* L. (Türk fındığı) çeşitleri ekonomik olarak önem arz eden başlıca fındık çeşitleri olarak sıralanmaktadır (Yaltırık, 1997).

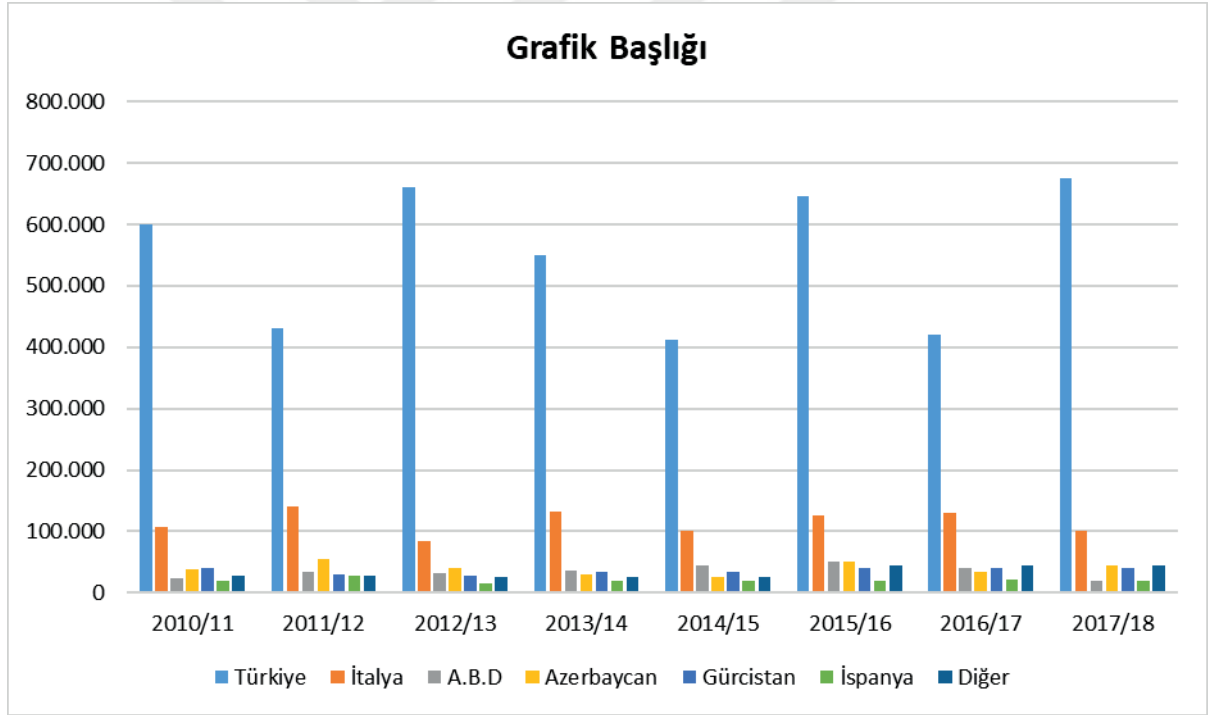
2.6.1 Türkiye'de Fındık Üretiminin Önemi

Dünyada fındık üretimi ve tüketimi belirli bir bölgenin ekonomik ve sosyal yaşantısı üzerinde önemli izlere sahiptir. Fındık üretiminin ülkemizdeki önemi, iktisadi katkısıdır. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın verilerine göre Türkiye'de yaklaşık 700 bin hektarlık alanda 400 bin aile fındık üretimi ile ülke ekonomisine önemli kazanç sağlamaktadır (ZMO,2018).

Türkiye, İtalya, İspanya, ABD ve Yunanistan başlıca fındık üreten ülkelerdir. Dünyanın ilk fındık üreticisi ve ihracatçısı Türkiye'dir ve bunun yanında dünya fındık üretiminin yaklaşık %70'ini ve dünya ihracatının yaklaşık %82'sini elinde bulundurur. İtalya üretim ve ihracatta % 20 ve % 15 oranları ile ikinci sırada gelmektedir. Tablo 2.1 ve Şekil 2.7'de ülkelerin yıllara göre fındık üretimi (ton) verilmiştir. Genel olarak, yıllara göre dalgalanmalar görünse de dünya fındık üretimi Türkiye'nin fındık üretimine paralel artmaktadır (FAO, 2019).

Tablo 2.1: Dünya Fındık Üretimi (ton) (TUIK, 2018). Fındık üretiminde dünya sıralamasında önde gelen ülkelerin yıllara göre fındık üretim miktarları (ton) verilmiştir.

Ülkeler	Türkiye	İtalya	A.B.D	Azerbaycan	Gürcistan	İspanya	Diğer	TOPLAM
2010/11	600.000	107.000	24.500	39.000	40.000	20.000	27.000	857.500
2011/12	430.000	140.000	35.000	55.000	30.000	27.000	27.000	739.000
2012/13	660.000	84.000	32.000	40.000	28.000	16.000	25.000	885.000
2013/14	549.000	132.000	36.300	30.000	35.000	19.500	25.000	825.500
2014/15	412.000	100.000	43.500	25.000	35.000	19.500	25.000	660.773
2015/16	646.000	125.000	50.000	50.000	40.000	20.000	45.000	969.500
2016/17	420.000	130.000	40.000	35.000	40.000	21.000	45.000	720.000
2017/18	675.000	100.000	20.000	45.000	40.000	19.000	44.500	997.500



Şekil 2.7: Dünya Fındık Üretimi (ton) (TUIK, 2018).

2.6.2 Türkiye’de Yetiştirilen Fındık Çeşitleri

Fındık (*Corylus avellana L.*) bitkisi; kış mevsiminde yapraklarını döken ağaç veya çalı formunda bitkiler olarak bilinirler. Türkiye 40°-41° enlem ve 37°-42° boylamları arasında yer almaktadır. Fındık ılıman iklim bitkisi olduğu için coğrafik olarak bu alanlar içinde fındık yetiştirmeye en uygun bölge Karadeniz bölgesidir. Çiçeklenme Şubat-Mart aylarında başlarken,

tohumun olgunlaşması ve toplanması Ağustos-Eylül aylarında başlar. Olumsuz şartlara dayanıklıdır bu yüzden uzun yıllar yaşayabilmektedirler (Köksal, 2002; Polat ve Güney, 2015).

Türkiye’de fındık üretimi yapılan bölgeler 3 gruba ayrılmaktadır: I. Standart Bölge; Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Artvin, II. Standart Bölge; Samsun, Sinop, Kastamonu, Zonguldak, Bolu, Düzce, Bartın, Sakarya ve Kocaeli ve Çerezlik Bölge ise başta İstanbul ve Bursa olmak üzere 25 kadar ilimizi kapsamaktadır (GTB, 2017). Genel olarak Türkiye’de fındık üretimi Karadeniz Bölgesinde yapılmakla birlikte dünya üretimin %70’lik parçasını oluşturan (FAO, 2019) son on yıllık 570.000 tonluk ortalama üretimi ile öne geçmektedir (GTB, 2018).

Türkiye’de 18 standart fındık çeşidi yetiştirilmektedir ve ülkemizin farklı bölgelerinde sinonimleri ile bilinmektedir. Aşağıda 18 standart fındığın isimleri ve sinonimleri verilmiştir. (TTSM, 2019; Balık ve diğ., 2016).

- 1) **ÇAKILDAK:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Delisava Fındık, Gök Fındık veya Göv (Gög) Fındık**" olarak sinonim isimleriyle bilinmektedirler. Geç yapraklanma özelliğine sahip olduğu için ilkbahar donlarına dayanıklıdır. Meyveyi iyi saran uzun zulufları vardır. Bu özelliklerinden dolayı don olaylarının yaşandığı Ordu gibi bölgelerde yaygın olarak yetiştirilir ve her yıl düzenli meyve verirler. Diğer çeşitlere göre tabla kısımları daha geniş ve açık renklidir.
- 2) **KALINKARA:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Giresun Karası**" olarak sinonim ismiyle bilinmektedirler. Çift iç oranı yüksektir, çok sayıda püs meydana getirir, çiçek tozu, çimlenme oranı fazladır, zurufu uzundur ve meyveyi sıkı sarar. Bu özelliklerinden dolayı genelde tozlayıcı olarak kullanılırlar. Yaygın olarak Giresun’da yetiştirilmektedir.
- 3) **SİVRİ:** Kurak iklime hassas bir özelliği vardır bu yüzden kurak geçen yıllarda meyve dökümü hasat öncesi fazladır. Giresun’da yüksek verimlilikle yetiştirilmektedir. Çiçek tozlarının çimlenme oranı yüksektir ve fazla sayıda erkek çiçek oluşturlar.
- 4) **PALAZ:** Türkiye’de Palaz fındık; en çok yetiştirilen fındık çeşidi olarak Tombul fındıktan sonra gelmektedir. Kalın yaprak dokusu, uzun ve yırtmaçlı zuruf yapısı ve dolgun, yuvarlak iri meyvesi ile Tombuldan ayrılır. Erken yapraklandığı için ilkbahar donlarından fazla zarar görmektedir. Samsun ve Ordu illerinde yaygın olarak yetiştirilir.

- 5) **TOMBUL:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Yağlı Fındık**, **Giresun Yağlısı** veya **Mehmet Arif Fındığı**" olarak sinonim isimleriyle adlandırılmaktadır. Bu çeşit dünyanın en kaliteli çeşidi olarak bilinir. Türkiye’de en fazla üretimi yapılan ve önem verilen fındık çeşididir. Yağ, protein ve beyazlama oranı yüksek ve meyveleri yuvarlaktır. Bu özellikler bu çeşidin çerezlik ve sanayilik değerini artırmaktadır. Giresunda yetiştirilmektedir.
- 6) **FOŞA:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Yomra** veya **Boyhane** " olarak sinonim isimleri ile bilinirler. Çakıldak kadar olmasa da geç yapraklanma özelliğine sahiplerdir ve zurufları meyveleri çakıldak fındıktaki kadar sıkı sarmaz. Bu özelliklerinden dolayı Trabzon ve Düzce gibi yüksek kesimlerde tercih edilmektedirler.
- 7) **CAVCAVA:** Sinonimi; " **Kocakarı**" fındığıdır. Az miktarda Trabzon ve Samsun şehirlerinde yetişmektedir.
- 8) **GİRESUN MELEZİ:** 2012 yılında tescil edilmiştir. Kargalak ve Tombul fındığın melezidir. Tombul fındıktan yaklaşık 11 gün geç yapraklanmaktadır.
- 9) **İNCEKARA:** Zurufları uzun ve dişli bir yapıdadır bu nedenle meyveyi sıkı sarar. Sınırlı bir yetiştirme alanına sahip olmalarına rağmen çok sayıda erkek çiçek oluşturmaktadır.
- 10) **ALLAH VERDİ:** Seleksiyon ile elde edilmiş bir çeşittir ve 2015 yılında tescil edilmiştir. Verim dalgalanması azdır ve yüksek verimliliğe sahiptir. Tombul fındığa göre 10 ile 15 gün arasında daha geç yaprak açar.
- 11) **KAN:** İç zarı kırmızı renklidir bu özelliği ile diğer çeşitlerden ayrılır. Sınırlı bir miktarda üretilmektedir.
- 12) **KARA:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Karayağlı**" sinonim ismiyle bilinmektedir. Düzce ve Sakarya illerinde yüksek verim ile yetiştirilir.

- 13) **KARGALAK:** Meyve ve iç büyüklüğü fazladır bu özelliğinden dolayı diğer fındık çeşitlerinden ayrılır. Giresun ve Trabzon'da yetiştirilmektedir.
- 14) **YUVARLAK BADEM:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Değirmendere**" fındığı olarak sinonim ismiyle bilinir. Genellikle taze tüketime yönelik üretilirler Düzce ve Sakarya illerinde yaygın olarak üretilirler ve hasat öncesi döküm fazladır.
- 15) **YASSI BADEM:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Değirmendere**" fındığı (yuvarlak badem çeşidinde olduğu gibi) olarak sinonim ismiyle bilinmektedir. Meyveleri yassı ve meyveyi fazla sıkmayan yırtmaçlı zurufları bulunur ve bu özellikleri ile yuvarlak bademden ayrılmaktadır.
- 16) **MİNCANE:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Sarı Fındık, Sarı Yağlı Fındık ve Sıra Fındık**" olarak sinonim isimleri ile bilinirler. Tombul fındık çeşidine genetik yapısı olarak en yakın olan çeşittir. Batı Karadeniz ve Trabzon'da yetiştirilir.
- 17) **OKAY 28:** 2012 yılında tescil edilmiştir. Tombul ve Kargalak çeşitlerinin melezidir. Geç yapraklanmaktadır hatta yaklaşık Tombul dan 1 hafta kadar geç yapraklanır ama verimi ve iç oranı yüksektir.
- 18) **UZUNMUSA:** Ülkemizin bazı bölgelerinde " **Oskara Yağlısı veya Eniste Fındığı**" olarak sinonim isimleri ile bilinirler. İç oranı yüksektir ve Ordu' da belirli bir alanda yetiştirilmektedir.

2.6.3 Fındıkta (*Corylus avellana* L.) Yapılan Taksan Türevi Maddelerin Tespit Çalışmaları

Literatürde fındıkta taksan türevlerinin tespit edilme çalışması ilk kez Hoffman ve diğ. (1998) tarafından yayınlanmıştır ve 2004 yılında Türkiye'de Fındık Tanıtım Grubu tarafından desteklenen TUBİTAK projesi ile 'Fındık ve Fındık Yan Ürünlerinde Fitokimyasal Maddeler ve Biyoaktif Bileşikler' adlı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, Tombul fındığın yaprak, çotanak, sert kahverengi kabuk, fındık zarı ve meyve dokularında inceleme yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi etanol ile gerçekleştirilmiştir ve HPLC sonuçları LC-MS ile doğrulanmıştır. Çalışmanın sonucunda Tombul fındığın yaprak, çotanak ve sert kabuğunda

taksan bileşiklerleri tespit edilirken fındık zarı ve meyve dokularında rastlanılmamıştır. Sonuçlar internet siteslerinde yayınlanmıştır (Shahidi ve diğ., 2004).

Ottaggio ve diğ. (2008), 3 farklı yükseklik ve iklimden toplanan fındık sert kabuk ve yaprak dokularında taksan türevi bileşiklerin analizini yapmışlardır. Ekstraksiyon işleminde metanol kullanılmıştır. ELİSA ve HPLC-MS yöntemi ile fındık kabuk ve yaprak dokularında farklı miktarlarda taksan bileşiklerinin tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Hoffman ve Shahidi (2009), Giresun bölgesinden temin ettikleri Tombul fındığın yaprak, çotanak, sert kabuk, ince kabuk ve meyve dokularında taksan türevi bileşiklerin varlığını incelemişlerdir. Etanol ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır ve analizler HPLC cihazı ile yapılmış sonuçlar LC-MS cihazı tarafından kanıtlanmıştır. Sonuçlara göre, 10-deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel farklı miktarlarda çotanak ve sert kabukta tespit edilmesine rağmen ince kabuk ve meyve dokularında tespit edilememiştir.

Oğuzkan ve diğ. (2018), 19 farklı lokasyondan temin edilen fındıkların sert kabuk ve çotanak dokuları incelenmiştir. Dokuların ekstraksiyon işlemleri metanol çözücüsü ile yapılmıştır ve LC-MS/MS cihazı ile taksan türevi maddeler analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, fındık çeşit ayrımı yapmadan 19 farklı lokasyondan hasat edilen fındık dokularında taksan türevinin varlığı kanıtlanmıştır.

Bestoso ve diğ. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *Corrylus avellana L.* ve *Taxus baccata* bitkilerinin aynı deneysel şartları sağlayan hücre kültürleri kurulmuştur. Kültür sonuçlarına göre, şimdiye kadar sadece *Taxus* türünde bulunduğu düşünülen taksol üretimini sağlayan enzimlerin fındıklarda da gösterilmiştir. Kültüre alınan *C. avellana L.*'nin *Taxus baccata*'ya göre daha hızlı bir şekilde kallus oluşturduğunu ve hücre süspansiyonunda daha kolay büyüme sağladığını bildirmişlerdir. Miele ve diğ. (2007) tarafından *Corrylus avellana L.* ve *Taxus baccata* bitkilerinin hücre kültürlerinin kurulduğu bir başka çalışma yapılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre; *Taxus baccata*'dan elde edilen kalluslardan sadece biri tomurcuğa farklılaşabilirken *Corrylus avellana L.*'dan elde edilen kalluslar tomurcuğa farklılaşarak genç bir bitki üretilebilmiştir. *Corrylus avellana L.*'nin *in vitro* olarak yetiştirilme kolaylığı, *Taxus baccata*'dan taksan türevi bileşiklerin deneysel koşullarda üretilmesinden daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Kallusun alındığı eksplant tipleri de taksan türevi bileşiklerinin üretimi için önemli bir nokta olabilir. Bu çalışmada, hızlı büyüme ve yüksek verimlilik nedenleri ile

findığın tohumundan kallus elde edilmiştir. .Bu sonuçlar değerlendirildiği zaman, taksan türevi bileşiklerinin ve yarı sentez için gerekli prekürsör bileşiklerinin temininde findık (*Corylus avellana* L.) alternatif bir kaynak olarak gün yüzüne çıkmaktadır. Biyoteknolojik temelli taksan türevi bileşiklerinin üretilmesi için findık bitkisine uygulanan hücre kültürü çalışmalarının iyileştirilebilmesine ve taksan miktarının arttırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Gallego ve diğ., 2015; Sarmadi ve diğ., 2019).

Fındık bitkisinde yapılan taksan türevi bileşiği analiz çalışmalarında yetersizlikler vardır. Çalışmalar kapsamında ya sadece Tombul fındık incelenmiş ya da fındık çeşitleri tanımlanmadan toplu bir şekilde analizler yapılmıştır. Ayrıca insanlar tarafından en çok tüketilen fındık meyve ve ince kabuk dokularında taksan türevi bileşiklerin varlığı ve miktarı tespit edilememiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez kapsamlı bir çalışma yürütülerek 5 farklı fındık çeşidi (Çotanak, Kalinkara, Palaz, Sivri ve Tombul fındık) ve 2 farklı fındık genotipi (Ham ve Sivri Yağlı fındık) incelenmiştir. Bu fındıkların her birinin 5 ayrı dokusunda (Çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve), taksan türevi bileşikler (10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, Sefalomanin ve Paklitaksel) HPLC analizi ile tayin edilerek miktarları hesaplanmıştır.

Fındık (*Corylus avellana* L) bitkisinin hücre kültür teknikleri ile taksan türevi bileşiklerinin miktarında artış sağlamak için çalışmalar yapılmaktadır. Rezai ve diğ. (2011), *Corylus avellana* L. tohumunun hücre süspansiyonunu kurmuşlardır ve ultrason, salisilik asit elisitörlerini kullanarak taksol üretim miktarını incelemişlerdir. Kontrol grubu ile sonuçlar karşılaştırıldığı zaman sadece ultrason uygulamasına mağruz kalan hücre süspansiyon kültüründe taksol üretimi 2 kat, salisilik asit uygulanmış olanda 5 kat ve iki elisitörün birlikte kullanıldığı kültürde 14 kat taksol miktarı artmıştır. Ultrason ve salisilik asitin birlikte bir sinerji oluşturarak taksol miktarını yükselttiği tahmin edilmektedir.

Diğer bir çalışmada, Gallego ve diğ. (2015) tarafından *Corylus avellana* L.hücre süspansiyon kültürü kurularak 2 farklı elisitör ile paklitaksel ve bakkatin III bileşiklerinin miktarındaki değişim incelenmiştir. Hücre kültürü için fındık bitkisinin kök, yaprak ve meyve dokuları kullanılmıştır. 15 günün sonunda meyve dokusundan elde edilen kallus daha fazla olduğu için, meyve doku kallusunun hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Elisitör olarak koronatin (cor) ve metil jasmonate (MeJA) kullanılmıştır. 2 haftalık kültürün ardında farklı elisitörler uygulanan hücre süspansiyon kültürleri kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak;

kontrol grubunda bakkatin III'ün miktarı 22,7 µg/L iken, MeJA elisitörü uygulanmış hücre süspansiyon kültüründe 60,8 µg/L ve Cor uygulamasında 609,3 µg/L olarak hesaplanmıştır. Paklitaksel miktarı ise sırayla MeJA-10,04 µg/L ve Cor-14,03 µg/L olarak analiz edilmiştir. Kontrol grubunda ise paklitaksel tespit edilememiştir. Elisörlerin paklitaksel ve bakkatin III miktarına etkisinin incelendiği bu çalışmada Cor elisitörünün etkinliği MeJA'a göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Corylus avellana L.türü taksan türevi bileşiklerini yüksek miktarda içeren bir tür olmasa da çalışmalarda elde edilen üretim seviyeleri *Taxus spp.* hücre süspansiyonları ile kıyaslanabilmektedir. *Corylus avellana* L. nesli tükenmekte olan bir tür değildir ve geniş üreme alanına sahiptir. Ayrıca *Taxus* türüne göre fındıklarda daha hızlı ve kolay kallus oluşumu gözlenmektedir. Bu sebeplerden ötürü taksan biyosentetik yolağının açıklanmasıyla devam eden gelişmelerin katkısıyla *Corylus avellana* L., taksan türevi bileşiklerinin elde edildiği alternatif bir kaynak olabilir.

Bu tezin amacı, Türkiye'de üretilen fındık bitkilerinden kanser tedavisinde kullanılan taksan türevlerinin üretim potansiyellerini ortaya koymak amacıyla kullanılabilecek fındık çeşitlerini belirlemektir. Bu amaçla, Türkiye'de yetiştirilen 5 farklı fındık çeşidi ve 2 farklı fındık genotipi ilk kez incelenmiştir. Ek olarak bu her bir fındığın 5 ayrı dokusunda antikanser özellikte olan 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel maddelerinin varlığını ve miktarını tespit eden ilk geniş çaplı çalışma yapılmıştır.

2.7 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ (HPLC)

Kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adı kromatografi olarak adlandırılmaktadır ve bir karışımda bulunan bileşenlerin farklı çalışma basamakları ile birbirinden ayrılmasını gerçekleştirmektedir. Kimyasal ayırmalar, saflaştırılma, bileşiklerin izolasyonu, tanımlanması ve miktar tayini için HPLC analizinden yararlanılmaktadır. HPLC sabit faz (kolon) ve hareketli faz (mobil faz) düzenekleri ile bu işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için uygun ortam sağlamaktadır. Örnekteki farklı bileşenler mobil faz yardımıyla sabit faz içinden geçerken sabit faza ait dolgu maddeleri ile etkileşime geçerler, bu etkileşim süreci örnekteki bileşenlerin farklı kimyasal yapılarına göre farklı hızlarda olmaktadır. Sabit faz içinde değişik sürelerde tutulan bileşenler, farklı zamanlarda sabit fazı terkederler ve sırayla sabit fazı terkeden bileşenlerim derişimi dedektör ile ölçülerek kromatogram grafikleri elde edilir.

Şekil 2.8’de gösterildiği gibi HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) cihazının temel donanımları sırasıyla; pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör olmak üzere 4 kısımdan oluşmaktadır.

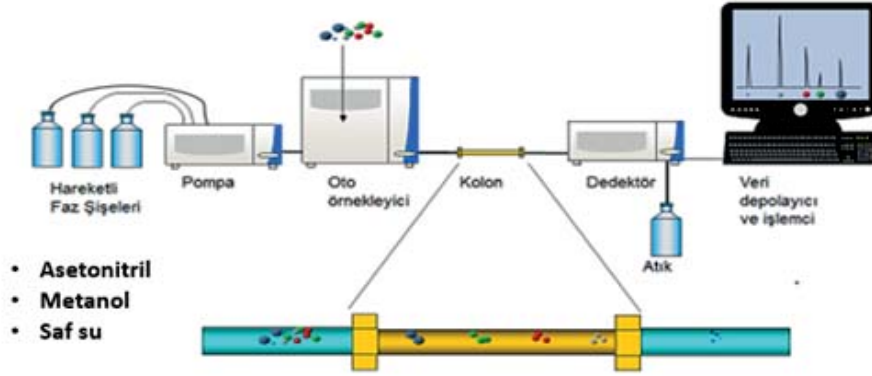
Pompa: HPLC donanımının temel bileşenlerden biri olan pompa; mobil fazı oluşturan çözücülerin ve mobil faz içerisinde yer alan örnekteki bileşenlerin sırasıyla enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör içerisinden belirli basınç ve hızda geçmesini sağlamaktadır. Mobil faz diğer ismiyle hareketli faz; farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır ve bu özellikleri ile enjekte edilen örnekteki bileşenleri sabit faz (kolon) boyunca taşınmasını sağlamaktadır. HPLC sistem türleri kullanılan pompa ve çözücü sayısına göre; İzokratik sistem (tek pompa, tek çözücü, ayırım yetersizdir), düşük basınçlı gradient sistem (tek pompa, en fazla 4 farklı mobil faz) ve yüksek basınçlı gradient sistem (2- 3 pompa, 2- 3 farklı mobil faz) olmak üzere sınıflandırılabilir.

Enjektör: Analiz edilecek örneğin HPLC düzeneğine aktarılması işlemi düzenekte bulunan enjektör ile olmaktadır. HPLC donanımına göre oto-enjektör (bilgisayar kumandalı) ve manuel (elle kumanda edilen) olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır. Oto-enjektörler; araştırma merkezlerinde en sık tercih edilen enjektör çeşididir. XY ve Carousel olmak üzere 2 tiptir. XY tipi enjektör hareketlidir ve önceden seçili örneklerle ait bilgilerin bilgi işlemciye girilen koordinatlara göre o koordinatlara giderek örneği vialden çeker ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte eder. Carousel tipi enjektörde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı ile sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır. Manuel enjektörlerde ise enjektör öncelikle doldurma pozisyonuna getirilir ve örneğin enjekte edilebilmesi için sabit hacimli, loop içerisine doldurulur. Loop’a doldurulan örnek hacmi eğer loop sabit hacmini geçerse fazla olan kısım dışarıya otomatik olarak atılır. Bu aşamadan sonra enjektörün kolu enjeksiyon pozisyonuna getirilerek örnek mobil faz içerisine enjekte edilmiş olur. Kullanılan loop hacimleri değişmekle birlikte, loop hacmi küçüldükçe tekrarlanabilirlik adına yapılan hata oranı artmaktadır.

Kolon (sabit faz): Sabit faz, mobil faz ile birlikte gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli zamanda tutuldukları ve bu sayede ayrımlarının yapılarak farklı sürelerde sabit fazı terk eden bileşenlerin sırasıyla dedektörde ölçümlerinin yapılmasını sağlayan HPLC cihazının çok önemli bir kısmıdır. Sabit faz olarak söz edilen kromatografi tekniğinin çeşidine göre tasarlanmış kolonlardır. Bu kolonlar, modern HPLC donanımının 4 temel düzeneğinden birisidir ve çok karmaşık örneklerde bile bileşenlerin birbirinden ayrımını sağlam ve hızlı bir

şekilde sağlanmasını mümkün kılmaktadır. Kolonlar, ayrımı yapılacak bileşenlere göre farklı materyallerden (peek, teflon, cam, paslanmaz çelik), farklı dolgu maddelerinden çeşitli ölçülerde üretilmektedir. Kolonun bu özellikleri prosedürdeki akış hızına ve bundan dolayı oluşacak basınca dayanıklı olarak seçilmesine dikkat edilmelidir. HPLC uygulamasında kolonun ayırım gücünden yararlanılırken kolonun yapıldığı materyalden ziyade iç yüzeyindeki dolgu maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliği etkili olmaktadır. Bu tür dolgu maddeleri çok çeşitlidir ve uygulamalarda analizi yapılacak bileşinlerin özelliklerine, mobil fazdaki çözücülere ve HPLC uygulamasında yer alan parametrelere göre seçilmelidir. HPLC kolonunun içi çapı 2-5 mm aralığında değişmekle birlikte kolonun iç çapının artması akış hızını ve iç doldurma hacmini arttırırken kromatogramda elde edilen piklerin çözünürlüğünü ve duyarlılığını azaltmaktadır. Kolonlar iç çapı haricinde çeşitli uzunluklara da sahip (genellikle 30-300 mm aralığında) olmakla birlikte kolonun uzunluğunun artması analiz süresini ve kullanılacak mobil faz miktarını arttırmasına rağmen örnekteki bileşenlerin ayrımı daha iyi olmaktadır. Farklı boyutlardaki kolonlara uluslararası standartlar getirilmiştir. Örneğin, NOVA Spher 100 Phenyl-Hexyl C18 kolonu (250 mm x 4.6 mm, 5 µm parçacık boyutu) yazıldığında, kolonun 250 mm uzunluk ve 4,6 mm iç çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Kolonun markası NOVA Spher olup sabit faz türü normal fazda kullanılan bir tür olan C18 dir ve dolgu materyaline ait partikül büyüklüğü 5 µm'dir. Analizi yapılacak örnekteki bileşenlerin mobil faz içerisinde kolona (sabit faz) gelmesiyle bileşenler kolondaki dolgu maddesi ile bir süre etkileşime girerek farklı zamanda tutulurlar ve sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu özelliklerinden dolayı her kimyasal bileşik için belirli analitik koşullarda parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanının (retention time- t_R) bulunduğu belirtilmektedir. Alıkonma zamanı; belirli deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin kolonu terketmesi için geçen zamanı göstermektedir.

Dedektör: Mobil faz ile kolona gelen bileşenlerin burada farklı alıkonma süreleri ile sabit fazı terk ederek dedektör vasıtasıyla miktar tayinleri yapılmaktadır. HPLC'de analizi yapılacak bileşiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre dedektör seçilmektedir. Floresans, kütle, refraktif indeks, evaporatif ışık dağıtıcı, fotodiyot array, iletkenlik, elektrokimyasal ve ultraviyole / görünür bölge dedektörlerinden HPLC metoduna uygun olanı seçilmektedir (Snyder ve diğ., 2011; Adem, 2015).



Şekil 2.8: HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Okanongan, 2019).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında, Ordu'nun Fatsa ilçesinde (40°59'27.9"N 37°35'01.6"E) bir üretici bahçesinden hasat edilen Çakıldak, Sivri, Kalınkara, Tombul ve Palaz fındık çeşitleri (TTSM, 2019) ile Sivri Yağlı ve Ham fındık genotipleri kullanıldı. Ağustos 2017'de hasat edilen fındık materyalleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ümit SERDAR tarafından temin edildi. Fındıklar tez çalışması süresince oda sıcaklığında muhafaza edildi. Analizler fındık çeşit ve genotiplerinin çotanak (zuruf), sert kabuk (perikarp), ince kabuklu meyve, ince kabuk (testa) ve meyve (tohum) kısımları olmak üzere 5 farklı fındık dokusunda yapıldı.

3.2. ÖN HAZIRLIK

Bu tez çalışması, Aksoy ve diğ. (2017) tarafından geliştirilen yöntem ve tavsiye edilen malzemeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Dokular, HPLC analizi için ekstraksiyon öncesi ön hazırlığa tabi tutuldu. Fındıkların çotanağı el ile sert kabukları ise fındık kıracağı ile kırılarak ayıklandı. Fındık çeşitlerinin sert kabuklarından ayrılmış ince kabuklu meyve dokuları kendi içinde 2 gruba ayrıldı. İlk gruptaki ince kabuklu meyve dokuları; ince kabuk ve ince kabuksuz meyve dokularının temini için kullanıldı. İkinci gruptaki ince kabuklu meyve dokuları ise hiçbir işlem uygulanmadan analiz için bekletildi. İlk gruptaki ince kabuklu meyve dokuları bir gece su dolu bir beher içinde oda sıcaklığında bekletildi ve ertesi gün ince kabuklar el ile soyuldu. Bu işlem sonunda ince kabuklu meyve dokularından ince kabuk ve meyve dokuları ayrı ayrı elde edildi.

3.3. ÖĞÜTME İŞLEMİ

Çakıldak, Sivri, Sivri Yağlı, Tombul, Kalınkara, Ham ve Palaz fındıklarının her birinin çotanağı ayrı ayrı Loyka LKD 100 öğütme değirmeni ile sert ve ince kabukları, ince kabuklu meyveleri ve meyveleri ise ayrı ayrı Sinbo kahve öğütücü ile toz haline gelene kadar öğütüldü.

3.4. TARTMA İŞLEMİ

Çotanaklar, sert kabuklar, meyveler ve ince kabuklu meyveler ayrı ayrı 10,0'ar gram, ince kabuklar ise ayrı ayrı 0,12 gram olacak şekilde hassas terazi ile tartılarak ayrı ayrı Erlen mayerlere alındı.

3.5. ÇÖZÜCÜ MUAMELESİ

3.5.1. Yağdan Arındırma

Yağdan arındırma işlemi, 7 farklı fındığın her birinin 3 ayrı dokusunda (İnce kabuk, ince kabuklu meyve, meyve) diğer dokulara kıyasla daha fazla bulunan yağı uzaklaştırmak için yapıldı. Fındıkların 10,0'ar gram öğütülmüş ince kabuklu meyve ve meyve dokuları 20,0 mL n-hexane ile 0,12 gram öğütülmüş ince kabukları ise 10,0 mL n-hexane ile magnetik karıştırıcıda 1 saat (25 °C, 400 rpm) yıkandı. Örnekler filtre kâğıdı ile süzüldü. Filtre kâğıdının üst kısmında kalan yağdan arındırılmış kısım temiz Erlenmayerlere alındı. Yağdan arındırma işlemi HPLC analizi sırasında safsızlıklara yer verilmemesi ve daha okunaklı kromatogramların alınabilmesi için yapıldı.

3.5.2. Metanol Ekstraksiyonu

Metanol ekstraksiyonu 7 farklı fındığın her birinin 5 farklı dokusuna uygulandı. Metanol ekstraksiyon hazırlama koşulları ve ekstraksiyon konsantrasyonları aşağıda ki Tablo 1'de verildi. Öğütülmüş 10,0'ar gram çotanaklar 150,0 mL metanol (1:15), sert kabuklar, ince kabuklu meyveler ve meyveler 100,0 mL metanol (1:10) ve öğütülmüş 0,12 gram ince kabuklar ise 10,0 mL metanol ile ekstre edildi. Ekstraksiyon işlemi için çotanaklar 72 saat, diğer dokular ise 24 saat magnetik karıştırıcılarda (25 °C, 400 rpm de) ekstre edildi (Tablo 1). Metanol ekstraksiyonu ile fındık doku örneklerinin içinde bulunan taksan bileşikleri, fenolik bileşikler, sekonder metabolitler, renk pigmentleri gibi maddelerden metanol içinde çözünebilen bileşikler metanol içine alınmış oldu. Bu aşamada önemli olan nokta metanol içinde çözülebilen maddelerin metanole fazına geçmesi, metanol içinde çözünmeyenlerin ise metanol çözeltisi içinde yer almamasıdır.

Tablo 3.1: Farklı fındık dokularında ekstraksiyon için kullanılan çözücüler ve uygulama koşulları.

Dokular	Başlangıç Miktarı	Çözücü Muamelesi	Oran	Zaman	Çözücü Muamelesi	Oran	Ekstraksiyon Zamanı
Çotanak	10,0 gram	-	-	-	% 100 MetOH	1:15	72 h
Sert Kabuk	10,0 gram	-	-	-	% 100 MetOH	1:10	24 h
İnce Kabuk	0,12 gram	n-Hexane	1:10	1 h	% 100 MetOH	1:10	24 h
İnce kabuklu meyve	10,0 gram	n-Hexane	1:20	1 h	% 100 MetOH	1:10	24 h
Meyve	10,0 gram	n-Hexane	1:20	1 h	% 100 MetOH	1:10	24 h

3.6. SÜZME İŞLEMİ

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra metanol çözeltileri filtre kâğıtları ile şilifli Erlenmayerlere süzüldü. Fındık içinde bulunan metanol çözücüsü içinde çözünebilen maddeler ekstraksiyon sırasında metanol içinde çözüldüğü için fındık dokularının katı fazı ortamdan uzaklaştırıldı.

3.7. EVAPORASYON İŞLEMİ

Şilifli Erlenmayerlere süzülen metanol çözeltilerine Rotary evaporatörde (Heidolph™ Hei-Vap™) evaporasyon işlemi uygulandı. Vakum altında basınç düşürülerek, metanolün düşük sıcaklık altında buharlaştırılması sağlandı. Düşük basınç metanol çözücüsünün hızlı bir şekilde düşük sıcaklıkta buharlaşmasını ve ana maddenin (taksan bileşikleri) sıcaklıktan etkilenmeden çözücünden (metanol) ayrılarak alınmasını sağladı. Evaporasyondan sonra şilifli Erlenmayerler içinde metanol çözücüsünden uzaklaştırılmış kalıntı (rezidü) olarak adlandırılan maddeler elde edildi.

3.8. VİALLEME İŞLEMİ

Evaporasyon işleminden sonra şilifli Erlenmayerlerdeki kalıntılar (rezidü) 3,0 mL HPLC grade metanol (% 99.99) ile çözüldü ve 1,5 mL'lik viallerin içine otomatik pipet yardımı ile alındı (1000 µL). HPLC analizinden önce bu viallerin içindeki metanol çözeltileri 0,20 µm membran filtre yardımıyla cam amber vial içine filtre edildi.

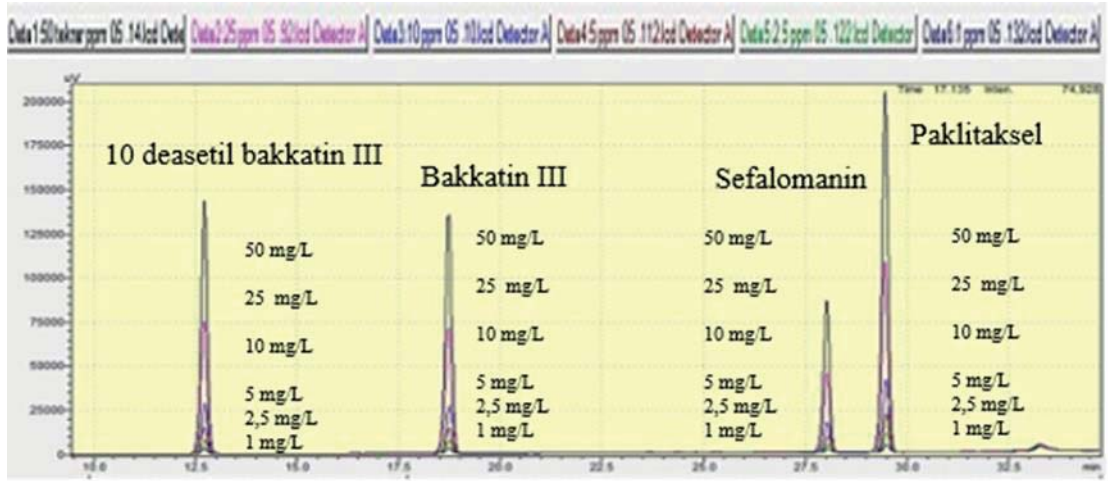
3.9. HPLC (YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ) ANALİZİ

3.9.1 Taksan standartlarının HPLC analizi

Sigma Aldrich'den temin edilen toz 10 - deasetil bakkatin III (> %95, HPLC), bakkatin III (>%95, HPLC), sefalomanin (>%97, HPLC) ve paklitaksel (>%95, HPLC)'den ayrı ayrı ana stok çözeltileri hazırlandı. Ana stok çözeltileri hazırlamak için; her bir standarttan 1,0'er mg kullanıldı ve 1,0 mL HPLC grade metanolü ile çözdürüldü. Hazırlanan her bir standartın ana stoğu 1000 ppm olarak hazırlandı. Ana stoklardan 50 mg/L'lik standart çözelti hazırlandı ve Denklem 3.1 yardımıyla seri seyreltmeler ile 6 farklı yoğunlukta standart çözelti serileri hazırlandı (50 mg/L; 25 mg/L; 10 mg/L; 5 mg/L; 2,5 mg/L ve 1 mg/L). Bu farklı yoğunlukta hazırlanan 6 standart çözelti birer kez HPLC ile analiz edildi. 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel'in alıkonma zamanları belirlendi. Şekil 3.1'de seyreltilmiş 6 standart çözeltisinin alıkonma zamanı kromatogramı verildi. 11-12 dakikalar arasında seyreltilmiş standart çözeltilerinin okunması ile oluşturulan 10 - deasetil bakkatin III'ün, 16-17 dakikalar arasında bakkatin III'ün, 25-26 dakikalar arasında sefalomanin ve 26-27 dakikalar arasında ise paklitakselin pikleri görülmektedir. 4 farklı zaman aralığında pik yükseklikleri, standart çözeltilerin seyreltilmesi ile düzenli olarak azalmaktadır. Bu analiz sonucunda standart bileşiklerinin alıkonma zamanları belirlendi ve kalibrasyon eğrisi çizmek için seyreltilmiş 6 farklı absorbans değeri elde edildi.

$$C_1 \cdot V_2 = C_2 \cdot V_1$$

(Denklem 3.1)



Şekil 3.1: 4 farklı standart bileşiğinin alıkonma zamanlarının karşılaştırılma kromatogramı. (10 deasetilbakkatin III (11-12 dk) , Bakkatin III (16-17 dk) ,Sefalomanin (25-26 dk) , Paklitaksel (26-27 dk) . Her alıkonma zamanında bulunan siyah (50 mg/L), pembe (25 mg/L), mavi (10 mg/L), mor (5 mg/L), yeşil (2,5 mg/L), lacivert (1 mg/L) pikler yukarıdan aşağıya seyrletilmiş standart çözeltilerin pikleridir.

3.9.2 Fındık çeşit ve genotip dokularının HPLC analizi

Fındık ekstratlarının içerdiği taksan diterpenoid bileşiklerinin tayini ve miktar analizi 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) kullanılarak yapıldı. Ters Faz Sıvı Kromatografisi ile yapılan bu çalışma ile sabit faz apolar (Kolonun içindeki madde silika yapıda ve apolardır), hareketli fazın (Asetonitril, saf su polardır) ise polar olmasından yararlanıldı. Hareketli fazda analiz esnasında farklı zamanlarda farklı çözücüler (Asetonitril, saf su) kullanıldığı için bu sistemde gradient sistem kullanıldı. HPLC donanımının temel parçası olan pompa uygulama sırasında hareketli fazı oluşturan çözücü karışımlarının (Asetonitril, saf su ve metanol) enjektör, kolon ve dedektör içerisinden 1 dakikada 1.000 mL (1.000 mL/ dk) sabit akış sağlayacak hızla ve belirli basınç altında geçmesini sağladı. HPLC donanımını oluşturan enjektör oto-enjektör (Autosampler) olduğu için numuneler bu viallerden 0,20 µm membran fitreler ile 1,5 mL yarı kapaklı amber viallere fitreliyerek aktarıldı ve vialler oto-örnekleyici bölüme yerleştirildi. Yerleştirilen viallere ait bilgiler bilgi işlemciye girildi. Kullanılan XY tipi enjektör hareketli olduğundan önceden belirttiğimiz koordinatlara giderek örnekleri vialden ardı ardına 3 kez 20 µL miktarında (teknik tekrar) çekti ve loop vasıtasıyla hareketli faza enjekte etti. Bu işlem bir vialden adı ardına 3 tekrar yapıldıktan ve analizleri bittikten sonra diğer vial geçmesi şeklinde devam etti. Enjektör yardımı ile hareketli faza enjekte edilen bileşenler C18 kolonu (sabit faz) içinde dolgu maddesi olan silika ile etkileşimleri sebebiyle bir miktar tutuldu.

Bu tutulma süresi kolonun apolar, hareketli fazın, polar olmasına, partikül boyutuna, kimyasına, sıcaklık, pH gibi şartlara göre değişiklik gösterdi. Örnekler içinde farklı bileşenler bulunduğu için tutulma süresi farklı sürelerde oldu çünkü örneklerimiz içinde taksan bileşiklerinin yanı sıra renk pigmentleri, fenolik bileşikler, vitaminler, karbonhidratlar, inorganik maddeler gibi çeşitli maddeler bulunmaktaydı ve her birinin polaritesi, yapısı, partikül büyüklüğü farklıydı. Böylece bileşenler hareketli fazın (C18 kolonun) sonlarına doğru farklı hızlarda ilerledikleri için birbirinden ayrılmış halde sabit fazı farklı zamanlarda terk etti. Bu şekilde hareketli fazdan alıkonma zamanlarına göre çıkan bileşenler sırayla UV-detektör içerisinden geçerek miktar tayinleri yapıldı. UV detektör, örnek içindeki maddelerin 228 nm dalga boyunda farklı miktarda ışığı absorblama özeliğine göre ışığın yoğunluğunu ölçtü. Bu yoğunluk detektörde bir cevap oluşturdu ve yazılım sayesinde bilgisayar ekranında görülen bu her maddenin konsantrasyon profili (cevabı) pik olarak karşımıza çıktı. X-ekseni zamanı gösterirken (genellikle dakika cinsinden), Y- eksenine ise dedektörün ölçtüğü absorbansı gösterdi. Kromatogramda zamanla Y- ekseninde ölçülen absorbans değerinin artıp azalması şeklinde oluşan pik şeklindeki eğrilere herbiri analizlenen maddeye ait bir bileşeni gösterdi. Işığın örnek içindeki madde tarafından absorblanması madde miktarı ile orantılı olduğundan hangi örnekte fazla miktarda taksan bileşiği varsa onun ışık absorbansı daha yüksek olduğundan pik alanı daha büyük oldu ve fazla miktarda bulunduğu görüldü. Bu piklere ait değerler (pik alanı, yüksekliği, vb.) kullanılarak, kalibrasyon eğrisi baz alınarak mg/L cinsinden, örneklerde bulunan taksan bileşiklerinin kalitatif (maddelerin ne olduğu) ve kantitatif (madde miktarları) analizleri yapıldı.

HPLC analizi için; Acetonitril HPLC grade (> % 99,93), saf su, metanol HPLC grade (%99,99) çözücüler (Merck; Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Analize başlamadan önce C18 kolunu yıkanarak içinde kalan maddelerin uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlem için kullanılan yıkama metodu şu şekildedir; Metot 15.01 dakika sürdü, düşük basınçlı gradient sistem kullanıldı, toplam akış hızı 1.000 mL/ dk olarak ayarlandı, %100.0 metanol HPLC grade (%99,99) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra kolonun HPLC metoduna uyum sağlayabilmesi için şartlama metodu uygulandı. Bu işlem için kullanılan şartlama metodu şu şekildedir; Metot 15 dakika sürdü, düşük basınçlı gradient sistem kullanıldı, toplam akış hızı 1.000 mL/dk olarak ayarlandı (Asetonitril % 90.0: Saf su %10.0 kullanıldı (90:10). Bu işlemlerden sonra asıl HPLC analiz metodu uygulandı; Metot 55.00 dakika sürdü, düşük basınçlı gradient sistem kullanıldı, akış hızı 1.000 mL/dk olarak ayarlandı (Asetonitril: su 25:75- 15 dk, 75:25 - 40 dk) UV detektörü (228 nm) kullanıldı.

3.10. İSTATİSTİK ANALİZ

HPLC analizi sırasında teknik tekrar (3 tekrar) yapıldı. Analizlerin sonuçları HPLC yazılımı sayesinde mg/L olarak elde edildi. Sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla mg/L değerleri Denklem 3.2 yardımıyla $\mu\text{g} / \text{g}$ değerlerine dönüştürüldü. 3 tekrarlı sonuçların ortalaması alındı ve standart sapmaları hesaplandı (ortalama $\pm$ standart sapma, $n=3$). Hesaplama işlemleri Mikrosoft Ofis Eksel, 2016 programı kullanılarak yapıldı. HPLC analiz sonuçlarının $\mu\text{g} / \text{g}$ değerleri Tablo 3.2’de verildi.

$$\text{ppm} = \text{mg/L}$$

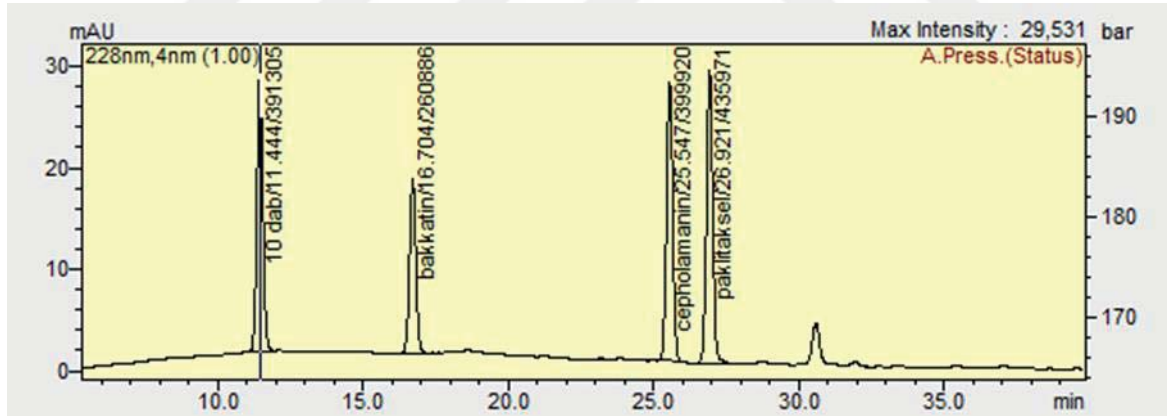
(Denklem 3.2)

4. BULGULAR

Bu tezde, Türkiye’de yetiştirilen Çakıldak, Sivri, Kalınkara, Tombul ve Palaz fındık çeşitleri (TTSM, 2019) ile Sivri Yağlı ve Ham fındık genotipleri kullanıldı. 7 farklı fındığın 5 ayrı dokusunda (Çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve) antikanser özelliğe sahip 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel taksan bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri HPLC (ters faz) cihazı ile gerçekleştirildi.

4.1. TAKSAN DİTERPENOİD STANDARTLARININ HPLC ANALİZİ

10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel taksan bileşiklerinin fındıkların farklı dokularında varlıklarını belirlemek ve miktarını hesaplayabilmek için yapılan analizler ve 4 farklı standartın 228 nm’de HPLC sonucu alıkonma süreleri Şekil 4.1’de verildi. 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, Sefalomanin ve paklitaksel için alıkonma zaman aralıkları sırasıyla; 11-12 dakika, 16-17 dakika, 25-26 dakika ve 26-27 dakika olarak tespit edildi (Şekil 4.1).

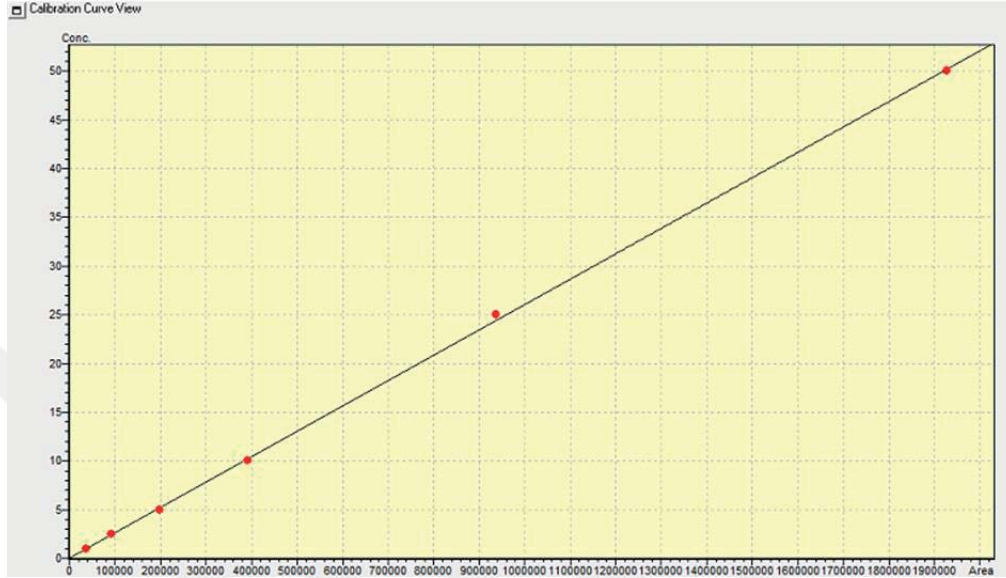


Şekil 4.1:HPLC analizinde 228 nm’de standart bileşiklerinin alıkonma zamanını gösteren kromatogram. 10 deasetilbakkatin III (11-12 dakika), Bakkatin III (16-17 dakika), Sefalomanin (25-26 dakika), Paklitaksel (26-27 dakika).

4.2. KALİBRASYON EĞRİSİNİN ÇİZİLMESİ

Kalibrasyon eğrisi, stok standart çözeltilerden seri seyreltmeler ile hazırlanan 6 farklı standart çözeltide (50 mg/L; 25 mg/L; 10 mg/L; 5 mg/L; 2,5 mg/L ve 1 mg/L) bulunan taksan bileşiklerinin konsantrasyon ve HPLC absorbans değerlerinin X-Y koordinat düzlemine aktarılıp kesişme noktalarını birleştirilmesi ile elde edilen grafikdir. 6 farklı standart çözelti serisinin absorbans

ve konsantrasyon değerleri ile Şekil 4.2’de gösterilen kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisi fındıkların farklı doku numunelerinin HPLC okumalarına göre konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanıldı.



Şekil 4.2: Kalibrasyon eğrisi (50 mg/L; 25 mg/L; 10 mg/L; 5 mg/L; 2,5 mg/L; 1 mg/L standart çözeltiler). X eksen: Absorbans, Y eksen: Konsantrasyonlar (Korelasyon katsayısı değeri; $R^2 = 0,9997416$).

4.3. 7 FARKLI FINDIK ÇEŞİDİNİN HPLC ANALİZ SONUÇLARI

Bu tez çalışmasında taksan bileşiklerinin varlığının ve miktarının analiz edildiği 7 farklı fındık çeşidinde 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomanin fındıkların farklı dokularında farklı miktarlarda tespit edildi. Paklitaksel ise Ham, Palaz, Kalınkara, Sivri ve Tombul fındıkta belirlendi. Tablo 4.1’de taksan bileşiklerinin farklı fındıklarda ki miktarları $\mu\text{g} / \text{g}$ cinsinden verildi. Tablo 4.1’den de izlenebileceği gibi, taksan bileşiklerinin en yüksek miktarda tespit edildiği fındık çeşidi/genotipi-dokusu-miktarı sıralaması: **10 - deasetil bakkatin III**; Ham fındık-sert kabuk - 9,48 $\mu\text{g/g}$ > **Bakkatin III**; Tombul fındık - ince kabuk - 10,44 $\mu\text{g/g}$ > **Sefalomanin**; Sivri Yağlı fındık-ince kabuk - 6,37 $\mu\text{g/g}$ > **Paklitaksel**; Ham fındık-ince kabuklu meyve- 4,36 $\mu\text{g/g}$.

Tablo 4.1: 5 farklı çeşit (Çakıldak, Kalıncara, Palaz, Sivri fındık) ve 2 farklı genotip (Ham, Sivri Yağlı fındık) fındığın her birinin 5 ayrı dokusunda yapılan HPLC analiz sonuçları. Ortalama $\pm$ Standart sapma ($n = 3$), ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık), TE: Tespit edilemedi, İK Meyve: İnce kabuklu meyve.

Fındık Çeşitleri – Fındık Dokuları ($\mu\text{g/g}$)		10-deasetil bakkatin III	Bakkatin III	Sefalomanin	Paklitaksel
Çakıldak Fındık	Çotanak	TE	$2,12 \pm 0,16$	TE	TE
	Sert Kabuk	$2,26 \pm 0,38$	$0,25 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,02$	TE
	İnce Kabuk	TE	TE	$0,30 \pm 0,20$	TE
	İK Meyve	$1,36 \pm 0,08$	TE	$0,67 \pm 0,06$	TE
	Meyve	TE	$0,38 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,06$	$0,00052 \pm 0,00003$
Kalıncara Fındık	Çotanak	TE	TE	TE	$1,80 \pm 0,25$
	Sert Kabuk	$2,73 \pm 0,27$	$0,54 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$
	İnce Kabuk	TE	$7,53 \pm 1,44$	$0,86 \pm 0,58$	TE
	İK Meyve	$0,24 \pm 0,06$	TE	$0,72 \pm 0,05$	TE
	Meyve	TE	$0,30 \pm 0,00$	$0,73 \pm 0,58$	$0,01 \pm 0,00$
Ham Fındık	Çotanak	TE	TE	TE	$1,99 \pm 0,16$
	Sert Kabuk	$9,48 \pm 1,48$	$1,30 \pm 0,14$	$1,05 \pm 0,03$	TE
	İnce Kabuk	TE	$6,21 \pm 0,48$	$4,31 \pm 0,20$	TE
	İK Meyve	$0,99 \pm 0,47$	TE	TE	$4,36 \pm 0,16$
	Meyve	TE	$0,09 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,00$	TE
Palaz Fındık	Çotanak	$1,29 \pm 0,08$	TE	TE	$3,37 \pm 0,20$
	Sert Kabuk	$2,13 \pm 0,03$	TE	$0,33 \pm 0,21$	$0,04 \pm 0,00$
	İnce Kabuk	TE	$2,45 \pm 0,10$	TE	TE
	İK Meyve	$0,17 \pm 0,02$	$5,78 \pm 1,48$	$4,74 \pm 0,78$	$0,29 \pm 0,03$
	Meyve	TE	$3,71 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,06$	TE
Sivri fındık	Çotanak	TE	TE	TE	$0,30 \pm 0,00$
	Sert Kabuk	$4,75 \pm 0,37$	TE	$0,11 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,03$
	İnce Kabuk	TE	$2,35 \pm 0,11$	TE	TE
	İK Meyve	$0,42 \pm 0,09$	$4,45 \pm 0,72$	$5,14 \pm 0,16$	$0,62 \pm 0,06$
	Meyve	TE	$0,18 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,05$	TE
Sivri Yağlı Fındık	Çotanak	$1,96 \pm 0,12$	TE	$1,04 \pm 0,05$	TE
	Sert Kabuk	$4,27 \pm 0,32$	$2,47 \pm 0,84$	$0,37 \pm 0,21$	$0,02 \pm 0,01$
	İnce Kabuk	TE	$4,65 \pm 0,27$	$6,37 \pm 1,24$	TE
	İK Meyve	$2,26 \pm 0,15$	TE	$5,34 \pm 0,21$	TE
	SYF Meyve	TE	$0,17 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,00$
Tombul Fındık	Çotanak	TE	$0,35 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	TE
	Sert Kabuk	$5,77 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,15$	$0,07 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,00$
	İnce Kabuk	TE	$10,44 \pm 0,98$	TE	TE
	İK Meyve	TE	$3,22 \pm 0,02$	$1,16 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$
	Meyve	TE	$0,83 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,40$	$0,07 \pm 0,03$

4.3.1. 10 - deasetil bakkatin III HPLC Analiz Sonuçları

10 - deasetil bakkatin III, incelenen 5 farklı fındık çeşidinde ve 2 genotipte de saptandı. Her fındığın dokusunda farklı miktarda tespit edilen taksan bileşiği, baskın olarak sert kabuk dokularında tespit edildi. Fındıkların farklı dokularında tespit edilen 10 - deasetil bakkatin III'ün karşılaştırmalı sütun grafiği Şekil 4.4'de verildi. Sütun grafiğine göre; sert kabuklarda Ham (9,48 $\mu\text{g/g}$), Tombul (5,76 $\mu\text{g/g}$), Sivri (4,75 $\mu\text{g/g}$), Sivri Yağlı (4,26 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (2,72 $\mu\text{g/g}$), Çakıldak (2,26 $\mu\text{g/g}$) ve Palaz (2,12 $\mu\text{g/g}$) sırasıyla 10 - deasetil bakkatin III'ün en fazla miktarda tespit edildiği fındıklardır. Bu fındıklardan 10 - deasetil bakkatin III'ün en yüksek miktarda tespit edildiği Ham fındığa ait örnek kromatogram Şekil 4.3'de verildi. Bu kromatogramda; 10 mg/L standart çözeltide okunan sonuçlara göre alıkonma zamanı 11-12. dakikalar olan pembe renkli pik 10 - deasetil bakkatin III'e aittir. Bu standart pik ile ham fındığın sert kabuğunun alıkonma zamanları kesişti. Bu kesişme ham fındığın sert kabuğunda 10 - deasetil bakkatin III'ün tespit edildiğini gösterdi ve HPLC cihazının yazılımı kullanılarak miktar analizleri yapıldı.

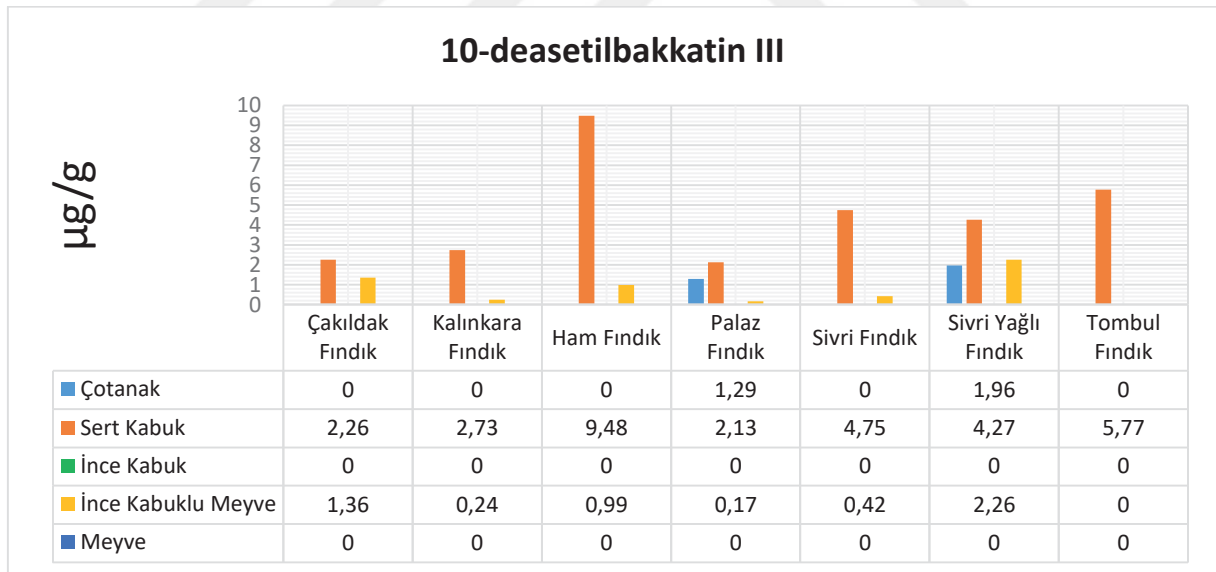
10 - deasetil bakkatin III, fındıkların ince kabuklu meyvelerinde sadece Tombul fındığın meyvesinde tespit edilemedi, diğer tüm fındıklarda ise farklı miktarlarda 10 - deasetil bakkatin III tespit edildi. İnce kabuklu meyvelerde tespit edilen 10 - deasetil bakkatin III miktarlarına göre yapılan sıralama; Sivri Yağlı (2,26 $\mu\text{g/g}$), Çakıldak (1,36 $\mu\text{g/g}$), Ham (0,99 $\mu\text{g/g}$) dır. Kalınkara (0,24 $\mu\text{g/g}$), Palaz (0,17 $\mu\text{g/g}$) ve Sivri (0,41 $\mu\text{g/g}$) fındıkların ince kabuklu meyvelerinde belirlenen 10 - deasetil bakkatin III miktarlarının ise yaklaşık olarak eşit olduğu belirlendi.

10 - deasetil bakkatin III, Sivri Yağlı (1,96 $\mu\text{g/g}$) ve Palaz (1,28 $\mu\text{g/g}$) fındıkların çotanağında tespit edilmesine karşın, diğer fındıklarda bulunamadı.

Fındıkların ince kabuk ve meyve dokularında ise 10 - deasetil bakkatin III saptanmadı.



Şekil 4.3: 10 - deasetil bakkatin III' ün en çok tespit edildiği Ham fıncığının sert kabuk kromatogramı. Pembe pikler: 10 mg/L standart çözeltisi; 1: 10- deasetil bakkatin III (11-12 dk); 2:Bakkatin III (16-17 dk); 3 Sefalomanin (25-26 dk); 4: Paklitaksel (26-27dk). Üst üste siyah, mavi, mor pikler; Ham fıncığının sert kabuğunun 3 tekrarını göstermektedir.



Şekil 4.4: 10 - deasetil bakkatin III'ün tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı dokusunda $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.

4.3.2. Bakkatin III HPLC Analiz Sonuçları

Analiz edilen 5 farklı çeşit ve 2 genotip fındıklarda Bakkatin III bileşiği bulundu. Bu taksan bileşiği fındık dokuları arasında en fazla ince kabuk dokusunda tespit edildi. Bakkatin III'ün

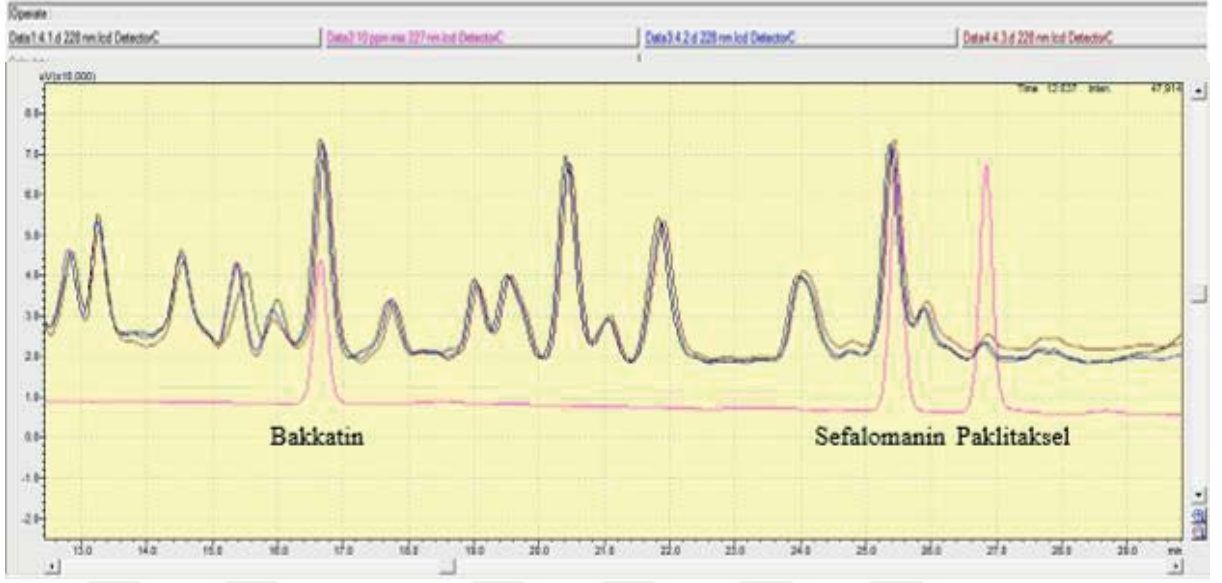
findık dokularındaki miktarları Şekil 4.6'daki karşılaştırmalı sütun grafiğinde gösterildi. Grafiğe göre ince kabuk dokusunda tespit edilen bakkatin III bileşiğinin miktarı çoktan aza doğru Tombul (10,44 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (7,53 $\mu\text{g/g}$), Ham (6,21 $\mu\text{g/g}$) ve Sivri Yağlı (4,65 $\mu\text{g/g}$) findık olarak sıralanmaktadır. Bakkatin III'ün yüksek miktarda Tombul findığının ince kabuk dokusunda tespit edildiğini gösteren kromatogram Şekil 4.5'de verildi. Kromatograma göre; 10 mg/L standart çözeltisinin okunması ile 16-17. dakikalarda ortaya çıkan pembe pik bakkatin III standartının alıkonma zamanını gösteren bir piktir. 16-17. dakikalarda bakkatin III standartının piki ile Tombul findığının ince kabuk dokusunun alıkonma zamanları birbirleriyle çakışmaktadır. Bu çakışma Tombul findığının ince kabuklu dokusunda bakkatin III bileşiğinin olduğunu göstermektedir. HPLC cihazının yazılımı kullanılarak ve kalibrasyon eğrisi baz alınarak bakkatin III bileşiğinin Tombul findığının ince kabuk dokusundaki miktarı hesaplandı. Bakkatin III findıklar arasından sadece Çakıldak findığının ince kabuk dokusunda tespit edilmedi.

Bakkatin III, Palaz ve Sivri findıkların sert kabuk dokusu hariç diğer findıkların sert kabuklarında tespit edildi. Sivri Yağlı (2,46 $\mu\text{g/g}$), Ham (1,30 $\mu\text{g/g}$), Tombul (1,01 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (0,25 $\mu\text{g/g}$) ve Çakıldak (0,53 $\mu\text{g/g}$) findıkların sert kabuklarında bulunan bakkatin III miktarı çoktan aza doğru bu şekilde sıralanmaktadır.

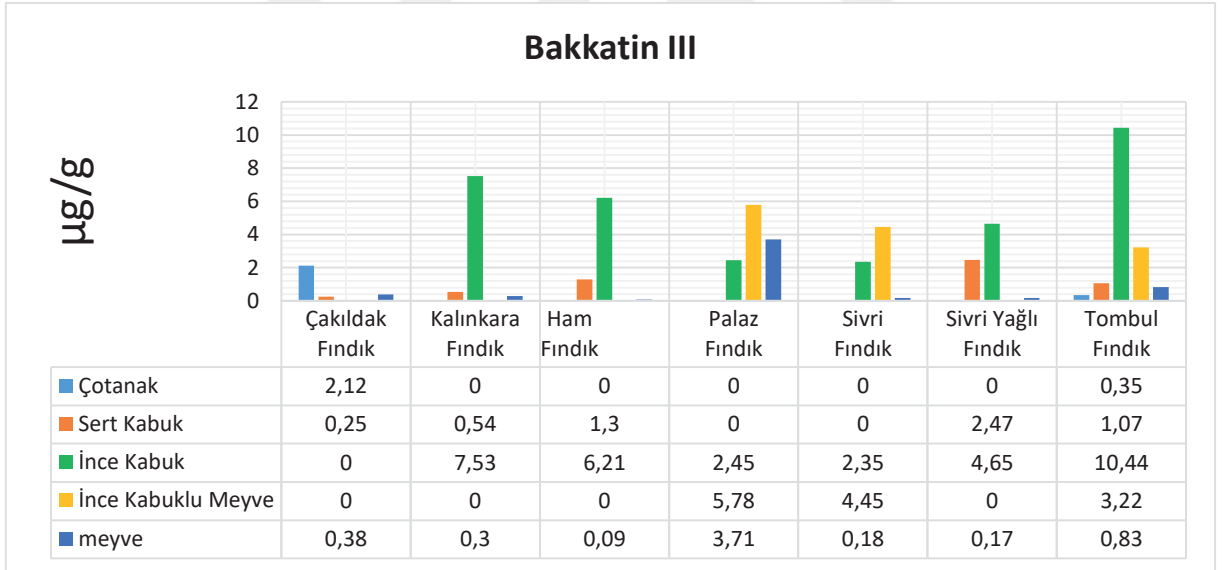
Bakkatin III, ince kabuk dokusundan sonra en fazla Palaz (5,78 $\mu\text{g/g}$) ve Sivri (4,45 $\mu\text{g/g}$) findıkların ince kabuklu meyve dokularında yüksek miktarda tespit edildi. Diğer findıkların (Çakıldak, Kalınkara, Ham ve Sivri Yağlı) ince kabuklu meyve dokularında rastlanmadı.

Bakkatin III, çotanak dokuları arasında sadece Çakıldak (2,11 $\mu\text{g/g}$) ve Tombul (0,35 $\mu\text{g/g}$) findıkların çotanak dokusunda tespit edildi.

Bakkatin III, bütün findıkların meyve dokularında tahlil edildi. Bakkatin III, Palaz findığının (3,71 $\mu\text{g/g}$) meyvesinde diğer findıkların meyvesine oranla yaklaşık 3 kat fazla bulundu. Tombul (0,82 $\mu\text{g/g}$), Çakıldak (0,38 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (0,30 $\mu\text{g/g}$) findıklarının meyveleri hemen hemen aynı miktarda bakkatin III içerdiği tespit edildi. Sivri (0,18 $\mu\text{g/g}$), Sivri yağlı (0,17 $\mu\text{g/g}$) ve Ham (0,08 $\mu\text{g/g}$) findık meyvelerinde bakkatin III tespit edilmesine rağmen ortalamanın altında bir değer hesaplandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: Bakkatin III'ün en çok tespit edildiği Tombul fındığın ince kabuk dokusunun yakınlaştırılmış kromatogramı. Pembe pikler: 10 mg/L standart çözeltisi; Bakkatin III (16-17 dk); Sefalomanin (25-26 dk); Paklitaksel (26-27dk). Üst üste siyah, mavi, mor pikler; Tombul fındığın ince kabuk dokusunun 3 tekrarını göstermektedir.



Şekil 4.6: Bakkatin III'ün tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı bölgesindeki $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.

4.3.3. Sefalomanin HPLC Analiz Sonuçları

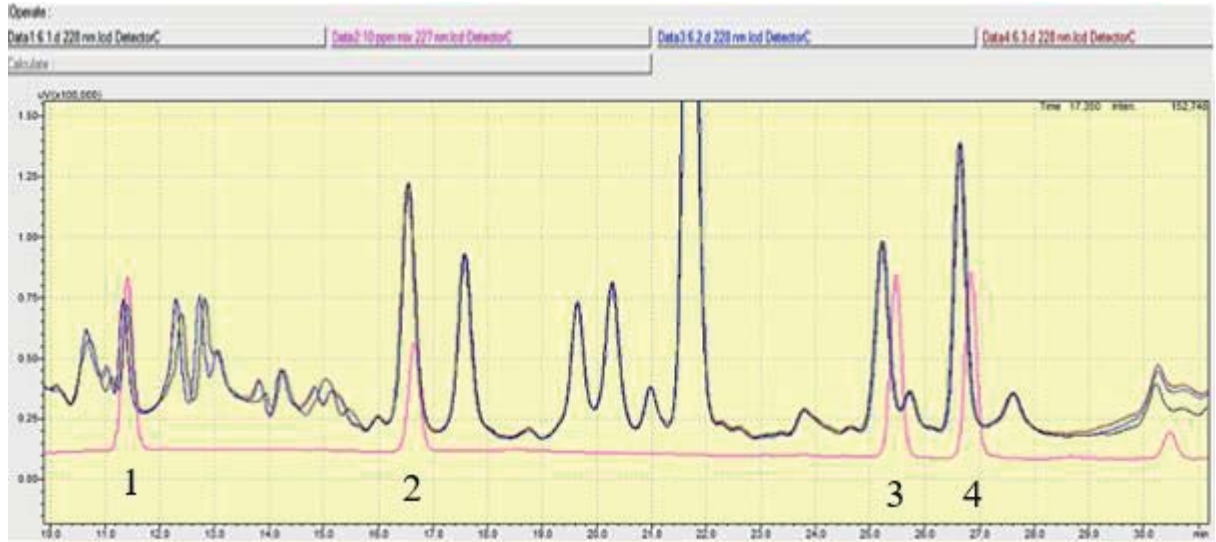
Sefalomanin analiz edilen fındık çeşit ve genotiplerin hepsinde tespit edildi. Sefalomanin, fındık dokuları arasında en fazla ince kabuk ve ince kabuklu meyve dokularında belirlendi. Dokular arasından belirlenen en yüksek ve en az Sefalomanin miktarı Şekil 4.8'de

karşılaştırmalı sütun grafiğinde gösterildi. Sütun grafiğine göre; Sivri Yağlı fındığın ince kabuğunda (6,37 $\mu\text{g/g}$) ve ince kabuklu meyvesinde (5,34 $\mu\text{g/g}$), Sivri (5,14 $\mu\text{g/g}$), Palaz (4,74 $\mu\text{g/g}$) ince kabuklu meyvesi ve Ham ince kabuk dokusunda (4,31 $\mu\text{g/g}$) tespit edilen sefalomanin miktarı hemen hemen yakın olmakla birlikte ortalama değerin yaklaşık 5 katı olarak saptanmıştır. Diğer fındıkların ince kabuklu meyvelerinde tespit edilen sefalomanin miktarları şu şekildedir; Tombul (1,16 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (0,72 $\mu\text{g/g}$) ve Çakıldak (0,66 $\mu\text{g/g}$) fındık. Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde, Palaz, Sivri ve Tombul fındıklarda ise ince kabuk dokularında Sefalomanin bileşiğine rastlanmadı. Şekil 4.7’de Sefalomanin’in en yüksek miktarda belirlendiği Sivri Yağlı fındığın ince kabuk dokusunda yakınlaştırılmış kromatogramı örnek olarak verildi. Bu kromatograma göre; 10 mg/L standart çözeltisinin okutulması ile UV-detektörde bir cevap oluşturuldu. Bu cevap kromatogramda 25-26. dakikalarda Sefalomanin alıkonma zamanı olarak pembe pik şeklinde görüldü. Sefalomanin standartının alıkonma zamanı ile Sivri Yağlı fındığın ince kabuk dokusunun alıkonma zamanları 25-26. dakikalarda kesişti. Kesişme ile Sivri Yağlı fındığın ince kabuk dokusunda bulunan Sefalomanin miktarı kalibrasyon eğrisi baz alınarak hesaplandı.

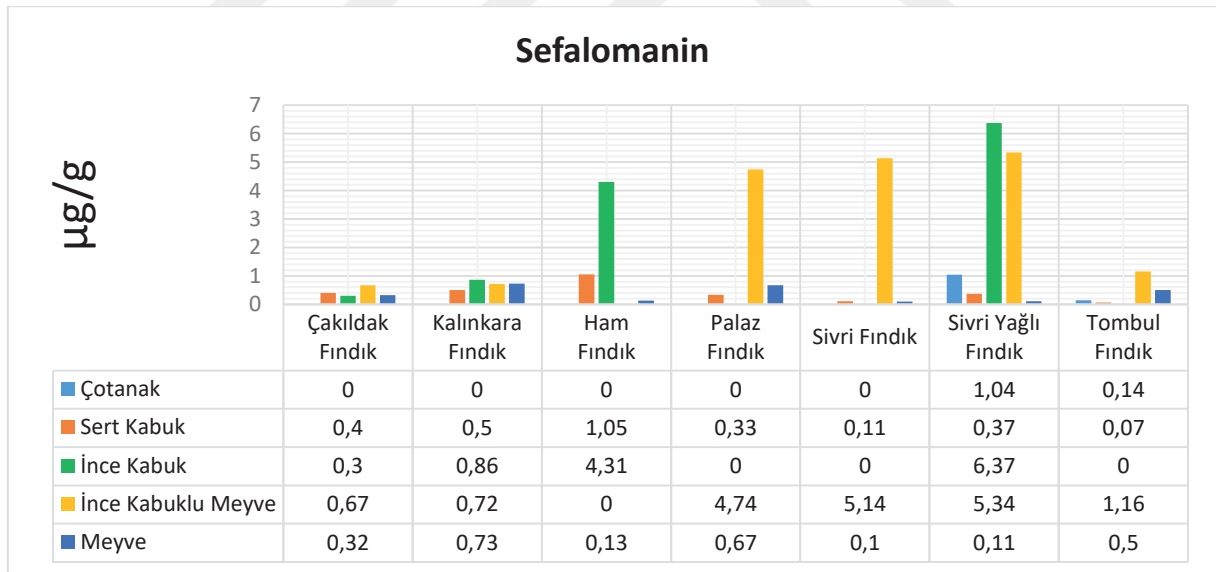
Sefalomanin, Sivri Yağlı (1,04 $\mu\text{g/g}$) ve Tombul (0,14 $\mu\text{g/g}$) fındıklarının çotanakları haricinde diğer fındık çotanaklarında tespit edilemedi.

Sefalomanin, fındıkların sert kabuklarında en yüksek Ham (1,05 $\mu\text{g/g}$), Kalınkara (0,49 $\mu\text{g/g}$) ve Çakıldak (0,40 $\mu\text{g/g}$) fındıklarda olmak üzere Sivri Yağlı (0,36 $\mu\text{g/g}$) ve Palaz (0,33 $\mu\text{g/g}$) fındıklarda birbirine yakın miktarlarda tespit edildi. En düşük miktarda ise Tombul (0,06 $\mu\text{g/g}$) fındıkta saptandı.

Sefalomanin, fındıkların meyvesinde ortalama eşit miktarda analiz edildi. Meyvelerde bulunan Sefalomanin miktarları sırasıyla; Kalınkara (0,73 $\mu\text{g/g}$), Palaz (0,67 $\mu\text{g/g}$), Tombul (0,50 $\mu\text{g/g}$), Çakıldak (0,31 $\mu\text{g/g}$), Ham (0,12 $\mu\text{g/g}$), Sivri Yağlı (0,11 $\mu\text{g/g}$) ve Sivri (0,10 $\mu\text{g/g}$) fındık olarak bulundu.



Şekil 4.7: Sefalomanin'in en çok tespit edildiği Sivri Yağlı fındığın ince kabuk dokusunun kromatogramı. Pembe pikler: 10 mg/L standart çözeltisi; 10 mg/L standart çözeltisi; 1: 10-deasetil bakkatin III (11-12 dk); 2:Bakkatin III (16-17 dk); 3 Sefalomanin (25-26 dk); 4: Paklitaksel (26-27dk). Üst üste siyah, mavi, mor pikler; Sivri yağlı fındığın ince kabuk dokusunun 3 tekrarını göstermektedir.



Şekil 4.8: Sefalomanin'in tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı dokusunda $\mu\text{g/g}$ miktarların sütun grafiği.

4.3.4. Paklitaksel HPLC Analiz Sonuçları

Paklitaksel, analiz edilen fındık çeşidi ve genotipleri arasında Ham, Palaz, Sivri, Tombul ve Kalıncara fındıklarında tespit edildi. Çakıldak ve Sivri Yağlı fındıkta ise hesaba katılmayacak kadar az miktarda saptandı.

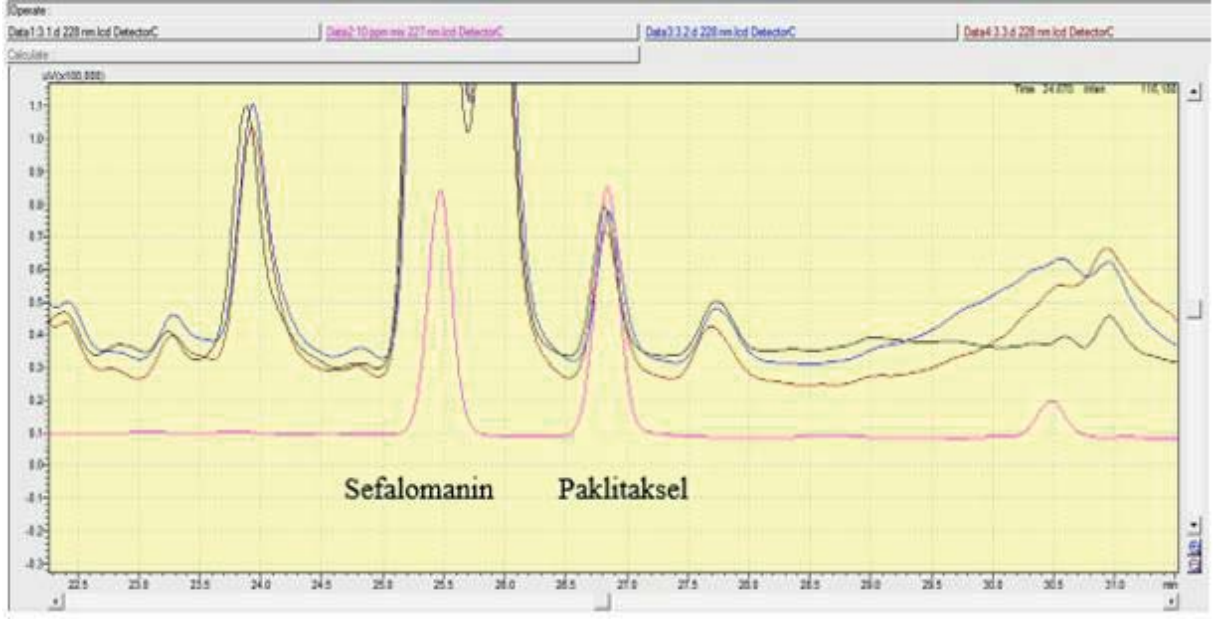
Paklitaksel en fazla Ham (4,36 $\mu\text{g/g}$) fındığın ince kabuklu meyvesinde tespit edildi. Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde ki Paklitaksel miktarı ortalamanın yaklaşık 4 katıdır. Paklitaksel miktarının dokular arasındaki farkı Şekil 4.10'da karşılaştırmalı sütun grafiğinde verildi. Sütun grafiğine göre, diğer fındıkların ince kabuklu meyvesinde ki Paklitaksel miktarı çoktan aza doğru Sivri (0,61 $\mu\text{g/g}$), Tombul (0,60 $\mu\text{g/g}$) ve Palaz (0,28 $\mu\text{g/g}$) fındık olarak belirlendi. Paklitaksel'in yüksek miktarda tespit edildiği Ham fındığın ince kabuklu meyvesinin yakınlaştırılmış kromatogramı Şekil 4.9'da verildi. Bu kromatograma göre; HPLC'de 10 mg/L standart çözeltisinin okutulmasıyla Paklitaksel standartının alıkonma zamanı 26-27.dakikalarda saptandı. Paklitaksel standartının 26-27.dakikada ki pembe piki ile Ham fındığın ince kabuklu meyvesinin HPLC'de okutulması ile oluşan piki 26-27.dakikalarda çakıştı. Bu çakışma Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde paklitaksel'in bulunduğunu gösterdi. Kalibrasyon eğrisinin yardımı ile paklitaksel'in Ham fındığın ince kabuklu meyvesindeki miktarı hesaplandı.

Paklitaksel, fındıkların çotanak dokularında sadece Palaz (3,37 $\mu\text{g/g}$), Ham (1,98 $\mu\text{g/g}$), Kalıncara (1,80 $\mu\text{g/g}$) ve Sivri (0,30 $\mu\text{g/g}$) fındıklarda tespit edildi. Çakıldak, Sivri Yağlı ve Tombul fındıklarda saptanmadı.

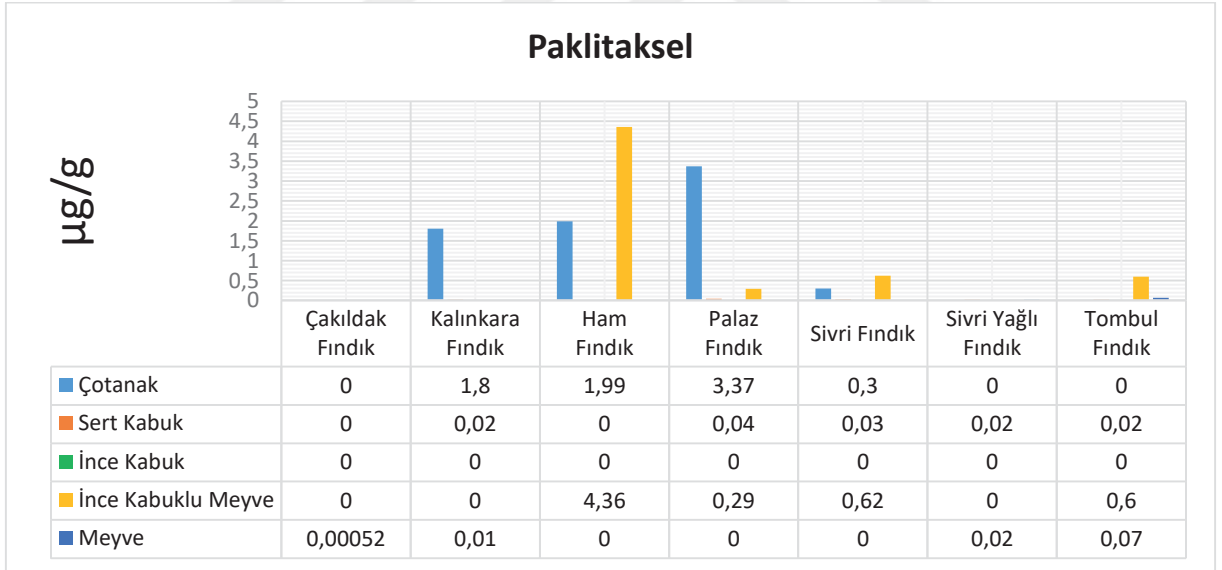
Paklitaksel'in sert kabuk dokularındaki miktarları; Palaz (0,03 $\mu\text{g/g}$), Sivri (0,03 $\mu\text{g/g}$) Sivri Yağlı (0,02 $\mu\text{g/g}$), Tombul (0,02 $\mu\text{g/g}$) ve Kalıncara (0,01 $\mu\text{g/g}$) fındıklarında birbirine çok yakın ve hemen hemen yok denecek kadar az miktarda tespit edildi. Çakıldak ve Ham fındıkların sert kabuklarında ise paklitaksel bulunamadı.

Paklitaksel, fındıkların meyve dokularında tespit edildi fakat miktarı sıfıra çok yakın hesaplandı. Paklitaksel'i bulunduran fındıklar sırasıyla; Kalıncara (0,01 $\mu\text{g/g}$), Tombul (0,07 $\mu\text{g/g}$), Sivri Yağlı (0,01 $\mu\text{g/g}$) ve Çakıldak (0,0005 $\mu\text{g/g}$) olarak bulundu.

Paklitaksel, ince kabuk dokularında tespit edilemedi.



Şekil 4.9: Paklitaksel'in fazla miktarda tespit edildiği Ham fındığın ince kabuklu meyvesinin yakınlştırılmış kromatogramı. Pembe pikler: 10 mg/L standart çözeltisi; Sefalomanin (25-26 dk); Paklitaksel (26-27dk). Üst üste siyah, mavi, mor pikler; Ham fındığın ince kabuklu meyvesinin 3 tekrarını göstermektedir.



Şekil 4.10: Paklitaksel'in tespit edildiği 7 farklı fındık çeşidinin 5 ayrı bölgesindeki $\mu\text{g/g}$ miktarlarının sütun grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde kalp hastalıklarından sonra ölüme neden olan hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kanser 2018 yılında gerçekleşen 9,6 milyon ölümün nedenidir ve dünya genelinde 2030'da kansere bağlı ölümlerin 13 milyonun üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir (WHO, 2019). Bu verilere göre kanser, yaşamı tehdit eden ve bir an önce tedavisinin bulunması gereken bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm vücuda olan etkisi ve şimdiye kadarki başarılı sonuçları ile kemoterapi tercih edilen bir tedavi uygulamasıdır. Geniş yelpazedeki kanser çeşitliliğine karşı etkisi kanıtlanmış, büyük öneme sahip kemoterapi ilacı olarak kullanılan taksol ve taksol analogu ilaçların üretimi önem kazanmaktadır. Başlangıçta bu ilaçların ham maddesi olan paklitaksel ve öncülleri porsuk ağacından temin edilmekteydi. Porsuk ağacı içinde bu aktif maddelerin sınırlı miktarı, bitkinin yavaş büyüme hızı ihtiyaç duyulan taksan türevi bileşiklerin sağlanmasında ticari olarak yetersizdir. Bileşiklerin üretimi için yapılan kimyasal sentez, endofit mantarların kullanımı ve *Taxus* hücre süspansiyon kültürlerinden biyoteknolojik üretim yöntemleri halen endüstrinin ihtiyaç duyduğu büyük ölçekli üretimden uzaktır. Ticari olarak büyük ölçekli üretimde tercih edilen yöntem *Taxus* türlerinin biyoteknolojik üretimidir (McElroy ve Jennewein, 2018). Porsuk ağacının yavaş kallus oluşturması, hücre kültürlerinden elde edilen taksol miktarının, Taxol®e olan artan ihtiyacı karşılamak için yeterli olmaması, hücre kültürü sürecinden kaynaklanan problemlerinin yaşanması sebepleri ile alternatif taksol kaynağı arayışı devam etmektedir (Gallego ve diğ., 2017).

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de yetişen fındıklarda taksan türevi bileşiklerin tespit edilmesi ve ayrıca ileride yapılabilecek biyoteknolojik yolla taksanların üretimi için aday çeşitlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk kez Türkiye’de yetişen 5 farklı fındık çeşidinin (Çakıldak, Kalıncara, Palaz, Sivri ve Tombul fındık) ve 2 farklı fındık genotipinin (Ham ve Sivri Yağlı fındık) 5 ayrı dokusunda (Çotanak, sert kabuk, ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve) taksan türevi bileşikler (10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III, sefalomanin ve paklitaksel) analiz edilmiş ve miktarları hesaplanmıştır. Her fındığa ait 5 ayrı doku materyali metanol ile ekstre edildi ve ekstrelerde HPLC analizi ile taksan türevi bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı.

Taksan türevlerinden 10 deasetilbakkatin III, bakkatin III ve sephalomanin, incelenen fındık çeşidi ve genotiplerin dokularında farklı miktarlarda tespit edildi. Paklitaksel ise fındıklar arasında sadece Ham, Palaz, Sivri ve Kalınkara fındıklarında belirlendi.

10 deasetilbakkatin III'ün analizi yapılan tüm fındıklarda, diğer tüm dokulara göre en fazla sert kabuklarda bulunduğu belirlendi. Sırasıyla, 10 deasetilbakkatin III'ü en fazla içeren fındıklar ve miktarları Ham (9,48 µg/g), Tombul (5,76 µg/g), Sivri (4,75 µg/g), Sivri Yağlı (4,26 µg/g), Kalınkara (2,72 µg/g), Çakıldak (2,26 µg/g) ve Palaz (2,12 µg/g) olarak bulundu.

Analizi yapılan tüm fındıklarda bakkatin III'ün diğer fındık dokularına kıyasla en fazla ince kabuk dokularında bulunduğu tespit edildi. Sırasıyla, bakkatin III'ün en fazla tespit edildiği fındıklar ve miktarları Tombul (10,44 µg/g), Kalınkara (7,53 µg/g), Ham (6,21 µg/g) ve Sivri Yağlı (4,65 µg/g) olarak belirlendi.

Tüm fındıkların ince kabuklu meyve ve ince kabuk dokularında sefalomanin miktarının birbirine yakın değerlerde diğer dokulara kıyasla daha fazla bulunduğu belirlendi. Sırasıyla, Sivri Yağlı fındığın ince kabuğunda (6,37 µg/g) ve ince kabuklu meyvesinde (5,34 µg/g), Sivri (5,14 µg/g) ve Palaz (4,74 µg/g) ince kabuklu meyvesinde ve Ham ince kabuk dokusunda (4,31 µg/g) olarak bulundu.

Dünyada kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan Taxol® ilacının ham maddesi olan Paklitaksel ise, bu tez çalışmasında ilk kez analizi yapılan 5 farklı fındık çeşidinin ve 2 genotipin çotanaklarında diğer dokulara kıyasla belirgin olarak fazla miktarda bulundu. Paklitakselin analiz edildiği fındıklar ve miktarları sırasıyla, Palaz (3,37 µg/g), Ham (1,98 µg/g) ve Kalınkara (1,80 µg/g) dır. Paklitaksel analizi için önemli diğer bir sonuç ise Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde (4,36 µg/g) tespit edilen paklitaksel miktarının diğer dokulara kıyasla fazla bulunması oldu.

Taksan bileşiklerinin en yüksek tespit edildiği fındık çeşit / genotipleri ve kısımları sırasıyla; **10 - deasetil bakkatin III**; Ham fındık-sert kabuk - 9,48 µg/g **> Bakkatin III**; Tombul fındık - ince kabuk 10,44 µg/g **> Sefalomanin**; Sivri Yağlı fındık-ince kabuk - 6,37 µg/g **> Paklitaksel**; Ham fındık-ince kabuklu meyve- 4,36 µg/g.

Bu sonuçlar, dünyada en yaygın kemoterapi ilacı olarak kullanılan Taxol® için fındığın (*Corylus avellana* L.) alternatif bir ham madde kaynağı olabileceğini göstermiştir.

10 deasetilbakkatin III'ün analizi yapılan tüm fındıklarda, diğer tüm dokulara göre en fazla **sert kabuklarda** bulunduğu belirlenmiştir. Fındıkların sert kabuklarındaki 10 deasetilbakkatin III miktarları; Ham (9,48 µg/g), Tombul (5,76 µg/g), Sivri (4,75 µg/g), Sivri Yağlı (4,26 µg/g), Kalıncara (2,72 µg/g), Çakıldak (2,26 µg/g) ve Palaz (2,12 µg/g) olarak bulunmuştur. Shahidi ve diğ. (2007) tarafından yürütülen TUBİTAK projesi kapsamında, Tombul fındığın yaprak, çotanak, sert kabuk, ince kabuk ve meyve dokularında taksan bileşiklerinin analizi yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi etanol ile gerçekleştirilmiştir ve HPLC sonuçları LC-MS ile doğrulanmıştır. Tombul fındığın çotanağında, meyvesinde ve fındık zarında her 2 çalışmada da 10 deasetilbakkatin III tayin edilememiştir. Tombul fındığın sert kabuğunda ise 0,95-0,75 µg/g aralığında 10 - deasetil bakkatin III tespit edilmiş olmasına rağmen tez çalışmasında bu miktar 5,77 µg/g olarak yaklaşık 6 kat yüksek miktarda bulunmuştur. Bu sonuç, Tombul fındığın sert kabuğunda bulunan 10 - deasetil bakkatin III'ün ekstraksiyonu için metanolün daha etkili olduğunu göstermiştir. 10 - deasetil bakkatin III'ün analizinin yapıldığı diğer bir çalışmada (Hoffman ve Shahidi, 2009), yine Tombul fındığın yaprak, çotanak, sert kabuk, ince kabuk ve meyve dokuları incelenmiştir. Tombul fındığın çotanağında 2 çalışmada da 10 - deasetil bakkatin III tayin edilememiştir. Sert Kabuğunda ise 22,52-3,53 µg/g aralığında tayin edilmiştir. Tez çalışmasında ise 5,766294 µg/g olarak tespit edilmiştir. Sonuçların farklı çıkmasının nedeni, 2 çalışmada da incelenen Tombul fındığın farklı bölgelerden hasadının yapılması olabilir. Ekstraksiyon işlemi için metanol kullanılan bir başka çalışmada (Ottaggio ve diğ., 2008), 3 farklı yükseklikten toplanan sert kabuk dokularında analiz yapılmıştır. 10 - deasetil bakkatin III miktarları 13.21 ± 6.61 ve 29.08 ± 42.89 (µg/g), tez çalışmasında ise $2,72 \pm 0,27$ - $9,48 \pm 1,4$ (µg/g) olarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasının sonuçları, Ottaggio grubunun sonuçlarına göre bir miktar düşük çıkmasına rağmen standart sapma miktarı daha küçüktür. Bu da tez çalışmasının sonuçlarının daha güvenilir olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni farklı fındıklara ait sert kabukların bir arada kullanılmasından ziyade belli bir fındık grubunda yapılan analizin daha homojen olması olarak düşünülebilir. 19 farklı bölge ve yükseklikten toplanan fındıkların metanol ekstraksiyondan sonra 10 - deasetil bakkatin III bileşiğinin analizi LC-MS/MS cihazı ile yapılan bir çalışmada ise sert kabuklarda 10 - deasetil bakkatin III rastlanmamıştır. Tez çalışmasında ise 9,48 µg/g (Ham fındık sert kabuğu) miktarında yaklaşık 9 kat yüksek bir değer tespit edilmiştir. Aynı sürelerde aynı ekstraksiyon çözücüsü kullanılmasına karşın bir önceki çalışmada olduğu gibi homojen bir fındık grubunda analiz

yapılmaması sonuçları etkilemiş olabilir. Çünkü sekonder metabolit üretimi pH, iklim, patojen gibi pek çok durumdan etkilenebilmektedir (Oguzkan ve diğ., 2018).

Taxus wallichiana var. *mairei*. türünde 10 - deasetil bakkatin III 190 ± 0.13 ($\mu\text{g/g}$) olarak analiz edilirken (Yang ve diğ., 2016), fındık analizinde ise en fazla Ham fındığın sert kabuğunda $9,48 \pm 1,48$ ($\mu\text{g/g}$) olarak analiz edilmiştir. *Taxus baccata*'dan endofitik mantarların izole edilmesiyle $65 \mu\text{g/g}$ 10 - deasetil bakkatin III'ün üretildiği saptanmıştır ve MCF-7 (meme kanseri) hücre hattında sitotoksiste göstermiştir (Sreekanth, 2009). Endofitik mantarlarda taksan bileşiği üretimi bazı soruları akla getirmektedir. Moleküler biyoloji, fitokimya ve genom diziliminin bir kombinasyonu kullanılarak yapılan bir çalışmada (Heinig ve diğ., 2013), *Taxus* türlerinde bulunan hiçbir endofitik mantarda taksan biyosentezi için kanıt bulunamamıştır. Endofitik mantarlardan taksan üretimi konusunda hala aydınlatılmamış noktalar bulunmaktadır (Gallego ve diğ., 2017). **Ham fındıkta** $9,48 \pm 1,48$ ($\mu\text{g/g}$) olarak tespit edilen paklitaksel miktarı, *Taxus* türleri ile karşılaştırıldığı zaman az miktarda olmasına rağmen biyoteknolojik gelişmeler ışığında bu miktarın arttırılabileceği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Kurulacak uygun hücre süspansiyon kültürleri ve yüksek verime sahip elisitör uygulamaları ile Ham fındığın potansiyel bir taksol kaynağına dönüşmesi mümkündür.

Bakkatin III' ün analizi yapılan tüm fındıklarda diğer fındık dokularına kıyasla en fazla ince kabuk dokusunda bulunduğu tespit edildi. Sırasıyla, bakkatin III'ün en fazla tespit edildiği fındıklar ve miktarları Tombul ($10,44 \mu\text{g/g}$), Kalınkara ($7,53 \mu\text{g/g}$), Ham ($6,21 \mu\text{g/g}$) ve Sivri Yağlı ($4,65 \mu\text{g/g}$) fındık olarak sıralanmaktadır. Shahidi ve diğ. (2007)'nin çalışmasında Tombul fındığının çotanağında $1,86 - 1,92 \mu\text{g/g}$ aralığında bakkatin III tespit edilirken sert kabuk, fındık zarı ve meyve dokularında rastlanmamıştır. Tez çalışmasında, Tombul fındığın çotanağında bakkatin III $0,35 \mu\text{g/g}$ olarak az miktarda bulunmasına rağmen sert kabuk ($1,01 \mu\text{g/g}$) ve meyve ($0,82 \mu\text{g/g}$) dokularında da bakkatin III'e rastlandı. Ayrıca ince kabuklu meyvede $3,22 \mu\text{g/g}$ miktarı kadar bakkatin III tespit edilmiştir. Fındık dokuları arasında ortaya çıkan bu farklılıkların çeşitli sebepleri olabilir. Çalışmalarda kullanılan fındık materyalinin yetiştirme koşulları, ekstraksiyon işlemi sırasında tercih edilen çözücü farklılıkları, ekstraksiyon süreleri farklı sonuçların elde edilmesinde etkili durumlardır. Hoffman ve Shahidi (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada, Tombul fındığın çotanağında $67,77 - 1,10 \mu\text{g/g}$ tez çalışmasında ise $0,35 \mu\text{g/g}$ olarak bakkatin III tespit edilmiştir. Aradaki fark çok büyüktür, bunun nedeni Tombul fındığın çotanağında bulunan bakkatin III bileşiğinin ekstraksiyonu için

metanol yerine etanolün daha etkili olduğu olabilir. Hoffman ve grubu, Tombul fıncının sert kabuğunda ise bakkatin III tespit edememişken $1,016238 \mu\text{g/g}$ miktarında tez çalışmasında rastlanmıştır. Ottaggio ve diğ. (2008) çalışmasında 3 farklı yükseklikten toplanan sert kabuklarda bakkatin III $108.43 \pm 9.80 (\mu\text{g/g})$ ve $10.40 \pm 8.77 (\mu\text{g/g})$ aralığında tespit edilmiş olmasına karşın tez çalışmasında en yüksek $2,46 \pm 0,83 \mu\text{g/g}$ miktarında bulunmuştur. Ottaggio grubunun sonuçları arasındaki farkın farklı fındık grubunun sert kabuklarında da analiz yapılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda standart sapma oranlarının yüksek olması ham ürün olan fındık bitkisinin doğal gereği olarak görülmektedir. Fındık bitkisinin sekonder metabolit olarak üretmiş olduğu taksan türevi bileşikler hasat zamanına, coğrafi koşullara ve iklime göre değişiklik gösterebilmektedir bu durum standart sapmanın yükselmesine sebep olabilmektedir. Farklı bölgelerden toplanan başka bir sert kabuk çalışmasında (Oğuzkan ve diğ.,2018) ise durum tam tersidir. Sert kabuklarda $0,164 - 1,020 \mu\text{g/g}$ aralığında bakkatin III tespit edilirken tez çalışmasında $2,46 \mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur. Her üç çalışmada da ekstraksiyon işlemi için metanol kullanılmıştır. Ortaya çıkan bu farklılıkların nedeni fındıkların yetiştiği yüksekliğin, iklimin farklı olması, toprak yapısı, ilaçlandırılma durumu olabilir. *Taxus baccata*'da analiz edilen bakkatin III miktarı $0,4 \pm 0.0 (\text{mg/L})$ olarak bulunmuştur. Hücre süspansiyon kültüründe metil jasmonate elisitörünün kullanılması bakkatin III miktarını $53.6 \pm 2.2 (\text{mg/L})$ olarak yükseltmiştir (Yukimune ve diğ., 1996). Fındıklarda bakkatin III bileşiğinin miktarı en fazla Tombul fıncının ince kabuk dokusunda $0,63 \pm 0,06 (\text{mg/L})$ olarak tespit edilmiştir. Bu örnekte, *Taxus baccata* 'nın doğal formundaki bakkatin III miktarı Tombul fıncınınkinden daha düşüktür. Gallego ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, $22,7 \mu\text{g/L}$ bakkatin III içeren fındık meyvesinin hücre süspansiyon kültürü kurulmuştur ve coronatine elisitör iyileştirmesi ile bakkatin III miktarı $609,3 \mu\text{g/L}$ ' ye yükselmiştir. Elde edilen sonuçlar, hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması ve uygun elisitör uygulaması ile paklitaksel öncüsü olan bakkatin III üretimi için **Tombul fıncının** alternatif bir kaynak olabileceğini göstermiştir.

Sefalomanin miktarının, tüm fındıkların ince kabuklu meyve ve ince kabuk dokularında birbirine yakın miktarda ve diğer dokulara kıyasla daha fazla bulunduğu belirlendi. Sırasıyla, Sefalomanin en fazla Sivri Yağlı fıncının ince kabuğunda ($6,37 \mu\text{g/g}$) ve ince kabuklu meyvesinde ($5,34 \mu\text{g/g}$), Sivri ($5,14 \mu\text{g/g}$), Palaz ($4,74 \mu\text{g/g}$) ince kabuklu meyvesi ve Ham ince kabuk dokusunda ($4,31 \mu\text{g/g}$) tespit edilmiştir. Shahidi ve diğ. (2007) çalışmasında Tombul fıncının sadece sert kabuk dokusunda sefalomanin tespit edebilmişken, tez çalışmasında ise

findık zarı dışında diğer dokularda bulunmuştur (çotanak- 0,14 µg/g), (meyve-0,50 µg/g), (ince kabuklu meyve-1,16 µg/g). Sert kabukta ise sefalomanin değeri 1,40-2,06 µg/g aralığında iken tez çalışmasında 0,06 µg/g olarak tespit edilmiştir. Hoffman ve Shahidi (2009) çalıştıkları Tombul findığının çotanak, sert kabuk, ince kabuk ve meyve dokuları arasında sadece sert kabuklarda 43,80-8,36 µg/g aralığında sefalomanin bulmuşlardır. Tez çalışmasında bu değer 0,06 µg/g olarak saplanmıştır. Sefalomanin bileşiğinin yapısı etanol çözücüsünde daha iyi çözülebilmesi böyle bir sonucun nedeni olabilir. Ayrıca Hoffman grubu 3 tekrarlı bir çalışma yapmadığı için standart sapma değerinin hangi aralıkta olduğu bilinmemektedir ve bu da güvenilirliği düşürmektedir. Yapılan çalışmalarda dikkat çeken bir konu, fındıkların diğer dokularında Sefalomanin bulunmazken sert kabuk dokularında rastlanmıştır. Tez çalışmasında ise sefalomanin miktarı en fazla ince kabuklu meyve ve ince kabuk dokularında tespit edilmiştir. Ottaggio ve diğ. (2008) çalışmasında sefalomanin 10-deasetil-7-epipaklitaksel ile birlikte tespit edilebilmiştir. Bu nedenden dolayı tez çalışması ile elde edilen sefalomanin sonuçları ile sağlıklı bir şekilde karşılaştırma yapılamamaktadır. Oguzkan ve diğ (2018) tarafından yürütülen çalışmada ise 19 farklı bölgeden toplanan sert kabuk ve çotanakların içerdiği sefalomanin varlığı tespit edilememiştir. Tez çalışmasında sert kabuk ve çotanakta sırayla 1,05 µg/g ve 1,04 µg/g oranında bulunmuştur. *Taxus* türlerinde sefalomanin miktarının incelendiği bir çalışmada (Yukimune ve diğ., 1996). *T.media*, *T.baccata* ve *T.brevifolia*, türlerinin başlangıç Sefalomanin miktarı HPLC analizi ile tespit edilmiştir. Her birinin ayrı ayrı hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur ve metil jasmonate elisitörü ile yapılan iyileştirme sonucunda sefalomanin miktarının arttığı gözlenmiştir. Başlangıç miktarı ve elisitör iyileştirmesinden sonra elde edilen miktarlar sırasıyla; *T.media* 5,3 ± 0,2 (mg/L); 9,8 ± 0,6 (mg/L); *T.baccata* 7,3 ± 0,5 (mg/L); 3,6 ± 0,1 (mg/L); *T.brevifolia*; 0,1 ± 0,0 (mg/L); 0,7 ± 0,1 (mg/L) olmaktadır. Bu sonuçlar tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığı zaman Sivri Yağlı 17,8 ± 0,68 (mg/L) ve Sivri 17,14 ± 0,53 (mg/L) fındıklarının içerdiği sefalomanin miktarları *T.media*, *T.baccata* ve *T.brevifolia*'nın içerdiği miktarlardan çok yüksek olduğu görülmektedir. **Sivri Yağlı ve Sivri fındıklara** uygulanacak biyoteknolojik yöntemler içerdikleri sefalomanin miktarlarını artmasını sağlayacak ve taksol üretimi için gerekli öncü bileşik kaynağını da ilaç endüstrisine kazandırmış olacaktır.

Dünyada kanser tedavisi için yaygın olarak kullanılan Taxol® ilacının ham maddesi olan **Paklitaksel** ise, bu tez çalışmasında ilk kez analizi yapılan 5 farklı fındık çeşidinin ve 2 genotipin çotanak dokularında diğer dokulara kıyasla belirgin olarak fazla miktarda bulundu.

Paklitakselin analiz edildiği fındıklar ve miktarları sırasıyla, Palaz (3,37 µg/g), Ham (1,98 µg/g) ve Kalınkara (1,80 µg/g) dır. Paklitaksel analizi için önemli diğer bir sonuç ise Ham fındığın ince kabuklu meyvesinde (4,36 µg/g) tespit edilen paklitaksel miktarının diğer dokulara kıyasla fazla bulunması olmaktadır. Tombul fındığın çotanak, sert kabuk, ince kabuk ve meyve dokularının incelendiği bir çalışmada (Shahidi ve diğ., 2004) ekstraksiyon işlemi etanol ile gerçekleştirilmişir ve HPLC verileri LC-MS ile doğrulanmıştır. Her 2 çalışmada da Tombul fındığın çotanağında paklitaksel tayin edilememiştir. Sert kabuk dokusunda 0,08-0,07 µg/g arasında paklitaksel tayin edilmiş olmasına karşın tez çalışmasında tayin edilememiştir. Meyve dokusunda ise Shahidi grubu Paklitaksel tespit edememişken tez çalışmasında 0,072328 µg/g olarak tespit edilmiştir. Bu miktar düşük olmasına rağmen Paklitakselin varlığını gösterdiği için önemli bir sonuçtur. Ayrıca tez çalışmasında ince kabuklu meyve dokusunda 0,603243 µg/g miktarında paklitaksel tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada (Hoffman ve Shahidi,2009), Tombul fındığın çotanak dokusunda her 2 çalışmada da paklitaksel tespit edilememiştir. Sert kabuk dokusunda ise 1,90-0,13 µg/g aralığında paklitaksel tespit edilmiş olmasına rağmen tez çalışmasında tespit edilememiştir. Ancak Hoffman grubu meyve dokusunda paklitaksele rastlamamasına rağmen tez çalışmasında 0,07 µg/g bununla birlikte ince kabuklu meyvede de 0,60 µg/g olarak tespit edilmiştir. Paklitakselin fındığın en çok tüketilen meyve dokusunda varlığı saptanmıştır. Ottaggio ve diğ. (2008) çalışmasında 3 farklı yükseklikten hasat edilen fındıkların sert kabuklarında paklitaksel analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre; Paklitaksel miktarı 1.75 ± 1.01 (µg/g) ve 10.83 ± 2.43 (µg/g) aralığında tespit edilmiştir. Tez çalışmasında ise $3,37 \pm 0,20$ (µg/g) miktarı ile Palaz fındık öne çıkmaktadır ve Ham fındık $1,98 \pm 0,11$ (µg/g) değeri ile Palaz fındıktan sonra gelmektedir. 19 bölgeden hasat edilen fındıkların sert kabuk ve çotanak dokularında yapılan paklitaksel analiz çalışmasında (Oğuzkan ve diğ., 2018), sert kabuk ve çotanak dokularında paklitaksele rastlanmamışken tez çalışmasında sert kabukta 0,03 µg/g ve çotanakta ise 3,37 µg/g miktarı ile Palaz fındık öne çıkmaktadır. Yukimune ve diğ. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada *Taxus media*, *Taxus baccata* ve *Taxus brevifolia* türlerinin içerdiği paklitaksel miktarları analiz edilmiştir ve daha sonra hücre süspansiyon kültürleri kurularak metil jasmonat elisitör uygulaması ile paklitaksel bileşiğinde meydana gelen değişim analiz edilmiştir. *Taxus* türlerinin elisitör uygulamasında önce ve sonra içerdikleri paklitaksel miktarı sırasıyla; *Taxus media* **2,8** ± 2,4 (mg/L); **110,3** ± 4,9 (mg/L), *Taxus baccata* **0,4** ± 0,0 (mg/L); **48,3** ± 2,5 (mg/L) ve *Taxus brevifolia* **0,2** ±0,0 (mg/L); **0,5** ±0,1 (mg/L) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmasındaki fındıkların içerdiği

paklitaksel içeriği ile karşılaştırıldığı zaman **Ham** $14,54 \pm 0,54$ (mg/L) ve **Palaz** $11,23 \pm 0,67$ (mg/L) fındıklar dikkat çekmektedir. Bu fındıkların içerdiği paklitaksel miktarı *Taxus* türlerinin elisitör uygulamasından önceki miktarlarından fazladır. Taxol® ilacının ham maddesi olan ve dünyada yeni bir gen kaynağı bulmak için arayışların yapıldığı şu günlerde bu kadar değerli kaynağın Türkiye’de yetişen fındıklarda bulunması çok önemli bir sonuçtur. Doğadan elde edilen ham formunda bu miktarda paklitaksel içeriğine sahip fındıklara, geliştirilmiş biyoteknolojik yöntemlerin iyileştirme uygulamaları ile ilaç endüstrisinin aradığı kaynağın sunulmasını sağlayacaktır.

Görüldüğü gibi literatürde, fındık çeşitlerinin içerdikleri taksan türevleri ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu tez çalışmasında taksan türevlerinin farklı fındık çeşit ve genotiplerinde incelenmesinin yanı sıra farklı dokularının da kullanılmış olması bu dokulara ait taksan verilerinin tamamen yeni olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle aşağıda verilen karşılaştırmalar tezde çalışılan fındıklar ile taksan türevlerinin analiz edildiği dokular ile sınırlıdır.

Paklitaksel yarı sentezine yardım eden 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomanin prekürsörlerini içeren fındıkların tespit edilmesi biyoteknolojik üretim açısından önemlidir. Paklitakselin biyosentetik yolağında 10 - deasetil bakkatin III’den bakkatin III sentezlenebilmektedir, bakkatin III’e yan zincir eklenmesi ile paklitaksel sentezi yapılabilmektedir. Tez sonuçlarına göre başta Ham fındık olmak üzere Tombul fındık, Sivri fındık, Sivri yağlı fındık başlıca 10 - deasetil bakkatin III miktarları ile öne çıkan fındıklardır ve paklitakselin yarı sentezi için önemli bir kaynak sağlamaktadır. 10 - deasetil bakkatin III’ten bakkatin III sentezlenebilmesinin yanında, kendinde doğal olarak bakkatin III’ü bulunduran fındıkların tespit edilmesi hem bu yarı sentez zamanını kısaltacak hem de daha ekonomik bir yol sağlamış olacaktır. Bakkatin III’ü bulunduran başta Tombul fındık olmak üzere Kalınkara, Ham, Palaz ,Sivri, Sivri Yağlı fındıktan paklitaksel sentezi yapılabilmektedir. Ayrıca daha az bakkatin III bulunduran Çakıldak fındığın hücre süspansiyon kültür çalışmaları yapılarak farklı elisitörler ile bulundurdıkları bakkatin III miktarları artırılarak paklitaksel sentezi için kullanılabilirler. Paklitaksel’in öncülerinden biri olan seflomanin yaklaşık eşit miktarlarda Sivri Yağlı, Sivri ve Palaz fındıkların meyvelerinde tespit edildi. Paklitaksel’in öncüsü olan 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve safalomanin’nin bulunmasına ek olarak paklitakseli doğrudan bulunduran fındıklarda tespit edildi. Ham fındık ve Palaz fındık bulundurdıkları

paklitaksel miktarı ile öne çıkan fındıklardır. Ham fındık henüz standart fındık olarak tescillenmemiştir ve fındık genotipi olarak kayıtlarda geçmektedir. Paklitakseli yüksek bir miktarda içermesi yanında 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomanin bileşiklerinin de içermesi Ham fındığı değerli kılmaktadır. Daha düşük miktarda paklitakseli içeren Kalıncara, Sivri, Tombul ve Sivri Yağlı fındıkların kültürü alınarak gerekli elisitör maddeleri ile içerdikleri paklitakselin miktarları arttırılabilir. Bu çalışma bize doğrudan paklitaksel maddesine ulaşma imkânı sağlayacaktır. Diğer bir fındık genotipi olan Sivri Yağlı fındık, içerdığı 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sefalomanin miktarı bakımında değer kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında önemli olan bir diğer sonuç ise fındık meyve ve ince kabuklu meyvelerinde tespit edilen taksan türevleri ve miktarlarıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, insanlar tarafından en çok tüketilen ince kabuklu meyve dokusu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır, ayrıca meyve dokusunda yapılan taksan türevi bileşiklerin analiz sonuçlarına göre taksan türevi bileşiklere rastlanmamıştır. Bu tezin HPLC sonuçlarına göre, fındıkların meyvelerinde 10 - deasetil bakkatin III hariç bakkatin III ve sefalomanin her bir çeşitte farklı miktarlarda tespit edilmiştir. Paklitaksel ise Ham, Palaz ve Sivri fındık meyveleri haricinde diğer fındık meyvelerinde rastlanmıştır. Ayrıca ince kabuklu meyve kısımları bulundukları yüksek miktarda taksan türevleri ile dikkat çekmektedir. Özellikle Palaz fındıkta bakkatin III en fazla ince kabuklu meyvede bulunmakta ve sefalomanin Sivri Yağlı fındığın ince kabuklu meyvesinde bulunmasının yanı sıra ince kabuklu meyve farklı miktarlarda 10 - deasetil bakkatin III ve paklitakselde içermektedir. İnce kabuklu meyve de özellikle her fındık çeşidinde farklı miktarlarda da olsa mutlaka sefalomanin tespit edilmiştir. Bakkatin III ve Sefalomanin bulundurma açısından meyve kısımları önemlidir. HPLC sonuçları fındığın yenilen kısmında da taksan türevlerinin bulunduğunu özellikle ham fındığın ince kabuklu meyvesinde yüksek miktarda paklitakselin bulunduğunu göstermiştir. Böylece kanser tedavisinde kanser hücrelerinin mikrotübüllerinin stabilizasyonu için kullanılan paklitakseli diyet ile almak doğal bir alternatif sunmaktadır. Belki de paklitaksel bileşiğini içeren Ham, Palaz, Kalıncara, Sivri ve Tombul fındıklarının meyvesinin düzenli, belirli bir miktar tüketilmesi vücut hücrelerinin düzensiz çoğalmasını engelleyebilir. Tez sonuçları, bu konu üzerinde yapılacak çalışmalara ışık tutabilir. Böyle bir çalışma kanser hastalıklarının arttığı ve tedavi edici doğal hammaddenin değerli olduğu şu günlerde büyük katkı sağlayacaktır.

Meyve ve ince kabuklu meyve çalışmalarının yanında, fındıkların ince kabukları da ayrıca incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda ince kabuklarda 10 - deasetil bakkatin III ve paklitaksel tespit edilememiş olsa da bakkatin III ve sephalomanin tespit edilmiştir. Analiz için kullanılan ince kabuk miktarlarının çok az (0,12 gram) olmasından dolayı gerekli hassas ortam kurulamamış olabilir. İnce kabuk miktarının daha fazla olduğu bir çalışmada taksan bileşiklerinin analiz sonuçları daha kolay tespit edilebilecektir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda fındığın ince kabuğunda taksan türevi bileşiklerine rastlanmadığından bu tez çalışmasında bakkatin III ve sefalomanin fındıkların ince kabuklarında tespit edilmiş olması, literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. İnce kabuk dokusunda en fazla Bakkatin III içeriğine sahip olan fındıklar sırasıyla; Tombul (10,44 µg/g), Kalınkara (7,53 µg/g), Ham (6,21 µg/g), Sivri Yağlı (4,65 µg/g), Palaz (5,78 µg/g) ve Sivri (2,35 µg/g) fındıklardır. Yüksek Sefalomanin içeriğine sahip fındıklar ise Sivri Yağlı (6,37 µg/g) ve Ham (4,31 µg/g) fındık olarak sıralanmaktadır.

Yine tez çalışmasından ortaya çıkan önemli bir bulgu da fındıkların tümünün meyve ve ince kabuk dokularında taksan türevi bileşikler bulunmasa da; meyve ve ince kabuğun birlikte bulunduğu ince kabuklu meyve dokularında taksan türevi bileşiklerin tespit edilmesidir. Bu durum özellikle 10 - deasetil bakkatin III ve paklitakselde ortaya çıkmaktadır. Ekstraksiyon için yapılan fındık hazırlığı sırasında bir grup meyvenin ince kabuğu soyularak, ayıklanmış ve ince kabuksuz kalan meyve dokusu da ayrıca ayrılmıştır. Grubun içindeki diğer fındıklar ise ince kabuğu ile ayrıldığı için bu gruplandırma homojen olmayabilir. İnce kabuk ve meyve dokuları aynı fındığa aitken diğer ince kabuklu meyve dokusu farklı bir fındıktır. Bu sonucun homojen ayırım yapılamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dokularda bulunan taksan bileşikleri kıyaslandığı zaman; fındıkların sert kabuk dokularında paklitaksel miktarı çok az olmasına rağmen 10 - deasetil bakkatin III, bakkatin III ve sephalomanin bileşikleri farkedilir bir miktarda fazla olarak bulunmuştur. Paklitaksel, numune alma işlemi sırasında bozulmuş olabileceği gibi, tespit edilemeyecek kadar düşük miktarda da bulundurulması neticesinde tespit edilememiş olabilir.

Çotanak dokularında ise paklitaksel miktarı açısından Palaz fındığın çotanağı ortalamanın üstünde bir değere sahiptir. Ham ve Kalınkara fındıklarının çotanakları ise bu değere yakındır. 10 - deasetil bakkatin III açısından Palaz ve Sivri Yağlı fındıkların çotanakları önem

kazanmaktadır. Çakıldak ve Tombul fındığın çotanağı bakkatin III bunundurmaktadır. Tombul ve Sivri Yağlı fındığın çotanaklarında ise sefalomanine rastlanmıştır.

Bu tezdeki bulgular daha önce yapılan çalışmalar ile kıyaslandığı zaman; ince kabuk, ince kabuklu meyve ve meyve dokularında taksan bileşiklerinin tespit edilmesi ile fark oluşturmaktadır.

Fındıkların sert kabuğunda ve çotanağında taksan türevlerinin tespit edilmesi önemlidir. Çünkü Türkiye’de yıllık 200 bin tona yakın sert kabuk ve çotanak atığı çıkmaktadır (Gürdil ve diğ., 2016; Oğuzkan ve diğ., 2017). Antikanser özelliği gösteren maddeleri içeren bu dokular telef olacağına toplanıp ilaç endüstrisi için ayrılabilir. Türkiye’nin milli ilaç üretim hedefi doğrultusunda bu atık maddeler değerlendirilerek kemoterapi ilacı olan taksol analogu ilaçlar üretilebilir.

Türkiye’de yetişen fındık çeşitlerinden elde ettiğimiz sonuçlar ile porsuk ağacından elde edilen taksan sonuçları kıyaslandığı zaman, fındık çeşitlerinin porsuk ağacına göre daha az miktarda taksol ve diğer taksan türevlerini içerdiğini görmekteyiz. Ancak, biyoteknolojik yaklaşımlarla fındık üzerinde yapılan kültür çalışmalarında kullanılan elisitör teknikleri ile içerdikleri taksan türevi bileşiklerin miktarının 27 kat arttırabildiği yapılan çalışmalarda görülmektedir (Gallego ve diğ., 2015). Hücre kültürlerinde sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik ortam koşullarının değiştirilmesi, genetik uygulamalar ve metabolit mühendisliği yolu ile *Corylus avellana L.*’nin içerdiği taksan türevi bileşiklerin arttırılabileceği söylenebilir. Türkiye’de yetiştirilen fındık çeşitlerinde taksan türevi maddelerin tespit edilmesi, fındık gen kaynaklarımızın kullanılarak yapılacak biyoteknolojik çalışmalara alt yapı oluşturan bir konu olarak önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aksoy, E.S., 2017, Fındık kabuğunda paklitaksel saflaştırılması, Yüksek lisans, Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Balık, H., Balık Kayalak, S., Beyhan, N. & Erdoğan, V., 2016, Fındık Çeşitleri, *Trabzon Ticaret Borsası*, Klasmat Matbaacılık.
- Banarlı, N. S., 1971, *Resimli türk edebiyatı tarihi*, Milli Eğitim Bakanlığı.
- Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. & Miele, M., 2006, In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *Biomedical center biotechnology*, 6, 45.
- Carlina Technologies, 2019, Kaynak: <https://carlinatech.com/soludots-paclitaxel>, [Ziyaret Tarihi: 18.06.2019].
- Celgene, 2019, Kaynak: <https://ir.celgene.com/press-releases/press-release-details/2019/Celgene-Reports-Fourth-Quarter-and-Full-Year-2018-Operating-and-Financial-Results/default.aspx>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Colin, M., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F. & Potier, P., 1990, Process for preparing derivatives of baccatine III and of 10-deacetyl baccatine III, Google Patents.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G., 2000, Natural products (secondary metabolites), *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- De Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J.-P., Kocak, I., Gravis, G., Bodrogi, I., Mackenzie, M. J. & Shen, L., 2010, Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial, *The Lancet*, 376, 1147-1154.
- Duman, M., 2010, *Fındık serdim harmana: Türk fındığının öyküsü*, Yapı Kredi Yayınları (YKY).
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35, 495-516.
- FAO, 2019, Kaynak: <http://www.fao.org/3/x4484e/x4484e03.htm>, [Ziyaret Tarihi:18.05.2019]
- Faydaoğlu, E. & Sürücüoğlu, M. S., 2011, Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11, 52-67.

- FDA, 2019a, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020262s049lbl.pdf taxol, [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, 2010, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/201023lbl.pdf cabazitaxel, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- FDA, 2009, Kaynak: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021660s022lbl.pdf abraxine, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- FDA, 2019b, Kaynak: <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/cancer-drugs>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Florea, A.-M. & Büsselberg, D., 2011, Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, *Cancers*, 3, 1351-1371.
- Flores-Cotera, L., 2010, Microbial paclitaxel: advances and perspectives, *The Journal of antibiotics*, 63, 460-467 Fotouhifar.
- Forbes, 2019, Kaynak: <https://www.forbes.com/forbes/2001/0528/214.html#3fcd69872ae9>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Gallego, A., Imseng, N., Bonfill, M., Cusido, R. M., Palazon, J., Eibl, R. & Moyano, E., 2015, Development of a hazel cell culture-based paclitaxel and baccatin III production process on a benchtop scale, *Journal of biotechnology*, 195, 93-102.
- 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 anti-cancer drug, *Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)*, 129, 1-16.
- Galsky, M. D., Dritselis, A., Kirkpatrick, P. & OH, W. K., 2010, Cabazitaxel, *Nature publishing group*.
- Głowniak, K. & Mroczek, T., 1999, Investigations on preparative thin-layer chromatographic separation of taxoids from *Taxus baccata* L, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 22, 2483-2502.
- Georgiev, M. I., Weber, J. & Maciuk, A., 2009, Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds, *Applied microbiology and biotechnology*, 83, 809-823.
- Green, M., Manikhas, G., Orlov, S., Afanasyev, B., Makhson, A., Bhar, P. & Hawkins, M., 2006, Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer, *Annals of oncology*, 17, 1263-1268.
- Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F. & Potier, P., 1993, Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships, *Accounts of chemical research*, 26, 160-167.

- Gümrük, T.C. & Müdürlüğü, 2016, Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2016 Yılı Fındık Raporu.
- Gümrük, T.C. & Müdürlüğü, 2017, Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2017 Yılı Fındık Raporu.
- Gürdil, G., Baz, Y., Dok, M., Acar, M. & Demirel, Ç., 2016, Fındık zurufundan üretilen yakıt peletinin ısısal parametreleri, 2. *Ulusal Biyo-yakıtlar Sempozyumu*, 27-30.
- Heinig, U., Scholz, S. & Jennewein, S., 2013, Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi, *Fungal diversity*, 60, 161-170.
- Hoffman, A., 1998, Bioprospecting for taxol in angiosperm plant extracts-using high performance liquid chromatography thermospray mass spectroscopy to detect the anticancer agent and its related metabolites in Filbert trees, *Spectroscopy*, 13, 22-32.
- Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Liang, F., Biediger, R. J., Boatman, P. D., Shindo, M., Smith, C. C. & Kim, S., 1994, First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring, *Journal of the American chemical society*, 116, 1597-1598.
- Hulme, P. E., 1996, Natural regeneration of yew (*Taxus baccata* L.): microsite, seed or herbivore limitation, *Journal of Ecology*, 853-861.
- Junqueira, L. C. U. & Carneiro, J., 2005, *Basic histology: Text & Atlas*, McGraw-Hill Professional, ISBN 978-0071440912. USA, 502.
- Kharwar, R. N., Mishra, A., Gond, S. K., Stierle, A. & Stierle, D., 2011, Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges, *Natural product reports*, 28, 1208-1228.
- Kingston, D., Jagtap, P., Yuan, H. & Samala, L., 2002, The chemistry of taxol and related taxoids, *Progress in the chemistry of organic natural products/fortschritte der chemie organischer Naturstoffe*, Springer, 53-225.
- Kingston, D. G., 1994, Taxol: the chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent, *Trends in biotechnology*, 12, 222-227.
- Kingston, D. G. & Molinero, A. A., 1994, Method for the conversion of cephalomannine to taxol and for the preparation of N-acyl analogs of taxol, Google Patents.
- Köksal, İ., 2002, Türk fındık çeşitleri, *Fındık tanıtım Grubu Yayınları*, Ankara, 136.
- Krenzelok, E. P., Jacobsen, T. & Aronis, J., 1998, Is the yew really poisonous to you?, *Journal of toxicology: Clinical toxicology*, 36, 219-223.
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C., 2014, Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology, *Trends in biotechnology*, 32, 304-311.

- Kütük, B., 2016, Kemoterapi uygulanan kanserli hastalarda özbakımın değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Lythgoe, B., Uyeo, S. & Nakanishi, K., 1964, Taxane, *Proceedings of the chemical society of London*, 301.
- Mcelroy, A., 2018, *Medical anthropology in ecological perspective*, Routledge.
- Mcelroy, C. & Jennewein, S., 2018, Taxol® biosynthesis and production: from forests to fermenters, *Biotechnology of Natural Products*. Springer.
- Mcgrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & Mccann, A., 2008, Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on cancer*, 1785, 96-132.
- Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S., 2009, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer, *International journal of nanomedicine*, 4, 99.
- Miele, M., Armirotti, A., Balbi, A., Bestoso, F., Damonte, G. & Mazzei, M., 2007, Method for the production of taxol and/or taxanes from cultures of hazel cells, Google Patents.
- Naik, P. M. & Al-Khayri, J. M., 2016, Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants, *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*, 247-277.
- Nakada, M., 2019, Enantioselective total synthesis of the antitumor polycyclic natural products FR182877 and taxol, *Cutting-edge organic synthesis and chemical biology of bioactive molecules*, Springer.
- Nicolaou, K. C., Dai, W. M. & Guy, R. K., 1994, Chemistry and biology of taxol, *Angewandte chemie international edition in english*, 33, 15-44.
- Oguzkan, S. B., Karagul, B., Aksoy, E. S., Uzun, A., Can, M., Yilmaz, H., Ugras, H. I., Binici, B. & Goren, A. C., 2018, Determination of taxanes by validated LC-MS/MS method in hazelnut collected from different regions and altitudes in Turkey, *Journal of chemical metrology*, 12, 26.
- Ojima, I., Lichtenthal, B., Lee, S., Wang, C. & Wang, X., 2016, Taxane anticancer agents: a patent perspective, *Expert opinion on therapeutic patents*, 26, 1-20.
- Ongan, O., 2019, Kaynak: <http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yukse-performans-sivi.html>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Ottaggio, L., Bestoso, F., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Mazzei, M., Sancandi, M. & Miele, M., 2007, Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*, *Journal of natural products*, 71, 58-60.

- Özdemir, A., 2015, Kromatografi Nedir? HPLC, Kaynak: <https://docplayer.biz.tr/335653-Kromatografi-nedir-hplc.html>, [Ziyaret Tarihi: 10.07.2019].
- Phyton Biotech, 2019, Kaynak: <https://phytonbiotech.com/about-pcf/>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Polat, S. Türk Fındığı (*Corylus Colurna*)'nin Türkiye'deki Yeni Bir Yayılış Alanı, *Marmara Coğrafya Dergisi*.
- QI, Z., 2013, WHO Traditional Medicine Strategy. 2014-2023, *Geneva: World Health Organization*.
- Qiao, Z. & Kondo, T., 2018, Identification of cephalomannine as a drug candidate for glioblastoma via high-throughput drug screening, *Journal of Electrophoresis*, 62, 17-20.
- Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M. & Mokhtari-Dizaji, M., 2011, Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture, *Ultrasound in medicine & biology*, 37, 1938-1947.
- Ringel, I. & Horwitz, S. B., 1991, Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83, 288-291.
- Roberts, S. C., 2007, Production and engineering of terpenoids in plant cell culture, *Nature chemical biology*, 3, 387.
- Sanofi, 2019, Kaynak: <https://www.sanofi.com/en/investors/reports-and-publications/financial-and-csr-reports>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2019].
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A. & Mirjalili, M. H., 2019, Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137, 319-328.
- Schiff, P. B., Fant, J. & Horwitz, S. B., 1979, Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol, *Nature*, 277, 665.
- Shahidi, F. & Alasalvar, C., 2004, Fındık ve Fındık Yan Ürünlerinde Fitokimyasal Maddeler ve Biyoaktif Bilesikler, <http://www.ftg.org.tr>, [Ziyaret Tarihi: 03.08.2018].
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W., 2011, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons.
- Sreekanth, D., Syed, A., Sarkar, S., Sarkar, D., Santhakumari, B., Ahmad, A. & Khan, M., 2009, Production, purification and characterization of taxol and 10DAB III from a new endophytic fungus *Gliocladium* sp. isolated from the Indian yew tree, *Taxus baccata*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 1342-1347.

- Staniek, A., Woerdenbag, H. J. & Kayser, O., 2009, *Taxomyces andreanae*: a presumed paclitaxel producer demystified, *Planta medica*, 75, 1561-1566.
- Stierle, A., Strobel, G. & Stierle, D., 1993, Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew, *Science*, 260, 214-216.
- Strobel, G. & Daisy, B., 2003, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 491-502.
- Suryanarayanan, T., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M., Sasse, F., Jansen, R. & Murali, T., 2009, Fungal endophytes and bioprospecting, *Fungal biology reviews*, 23, 9-19.
- Trmcic, M. V., Matovic, R. V., Tovilovic, G. I., Ristic, B. Z., Trajkovic, V. S., Ferjancic, Z. B. & Saicic, R. N., 2012, A novel C, D-spirolactone analogue of paclitaxel: autophagy instead of apoptosis as a previously unknown mechanism of cytotoxic action for taxoids, *Organic & biomolecular chemistry*, 10, 4933-4942.
- TTSM, 2019, Kaynak: <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/TTSM/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId>, [Ziyaret Tarihi: 6.06.2019].
- TUIK, 2018, Kaynak: <https://www.tuik.gov.tr>, [Ziyaret Tarihi: 18.06.2019].
- Van Rozendaal, E. L., Lelyveld, G. P. & Van Beek, T. A., 2000, Screening of the needles of different yew varieties and cultivars for paclitaxel and related taxoids, *Phytochemistry*, 53, 383-389.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N., 2003, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell proliferation*, 36, 131-149.
- Walsh, V. & Le Roux, M., 2004, Contingency in Innovation and the Role of National Systems: Taxol and Taxotère in the USA and France, *Research Policy*, 33, 1307-1327.
- Wang, S., Wang, H., Li, T., Li, C., Zhou, Y. & Zhong, X., 2018, The selection and stability analysis of stable and high Taxol-producing cell lines from *Taxus cuspidata*, *Journal of forestry research*, 29, 65-71.
- Wang, Y.-F., Shi, Q.-W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.-C. & Cong, B., 2011, Natural taxanes: developments since 1828, *Chemical reviews*, 111, 7652-7709.
- Wang, Y., Guo, B., Zhang, F., Yao, H., Miao, Z. & Tang, K., 2007, Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from hazel (*Corylus avellana* L. Gasaway), *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports*, 40(6), pp. 861-869. doi: 10.5483/bmbrep.2007.40.6.861.

- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & Mcphail, A. T., 1971, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325-2327.
- Wilson, C. R., Sauer, J.-M. & Hooser, S. B., 2001, Taxines: a review of the mechanism and toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids, *Toxicon*, 39, 175-185.
- WHO, 2019, Kaynak: <https://www.who.int/cancer/en>, [Ziyaret Tarihi :16.05.2019].
- World Health Organization, 2011, WHO model list of essential medicines: 17th list, March.
- Yaltirik, F., 1997, *Orman ve park ağaçlarımız: İğne yapraklılar*, Atlas.
- Yaltirik, F. & Efe, A., 1994, *Dendroloji: ders kitabı: gymnospermae-angiospermae*, İstanbul Üniversitesi.
- Yang, L., Zheng, Z.-S., Cheng, F., Ruan, X., Jiang, D.-A., Pan, C.-D. & Wang, Q., 2016, Seasonal dynamics of metabolites in needles of *Taxus wallichiana* var. *mairei*, *Molecules*, 21, 1403.
- Yared, J. A. & Tkaczuk, K. H., 2012, Update on taxane development: new analogs and new formulations, *Drug design, development and therapy*, 6, 371.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. & Hara, Y., 1996, Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures, *Nature biotechnology*, 14, 1129.
- ZMO, 2018, Kaynak: http://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=30070&tipi=17&sube=0, [Ziyaret Tarihi: 9.06.2019].
- Żwawiak, J. & Zaprutko, L., 2014, A brief history of taxol, *Journal of Medical Science*, 83, 47- 52.

EKLER

EK 1. *Taxus* türlerinde bulunan taksan türevi bileşiklerin miktarları ile, bu tez çalışmasında kullanılan ve Türkiye’de yetişen fındık dokularında (*Corylus avellana* L.) en yüksek miktarda tespit edilen taksan türevi bileşiklerinin karşılaştırılması ($\mu\text{g/g}$). (10-DAB III: 10 – deasetil bakkatin III), Ortalama $\pm$ Standart sapma ($n = 3$), ($\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık).

	Bitki Çeşitleri	Bitki Dokusu	10 – DAB III	Bakkatin III	Sefalomanin	Paklitaksel	Kaynak
<i>Taxus spp.</i>	<i>T.baccata</i>	Gövde	$91,7 \pm 0,7$	$9,1 \pm 0,8$	$17,8 \pm 1,6$	$2,3 \pm 1$	Głowniak ve Mroczek, 1999
	<i>T.baccata</i>	İğne yaprak	$57,2 \pm 0,8$	$19,3 \pm 1,0$	$38,7 \pm 4$	$11,7 \pm 1,5$	
	<i>T.baccata</i>	İğne yaprak	$762 \mu\text{g/g}$	$14 \mu\text{g/g}$	$22 \mu\text{g/g}$	$41 \mu\text{g/g}$	Van ve diğ., 2000
	<i>T. wallichiana</i> var. <i>mairei</i> .	İğne yaprak	$190 \mu\text{g/g}$	$200 \mu\text{g/g}$	$40 \mu\text{g/g}$	$100 \mu\text{g/g}$	Yang ve diğ., 2016
<i>Corylus avellana</i> L.	Ham Fındık	Sert kabuk	$9,48 \pm 1,48$				
		İnce kabuklu meyve				$4,36 \pm 0,16$	
	Tombul Fındık	İnce Kabuk		$10,44 \pm 0,9$			Kutlutürk, 2019
	Sivri Yağlı Fındık	İnce Kabuk			$6,37 \pm 1,23$		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gülbahar Zehra KUTLUTÜRK
Doğum Yeri	Mexico D. F
Doğum Tarihi	19.01.1990
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0506 894 23 23
E-Posta Adresi	gzkutluturk@gmail.com
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji (İngilizce) Bölümü
Mezuniyet Yılı	07.07.2015

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

Doktora	
Üniversite	-----
Enstitü Adı	-----
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	