

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

ARNEBIA DENSIFLORA LEDEB. BİTKİSİNDE BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ
METOTLARI İLE ŞİKONİN VE TÜREVLERİNİN ÜRETİLMESİ

Tuğba ERÇETİN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gülnur Toker

Aralık

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Tuğba Erçetin

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Gülnur TOKER danışmanlığında, Tuğba ERÇETİN tarafından hazırlanan bu çalışma 16/12/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gülnur TOKER İmza:

Üye : Prof. Dr. Cengiz SANCAK İmza:

Üye : Doç. Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN İmza:

Üye : Prof. Dr. Ali ERGÜL İmza:

Üye : Prof. Dr. Murat KARTAL İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

ARNEBIA DENSIFLORA LEDEB. BİTKİSİNDE BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ METOTLARI İLE ŞİKONİN VE TÜREVLERİNİN ÜRETİLMESİ

Tuğba Erçetin

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Gülnur TOKER

Anadolu ve Yunanistan'da yetişen bir tür olan *Arnebia densiflora* Ledeb. (Boraginaceae) köklerinden elde edilen ekstreler; yanık, yara, egzama tedavilerinde kullanıldığı gibi, boyar madde olarak gıda, dokumacılık ve kozmetik sanayiinde de kullanılmaktadır. Köklerden izole edilen alkannin/şikinin türevi naftokinonlar; yara iyileştirici, antitümöral, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antioksidan aktivitelere sahiptir.

Bu çalışmada, *A. densiflora* bitkisinde, şikinin ve türevlerinin miktarlarının doku kültürü metotları olan kallus, süspansiyon kültürleri ve biyoreaktörlerde artırılması amaçlanmıştır. Bitkinin kökleri, genç sürgünleri ve yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve kallus üretilmesi aşamasında yoğun bir kontaminasyon problemi ortaya çıkmıştır. Bu problemi aşabilmek amacıyla farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Eksplantlar NaOCl, PPM ve H₂O₂ ve antibiyotik-antifungal karışımları ile muamele edildikten sonra çeşitli oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren Murashige ve Skoog (MS), Gamborg (B5) ve Schenk ve Hildebrandt (SH) ortamlarına ekilerek karanlıkta inkübe edilmişlerdir. En iyi kallus gelişimi görülen MS ortamı ile hücre hatları oluşturulmuştur ve bu kalluslar şikinin üretimi için özel ortamlar olan M9 ve M10 ortamlarına transfer edilmişlerdir.

Kallus ve süspansiyon kültürleri 50 gün, biyoreaktörler 25 gün süre ile izlenmiştir. M9 ve M10 ortamlarında oluşturulan kalluslarda, süspansiyon kültürlerinde, biyoreaktörlerde gelişen hücrelerde ve sıvı ortamlarda şikinin ve türevlerinin analizleri yapılmıştır. *In vitro* olarak elde edilen bu hücrelerdeki ve bitkinin kök, kabuk kısımlarındaki şikinin, alkannin ve asetilalkannin değerleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilerek karşılaştırılmıştır. Kantitatif analizlerde spektrofotometrik metot ve ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Kiral kolon kullanılarak yapılan HPLC analizleri ile de alkannin ve şikinin ayırımı yapılarak miktarları belirlenmiştir.

Şikinin ve türevlerinin analizleri sonucunda, *in vitro* olarak yapılan tüm çalışmalarda, sekonder metabolit üretimine M10 ortamının, M9 ortamından daha iyi yanıt verdiği tespit edilmiştir. Spektrofotometrik analiz sonucunda şikinin ve türevleri M10 ortamında geliştirilen kalluslarda 40. günde (% 2.09), süspansiyon kültürlerinde 50. günde (166.00

mg/L) ve biyoreaktörlerde ise 25. günde (213.42 mg/L) en yüksek miktarlarda bulunmuştur. Bitkinin köklerinde % 1.404, kabuklarında ise % 17.276 şikonin ve türevi bulunduğu tespit edilmiştir.

Ters faz HPLC ile analizleri sonucunda toplam şikonin ve asetilalkannin miktarları sırasıyla M10 ortamında geliştirilen kalluslarda 40. günde % 1.646 ve % 1.227; süspansiyon kültürlerinde 50. günde 54.614 mg/L ve 11.231 mg/L; biyoreaktörlerde ise 25. günde 111.40 mg/L ve 59.475 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bitkinin köklerinde bulunan şikonin ve asetilalkannin miktarları % 0.636 ve 0.030; kabuklarda ise % 13.78 ve 4.707 olarak belirlenmiştir.

Kiral kolonla yapılan HPLC analizleri sonucunda, bitkinin kök ve kök kabuklarında ve de *in vitro* olarak elde edilen hücreler ve ortamlarda çoğunlukla alkannin miktarının şikonin miktarından fazla olduğu belirlenmiştir. Şikonin:alkannin oranı kök kabuklarında 2:98 iken, bu değer in kalluslarda 24-65:76-35, süspansiyon kültürlerinde 31-57:69-43, biyoreaktörlerde üretilen hücrelerde ise 1.5-30:98.5-70 oranlarında olduğu tespit edilmiştir.

2013, 200 sayfa

Anahtar kelimeler: *Arnebia densiflora* Ledeb., naftokinon, şikonin, alkannin, kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, biyoreaktör, HPLC, kiral ayırım

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRODUCTION OF SHIKONIN AND DERIVATIVES WITH PLANT TISSUE CULTURE METHODS IN *ARNEBIA DENSIFLORA* LEDEB.

Tugba Ercetin

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Gulnur TOKER

Arnebia densiflora Ledeb. (Boraginaceae), grown in Anatolia and Greece, the extracts which are obtained from roots not only used for the treatments of burn, wound, eczema but also used for dying food, textile and cosmetology. Naphtoquinones which are shikonin and alkannin derivatives are isolated from the roots that have a wound healing, antitumoral, antimicrobial, antiinflammatory and antioxidant activities.

In this study, the amounts of the shikonin, alkannin and its derivatives in *A. densiflora* plant were aimed to increase in callus, suspension cultures and bioreactors which are the tissue culture methods. The parts of the plant's roots, young shoots and leaves were used as explants source and the intense contamination problem came up during the phase of production callus. Different sterilization techniques were used to overcome this problem. After treatment of explants with NaOCl, PPM, H₂O₂ and antibiotic-antifungal mixture these were sown in MS, B5, LS and SH media containing growth regulators in various proportions and incubated in the dark. The cell line was created with MS medium which has the best callus development and these calluses were transferred to M9 and M10 media which are the special media for the production of shikonin.

Callus and suspension cultures have been observed for 50 days, bioreactors have been observed for 25 days. Shikonin and derivatives which were created by the growing cell with M9 and M10 media on calluses, suspension cultures and bioreactors and also extracellular media in bioreactors have been analyzed. Shikonin, alkannin and acetylalkannin values in these cells which have been obtained from the *in vitro* and in the root, bark parts of the plant have compared by analyzing qualitatively and quantitatively. Spectrophotometric method and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) have been used for quantitative analysis. Then the amounts of alkannin and shikonin have been determined with making a distinction by using a chiral colon in an HPLC analysis.

As a result of analysis of shikonin and its derivatives were detected in M10 medium

responded better than M9 medium to the production of secondary metabolites all of the *in vitro* studies. The highest amounts were obtained from the callus cultures on 40th day (2.09 %), suspension cultures on 50th day (166 mg/L), bioreactors on 25th day (213.42 mg/L) in M10 media for the production of shikonin and derivatives by spectrophotometric method. Shikonin and derivatives determined in the plant roots 1.404 % and the barks 17.276 %.

A result of RP-HPLC analysis, the amount of the total shikonin and acetylalkannin were determined to develop in M10 medium to the callus cultures on 40th day respectively 1.646 % and 1.227 %, suspension cultures on 50th day 54.614 mg/L and 11.231 mg/L, bioreactors on 25th day 111.4 mg/L and 59.475 mg/L. The amount of the shikonin and acetylalkannin determined in the plant roots 0.636 % and 0.03 %, the barks 13.78 % and 4.707 %.

A result of HPLC analysis with chiral column determined the amount of alkannin higher than the amount of shikonin in the root and root bark of the plant and as for that in the cells and media which were obtained from the *in vitro* mostly. The ratio of shikonin:alkannin were found in the root barks 2:98 while the rates in calluses 24-65:76-35, in suspension cultures 31-57:69-43, the cells produced in bioreactors 1.5-30:98.5-70.

2013, 200 pages

Keywords: *Arnebia densiflora* Ledeb., naphtoquinone, shikonin, alkannin, callus culture, cell suspension culture, bioreactor, HPLC, chiral, plant tissue culture

TEŞEKKÜR

Hem yüksek lisans hem de doktora süresince birlikte çalıştığım sürecin her aşamasında ilgi ve desteklerini gördüğüm ve benim üzerimde büyük emekleri bulunan değerli hocalarım ve tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Gülnur TOKER ve Prof. Dr. M. Cihat TOKER'e,

Tezimin şekillendirilmesinde engin bilgi ve deneyimlerini aktararak, beni yönlendiren ve biyoreaktör çalışmalarına öncülük eden değerli hocam Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a ve onun nezdinde Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN, Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ, Sayın Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nın tüm personeline,

Çalışmalarım sırasında sağladığı imkanlar yanında destek ve hoşgörülerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Turhan BAYKAL ve Prof. Dr. Fatma ERGUN olmak üzere Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ana Bilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Çalışmalarım boyunca iyi ve kötü tüm zamanlarımda yanımda yer alan sevgili dostlarım Uzm. Ecz. Fatma Sezer ŞENOL'a, Uzm. Ecz. Sanem HOŞBAŞ'a, Uzm. Ecz. Duygu SEVİM'e, Bilm Uzm.. Eren KARAKOÇ'a ve Uzm. Fizik Müh. Sinem Dalsuna GÜNGÖR'e,

Hayatımın her aşamasında gösterdikleri eşsiz sabır ve hoşgörü ile yanımda olan, varlıklarından güç aldığım annem Sabiha ERÇETİN'e, babam Mustafa ERÇETİN'e, ağabeyim Teoman ERÇETİN'e ve eşi Arzu Ekmen ERÇETİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, TÜBİTAK tarafından desteklenen "Bitkisel Kaynaklı İlaç Etken Maddelerinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Üretilmesi Üzerine Çalışmalar (105S343)" adlı proje kapsamında yürütülmüştür. Sağladığı maddi imkanlardan dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TESEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Botanik Bilgiler	3
2.1.1. Boraginaceae Familyası.....	3
2.1.2. <i>Arnebia</i> Forsk. cinsi.....	4
2.1.3. <i>Arnebia</i> cinsinin tayin anahtarı (1).....	4
2.1.4. <i>Arnebia densiflora</i> Ledeb.	5
2.1.4.1. Sistematik bilgileri.....	5
2.1.4.2. Genel özellikleri ve habitatu	5
2.1.4.3. Türkiye’deki yayılışı.....	6
2.1.4.4. <i>A. densiflora</i> ’nın sinonimleri ve yerel isimleri	7
2.1.4.5. <i>Arnebia densiflora</i> ’nın kullanım alanları.....	7
2.2. <i>Arnebia</i> türlerinin kimyasal içeriği	8
2.2.1. Naftokinonlar	8
2.2.2. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin genel özellikleri	9
2.2.2.1. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin kullanım alanları ve tarihi	10
2.2.2.2. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin tanımlanması	12
2.2.2.3. Şikonin ve türevlerinin biyosentez yolu	18
2.3. Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimi Çalışmaları	25
2.3.1. Sekonder metabolitlerin tanımı	25
2.3.2. Bitki doku kültürü	26
2.3.2.1. Kallus ve süspansiyon kültürü	26
2.3.2.2. Bitki doku kültüründe kullanılan besin ortamları	27
2.3.2.3. Saçak kök kültürü	28
2.3.2.4. Biyoreaktörler.....	28
2.4. Şikonin ve türevlerinin doku kültürleri ile üretimi	30
2.4.1. Kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları.....	31
2.4.1.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları	36

2.4.1.2. <i>A. densiflora</i> ile yapılan kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları.....	38
2.4.2. Saçak kök kültürü çalışmaları.....	38
2.4.2.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan saçak kök kültürü çalışmaları.....	41
2.4.3.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan biyoreaktör çalışmaları.....	41
2.5. Şikonin ve Türevleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	42
2.5.1. Yara iyileştirici aktivite.....	42
2.5.1.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan yara iyileştirici aktivite çalışmaları.....	45
2.5.1.2. <i>A.densiflora</i> 'nın yara iyileştirici aktivitesi.....	46
2.5.2. Antitümöral aktivite çalışmaları.....	46
2.5.2.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan antitümöral aktivite çalışmaları.....	54
2.5.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları.....	55
2.5.3.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları.....	57
2.5.3.2. <i>A.densiflora</i> 'nın antimikrobiyal aktivitesi.....	59
2.5.4. Antienflamatuvar ve antioksidan aktivite çalışmaları.....	60
2.5.4.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan antienflamatuvar ve antioksidan aktivite çalışmaları.....	62
2.5.4.2. <i>A.densiflora</i> 'nın antienflamatuvar ve antioksidan aktivitesi.....	63
2.5.5. Diğer etkileri ve kullanımına ilişkin çalışmalar.....	64
2.5.5.1. <i>Arnebia</i> türlerinin diğer etkileri ve kullanımına ilişkin çalışmalar.....	67
2.5.5.2. <i>Arnebia densiflora</i> 'nın diğer etkileri ve kullanımına ilişkin çalışmalar.....	68
2.6. Şikonin ve Türevlerinin Analizine İlişkin Fitokimyasal Çalışmalar.....	69
2.6.1.1. <i>Arnebia</i> türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar.....	77
2.6.1.2. <i>A. densiflora</i> üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar.....	79
<u>3. GEREKÇE ve AMAC.....</u>	<u>80</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>82</u>
4.1. Materyal.....	82
4.2. Yöntem.....	82
4.2.1. Besin ortamının hazırlanması.....	83
4.2.1.1. Stok çözeltiler.....	83
4.2.1.1.1. Major tuz stok çözeltilerinin hazırlanması.....	85
4.2.1.1.2. Minör tuz stok çözeltilerinin hazırlanması.....	85
4.2.1.1.3. Vitamin stok çözeltilerinin hazırlanması.....	86
4.2.1.2. Bitki büyüme düzenleyicileri.....	87
4.2.1.2.1. Naftalen Asetik Asit (NAA) stok çözeltisi (1 mg/mL).....	87
4.2.1.2.2. Indol asetik asit (IAA) stok çözeltisi (1 mg/mL).....	87
4.2.1.2.3. Benzil amino purin (BAP) stok çözeltisi (1 mg/mL).....	87
4.2.1.2.4. Kinetin stok çözeltisi (1 mg/mL).....	87
4.2.1.3. pH ayarı.....	88
4.2.1.4. Besin ortamlarının hazırlanması.....	88
4.2.1.5. Sterilizasyon.....	88
4.2.1.5.1. Besin ortamının sterilizasyonu.....	89
4.2.1.5.2. Diğer malzemelerin sterilizasyonu.....	89
4.2.1.5.3. Ekim odasının sterilizasyonu.....	89
4.2.1.5.4. Ortamların petri, magenta, erlenmayer ve reaktörlere aktarılması.....	89

4.2.2. Eksplantların yüzey sterilizasyonu.....	90
4.2.2.1. Tween 20 ile NaOCl kullanımı	91
4.2.2.2. Antibiyotik- antifungal karışımları ile PPM kullanımı.....	91
4.2.2.3. PPM denemesi.....	92
4.2.2.4. H ₂ O ₂ denemesi	92
4.2.3. <i>In vitro</i> kültürlerin oluşturulması	92
4.2.3.1Eksplant ekimi.....	93
4.2.3.2. Kallus kültürleri.....	93
4.2.3.3. Süspansiyon kültürleri	93
4.2.3.4. Biyoreaktör sistemleri.....	95
4.2.4. <i>In vitro</i> kültürlerde sekonder metabolit üretilmesi ve arttırılması üzerine yapılan çalışmalar	95
4.2.4.1. Süspansiyon kültürlerinde elisitör denemeleri	95
4.2.4.1.1. Metil Jasmonat uygulanması	95
4.2.4.1.2. Fungal uyarıcıların uygulanması	96
4.2.4.2. Ortam pH'larının değiştirilmesi	97
4.2.4.3. Farklı besin ortamlarının şikonin ve türevlerinin üretimi üzerine olan etkileri	97
4.2.4.3.1. Altı farklı ortam üzerinde yapılan çalışmalar	97
4.2.4.3.1. MS, M9 ve M10 ortamlarının kullanıldığı kallus ve süspansiyon kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar	98
4.2.4.4. Biyoreaktörlerde yapılan çalışmalar	99
4.2.5. Şikonin ve türevlerinin analizi	101
4.2.5.1. <i>In vitro</i> kültürlerden elde edilen hücre ve ortamlar ile <i>A. densiflora</i> ekstresinin hazırlanması	102
4.2.5.2. Standart maddelerin hazırlanması	104
4.2.5.3. İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	104
4.2.5.4. Spektrofotometrik çalışmalar	104
4.2.5.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC).....	105
4.2.5.5.1. Ters faz HPLC	105
4.2.5.5.2. Normal faz HPLC (Enantiyomerlerin ayrımı)	106
4.2.5.7. HPLC sonuçlarının değerlendirilmesi	107
4.2.5.7.1. Piklerin doğruluğunun belirlenmesi	107
4.2.5.7.2. Ters faz HPLC'de kalibrasyon eğrisinin çizilmesi.....	107
4.2.5.7.3. Normal faz HPLC'de kalibrasyon eğrisinin çizilmesi.....	108
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	109
5.1. Eksplantların Sterilizasyonu.....	109
5.1.1. Tween 20 ile NaOCl Kullanımı	109
5.1.2. MS Ortamda NaOCl ile Birlikte Antibiyotik-Antifungal Karışımları ve PPM Kullanımının Karşılaştırılması.....	110
5.1.3. Çeşitli Ortamlarda PPM Denemesine Ait Bulgular	111
5.1.4. MS Ortamda H ₂ O ₂ ile Birlikte Antibiyotik-Antifungal Karışımı Denemesine Ait Bulgular	113
5.2. Kallus Kültürlerine Ait Bulgular.....	115

5.3. Süspansiyon kültürlerine ait bulgular	117
5.3.1. Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme Eğrisinin Oluşturulması	117
5.3.2. Süspansiyon Kültürlerinde Elisitör Denemelerine Ait Bulgular	118
5.3.2.1. Metil Jasmonat Uygulanmasına Ait Bulgular	118
5.3.3. Ortam pH'larının Değiştirilmesine Ait Bulgular	120
5.3.4. Farklı Besin Ortamlarının Şikonin ve Türevlerinin Üretimine Olan Etkilerine Dair Bulgular	121
5.3.4. MS, M9 ve M10 Ortamlarında Gelişen Kalluslara Ait Bulgular	124
5.4. Biyoreaktör Çalışmalarına Ait Bulgular	129
5.5. Kallus, Süspansiyon Kültürü ve Biyoreaktörlerde Üretilen Sekonder Metabolitlerin Araştırılması	132
5.5.1. Kalitatif Analiz (İTK)	132
5.5.1.1. Kallus kültürlerinde İTK Analizi	132
5.5.1.2. Süspansiyon Kültürlerinde İTK Analizi	135
5.5.1.2.1. Fungal Uyarıcı Uygulamasına Ait İTK Analizi	135
5.5.1.2.2. Farklı Ortam Uygulamasına Ait İTK Analizi	136
5.5.1.2.3. M9 ve M10 Ortamlarında Kurulan Süspansiyon Kültürlerinin İTK Analizi	136
5.5.1.2.4. Rozmarinik Asitin İTK Analizi	138
5.5.1.3. Biyoreaktörlerde Gelişen Hücre ve Ortamların İTK Analizi	138
5.5.2. Kantitatif Analiz	140
5.5.2.1. Spektrofotometrik Çalışmalar	140
5.5.2.2. HPLC Analizi	144
5.5.2.2.1. Ters Faz HPLC ile Şikonin Miktar Tayini	144
5.5.2.2.2. Alkannin ve Şikonin Enantiyomerlerinin HPLC ile Ayrımı	150
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>160</u>
6.1. Eksplantlardan Kallus Oluşumu ve Sterilizasyonu ile İlgili Tartışma	161
6.2. Kallus Üretimi ile İlgili Tartışma	163
6.3. Süspansiyon Kültürü ve Sekonder Metabolit Arttırımı ile İlgili Tartışma	166
6.4. Biyoreaktörler ile İlgili Tartışma	169
6.5. <i>In vitro</i> Üretilen Sekonder Metabolit Miktarları ile İlgili Tartışma	171
6.5.1. Kalluslarda Üretilen Sekonder Metabolitler	171
6.5.2. Süspansiyon Kültürlerinde Üretilen Sekonder Metabolitler	174
6.5.3. Biyoreaktörlerde Üretilen Sekonder Metabolitler	175
6.6. Sonuç	177
<u>KAYNAKLAR</u>	<u>178</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>198</u>
<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR</u>	<u>200</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Arnebia densiflora</i> bitkisinin görünümü ve habitatı	6
Şekil 2.2. <i>A. densiflora</i> 'nın yayılışı (■) ve toplanma noktası (◇)	7
Şekil 2.3. Naftokinon iskeleti	9
Şekil 2.4.a. Alkannin ve şikoninin üç boyutlu yapısı b. Alkanninin c. Şikoninin moleküler yapısı (4).....	10
Şekil 2.5. Naftazarin (a) ve şikoninlerin (b) ilk ve yanlış olarak belirlendiği molekül yapıları (25).....	12
Şekil 2.6. Şikonin biyosentez yolunun ayrıntılı olarak gösterimi (32)	19
Şekil 2.7. Ana hatları ile şikonin biyosentez yolağı (35) (<i>PAL</i> : Fenilalanin amonyum liyaz, <i>HMGR</i> : 3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz, <i>PGT</i> : <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit meta-geraniltransferaz)	20
Şekil 2.8. Şikonin biyosentez yolağında rosmarinik asidin yeri (49)	25
Şekil 2.9. Şikonin üretiminde kullanılan iki aşamalı biyoreaktörün çalışma mekanizması (64).....	29
Şekil 2.10. Yıllara göre <i>L. erythrorhizon</i> bitkisi ile yapılan çalışmalar (67)	31
Şekil 2.11. Şikonin, asetilşikoinin ve izobütirilşikoininin akciğer tümör gelişimini inhibe etmeleri (10)	48
Şekil 2.12. Çeşitli Boraginaceae bitkilerinde karışım halinde bulunan şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin oranları (28).....	69
Şekil 4. 1. Eksplant olarak kullanılan ince kök parçaları (a), tek yıllık gövdeler ve yapraklar (b), kök üstündeki gövde sürgünleri (c,d).....	91
Şekil 4.2. Süspansiyon kültürlerinin genel görünümü	94
Şekil 4.3. Biyorektörlerden süzülerek ayrılan hücrelerin liyofilize edildikten sonraki görünümleri (a) ve ekstraksiyonları (b) ile ortama geçen maddelerin doğrudan ekstraksiyonu (c).....	103
Şekil 4.4.a. Kloroformu uçurulan bitki kök ekstraktlarının üzerine 1N NaOH (mavi) ve 1N HCl eklendikten (kırmızı) sonraki görünümleri b. Hidrolize edilen ekstraktın kloroforma geçen fazının ayrılması	103
Şekil 5.1. B5 ortamında ilk kallus (a) ve renkli kallusun (b) oluşumu	111
Şekil 5.2. Farklı besin ortamlarında gelişen genç sürgün kallusların görünümleri	113

Şekil 5.3. PPM (a) ve H ₂ O ₂ ile birlikte antibiyotik-antifungal karışımı (b) kullanılarak yapılan sterilizasyonlarda gözlenen kontaminasyonlar.....	113
Şekil 5.4. Eksplanttan fide geliştirme aşamaları.....	115
Şekil 5.5. MS ortamında elde edilen parçalanabilir yapıdaki kallusların yandan (a) ve üstten (b) görünüşleri.....	116
Şekil 5.6. <i>A. densiflora</i> süspansiyon kültüründe büyüme eğrisi.....	118
Şekil 5.7. MJ ilave edilmiş süspansiyon kültürlerinde ve kontrollerde hücre ağırlığı (a) ve sıvı ortam hacminin (b) karşılaştırılması.....	119
Şekil 5.8. Kallus ve süspansiyon kültürlerinin 14. ve 28. günlerinde değişen pH'nın hücre ağırlık artışına etkisi.....	120
Şekil 5.9. 14 ve 28 günlük inkübasyonlarda değişen pH'nın hücre ağırlık artışına olan etkisi.....	121
Şekil 5.10. Altı farklı ortam kullanarak kurulan 40 günlük kallus kültürlerinde hücre gelişimi ve şikonin üretimi.....	122
Şekil 5.11. Altı farklı ortam kullanarak kurulan 21 günlük süspansiyon kültürlerinde hücre gelişimi ve şikonin üretimi.....	123
Şekil 5.12. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların görünüşleri.....	125
Şekil 5.12. (devam).....	126
Şekil 5.13. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların yaş ve kuru ağırlıklarının değişimleri.....	127
Şekil 5.14. MS, M9 ve M10 ortamlarında oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 20 gün sonundaki görünüşleri.....	128
Şekil 5.15. MS, M9 ve M10 ortamlarında 20 günlük süspansiyon kültürlerinde gelişen hücrelerin yaş (a) ve kuru ağırlıklarının (b) değişimi.....	128
Şekil 5.16. Aynı ortam içeriğine sahip ve farklı pH değerlerindeki biyoreaktörlerin görünüşleri.....	130
Şekil 5.17. % 15 oranında kallus içeren reaktörlerde 20. gün sonunda (a), süzülerek ayrılan hücreler (b) ve ortamlar (c) daki renklenmenin görünümü.....	131
Şekil 5.18. % 10 ve 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerin ağırlık değişimleri.....	132
Şekil 5.19. M9 ortamının kallus kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka.....	134
Şekil 5.20. M10 ortamının kallus kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka..	134
Şekil 5.21. <i>A. niger</i> ve <i>R. stolonifer</i> eklenen ve kontrol süspansiyonlarınının 12. ve 15. günlerdeki ekstrelerine ait S2'deki ince tabaka kromatogramı.....	135

Şekil 5.22. M9 ve M10 ortamlarının süspansiyon kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı	137
Şekil 5.23. M9 ve M10 ortamlarının süspansiyon kültürlerinde şikonin ve türevleri ile hidrolizatın S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı	137
Şekil 5.24. <i>A. densiflora</i> süspansiyon kültürlerine ait hücre ekstralarının S4 sisteminde rozmarinik asit yönünden analizi.....	138
Şekil 5.25. M10 ortamında B1-B4 reaktörlerinde gelişen hücrelerde bulunan ve ortamlara geçen şikonin ve türevlerinin S2 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı	139
Şekil 5.26. M10 ortamında B1-B4 reaktörlerinde gelişen hücrelerde bulunan ve ortamlara geçen şikonin ve türevlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı	139
Şekil 5.27. B1-B4 biyoreaktörlerinde gelişen hücrelerde ve ortamlarda bulunan şikonin türevlerinin hidroliz edildikten sonra S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı.....	140
Şekil 5.28. Şikoninin kalibrasyon eğrisi	141
Şekil 5.29. Bitkinin kabuk+kök kısmından elde edilen ekstrenin (a) ve M10 ortamında gelişen 50. gün kallus kültürü hücre ekstralarının (KM10 50) (b) UV spektrumları	141
Şekil 5.30. Ters faz HPLC’de şikonin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi.....	144
Şekil 5.31. Ters faz HPLC’de asetilalkannin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi.....	145
Şekil 5.32. Şikonin ve asetilalkannin standartlarının RP-HPLC’de ayrımı	145
Şekil 5.33. Hidroliz edilen <i>A. densiflora</i> kökünün RP-HPLC kromatogramı.....	146
Şekil 5.34. <i>A. densiflora</i> kök kabuklarında bulunan şikonin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı.....	146
Şekil 5.35. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus kültürü ekstralarında bulunan şikonin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı	146
Şekil 5.36. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus kültürü ekstralarının hidroliz edildikten sonraki RP-HPLC kromatogramı	147
Şekil 5.37. BK-4 biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerde (a) ve sıvı ortamda (BS-4)(b) bulunan şikonin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı	147
Şekil 5.38. Normal faz kiral kolonda şikonin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi.....	150
Şekil 5.39. Normal faz kiral kolonda alkannin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi.....	150

Şekil 5.40. 400 µg/mL konsantrasyondaki alkannin standardının normal faz HPLC kromatogramı.....	151
Şekil 5.41. Şikonin standardının (Chromadex, CA. USA) normal faz HPLC’de ayrımı	151
Şekil 5.42. Hidroliz edilen <i>A. densiflora</i> kök kabuklarına ait normal faz HPLC kromatogramı.....	152
Şekil 5.43. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus ekstrelerinin hidroliz edildikten sonraki normal faz HPLC kromatogramı	152
Şekil 5.44. M9 ortamında 40. günde gelişen kallus ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	153
Şekil 5.45. M9 ortamında 45. günde gelişen kallus ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	153
Şekil 5.46. M9 ortamında 50. günde gelişen kallus kültürü ekstrelerinde ait normal faz HPLC kromatogramı.....	153
Şekil 5.47. Süspansiyon kültürlerinde M10 ortamında 20. günde gelişen hücrelerin ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	154
Şekil 5.48. Süspansiyon kültürlerinde M10 ortamında 50. günde gelişen hücrelerin ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	154
Şekil 5.49. BK-4 biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerin ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	155
Şekil 5.50. BS-4 biyoreaktör sistemine ait normal faz HPLC kromatogramı.....	155
Şekil 5.51. <i>A. densiflora</i> kök, kabukları ile birlikte kök ve sadece kabuk kısımlarında bulunan şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (%).....	157
Şekil 5.52. M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallus kültürlerinde oluşan % şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarındaki değişimler	157
Şekil 5.53. M9 ve M10 ortamlarında gelişen süspansiyon kültürlerinde oluşan şikonin/alkanninin HPLC’de belirlenen miktarları (mg/L).....	158
Şekil 5.54. Biyoreaktör sistemlerinde oluşan % şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları.....	159

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Arnebia</i> türlerinde belirlenen şikonin türevi naftokinonlar (22, 20).....	13
Çizelge 2.2. <i>Arnebia</i> türlerinde belirlenen alkannin türevi naftokinonlar	15
Çizelge 2.3. <i>Arnebia</i> türlerinde belirlenen diğer naftokinonlar	17
Çizelge 2.4. Hücre kültürlerinde şikonin üretimini etkileyen faktörler (6).....	40
Çizelge 4.1. Kullanılan MS, SH, B5, LS, M9 ve M10 ortamlarının tam içerikleri.....	84
Çizelge 4. 2. MS, LS, SH, B5, M9 ve M10 ortamları için major tuz stok çözeltisi (10x), (g/L)	85
Çizelge 4. 3. MS, SH, B5, LS, M9 ve M10 ortamları için minor tuz ve demir içeren stok çözeltisi (100x), (mg/L)	86
Çizelge 4.4. MS, SH, B5 ve LS ortamları için vitamin stok çözeltisi (100x), (mg/L)	86
Çizelge 4.5. 6 farklı ortam çalışmasında kullanılan hormon ve amonyum tuzu içerikleri	98
Çizelge 4.6. İkinci biyoreaktör denemesinde hazırlanan ortamların içerikleri	100
Çizelge 4.7. RP-HPLC'de gradient yöntemine göre solvan kullanımı	106
Çizelge 4. 8. Ters faz HPLC'de şikonin, alkannin ve asetilalkannin standartlarının dilüsyon serisi.....	107
Çizelge 4. 9. Normal faz HPLC'de şikonin ve alkannin standartlarının dilüsyon serisi	108
Çizelge 5.1. Yüzey sterilizasyonunda NaOCl konsantrasyonlarına göre farklı ortamlardaki eksplantlarda görülen kontaminasyonlar (%).....	109
Çizelge 5.2. % 25 NaOCl ile yüzey sterilizasyonundan sonra Penisilin+Streptomisin+ Amfoterisin B içeren MS ortamına ekilen eksplantlarda belirlenen % kontaminasyon ve kallus oluşum oranları.....	110
Çizelge 5.3. Farklı oranlarda PPM ile yüzey sterilizasyonundan sonra % 0.5 PPM içeren MS ortamına ekilen eksplantlarda belirlenen % kontaminasyon ve kallus oluşum oranları .	110
Çizelge 5.4. PPM denemesinde sürgün eksplantlarında görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%)	112
Çizelge 5.5. PPM denemesinde kök eksplantlarında görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%).....	112
Çizelge 5.6. H ₂ O ₂ /antibiyotik-antifungal karışımı denemesinde MS ortamına ekilen sürgün eksplantlarında 21 günde görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%) ile kallus kütle büyüme indeksleri (KBI).....	114

Çizelge 5.7. H ₂ O ₂ /antibiyotik-antifungal karışımı denemesinde MS ortamına ekilen kök eksplantlarında 21 günde görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%) ile KBİ değerleri.....	114
Çizelge 5.8. PPM denemesinde kullanılan farklı ortamlardaki kallus ve alt kültür kalluslarının kütle büyüme indeksleri.....	116
Çizelge 5.9. MS ortamında hazırlanan süspansiyon kültüründeki ağırlık artışları.....	117
Çizelge 5.10. MJ uygulaması yapılan süspansiyon kültürlerinde ağırlık (g) değişimi.....	118
Çizelge 5.11. Altı farklı ortam ile oluşturulan 40 günlük kallus kültürlerinde hücre ağırlık değişimi.....	122
Çizelge 5.12. Altı farklı ortam ile kurulan süspansiyon kültürlerinde ağırlık ve renk değişimi.....	124
Çizelge 5.13. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların ağırlık değişimleri (g).....	127
Çizelge 5.14. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin ağırlık değişimleri.....	128
Çizelge 5.15. Aynı ortam içeriğine sahip ve farklı pH değerlerindeki reaktörlerin 17 gün sonunda ağırlık değişimleri.....	130
Çizelge 5.16. % 10 ve 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerinde ağırlık ve hacim değişimleri.....	131
Çizelge 5.17. Şikonin, alkannin ve asetilalkanninin S1 solvan sisteminde belirlenen R _f değerleri ve gınışığı ile UV ₃₆₆ da verdikleri renkler.....	133
Çizelge 5.18. Kallus kültürlerinde biyokütle değişim oranları ve üretilen şikonin türevleri ile bitki ekstralarında spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen % ve mg/g miktarları.....	142
Çizelge 5.19. Süspansiyon kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen miktarları (% , mg/L) ve hücrelerdeki KBİ değerlerinin değişimi.....	143
Çizelge 5.20. Biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkanninin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen miktarları (mg/L).....	143
Çizelge 5.21. Bitki kök ile kabuklarında bulunan ve kallus kültürlerinde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/g).....	148
Çizelge 5.22. Süspansiyon kültürlerinde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/L).....	149
Çizelge 5.23. Biyoreaktörlerde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/L).....	149

Çizelge 5.24. Bitki kök ile kabuklarında bulunan ve kallus kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin normal faz HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (%)	156
Çizelge 5.25. Süspansiyon kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin normal faz HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (% , mg/L).....	158
Çizelge 5.26. Biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (mg/L).....	159

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4 diklorofenoksiasetik asit
A549	Akciğer karsinoma hücre hattı
ADP	Adenozin difosfat
AdV3	Adenovirüs tip 3
B5	Gamborg B5 besi ortamı
BAP	6-benzilaminopurin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CH ₃ COOH	Asetik asit
CHCl ₃	Kloroform
CNE2	İnsan nazofarenks kanseri hücre hattı
COX-2	Sikloksigenaz-2
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
g	Gram
GLC-82	İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı
GPP	Geranil pirofosfat
GÜEF	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HCT116	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
HeLa	İnsan serviks karsinoma hücre hattı
HepG2	Karaciğer hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HL-60	Akut promiyelositik lösemi hücre hattı
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD-MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi algılama-kütle spektrometresi
HPTLC	Yüksek performanslı ince-tabaka kromatografisi
HSCCC	Yüksek hızlı karşı akım kromatografisi
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı

IAA	İndol-3-Asetik Asit
IC ₅₀	% 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
IHN	İzohekzenilnaftazarin
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi (Thin layer chromatography)
KB	İnsan oral kavite kanser hücre hattı
KIN	Kinetin (6-furfurilamino purin)
L	Litre
LC-MSMS	Sıvı kromatografi-Kütle Spektrometresi
LD ₅₀	Letal Doz (% 50 ölüme neden olan madde miktarı)
LS	Linsmaier Skoog besi ortamı
LTB4	Lökotrien B4
MAP kinaz	Mitojen-aktive eden protein kinaz
MCF7	İnsan meme karsinomu hücre hattı
MDS-004	Şikoninin indirgenmiş ve 5 asetilli sentetik türevi
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
MJ	Metil jasmonat
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MGC-803	İnsan mide kanseri hücre hattı
MRSA	Metisilin-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromit
NAA	Naftalen-3 Asetik Asit
NaCl	Sodyum klorür
NADP	Nikotin amid adenin dinükleit fosfat
NADPH	Nikotin amid adenin dinükleit fosfatın indirgenmiş formu
NaOCl	Sodyum hipoklorit (Çamaşır suyu)
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PCL-2	Phillips ve Collins besi ortamı
PHB-GLc	p-hidroksibenzoik asit-O-glukozit

PHE	L-fenilalanin
PPM	Plant preservative mixture (Bitki koruyucu karışımı)
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSLDE	Hızlı katı-sıvı dinamik ekstraksiyonu
SGC-790	İnsan mide kanseri hücre hattı
TCA-8113	Oral kanser hücre hattı
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptör
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α
U937	Monosit benzeri histiositik lenfoma hücre hattı
UV	Ultraviyole
VRE	Vankomisine dirençli enterekoklar
β -HIVS	β -hidroksiizovalerilşikolin

1. GİRİŞ

Arnebia Forsk. (Boraginaceae) cinsinin Anadolu'da yetişen 5 türünden birisi olan *Arnebia densiflora* Ledeb. bitkisi sarp, kireçli, kayalık arazilerde yetişen, 20-40 cm yükseklikte, sarı çiçekli, yaprakları kadife gibi tüylü, kısa kalın odunsu gövdeli, çok yıllık bir bitkidir. Anadolu ve Yunanistan'da yetişmektedir (1).

Bitkinin kökleri alkannin/şikinin türevi naftokinonlar taşımaktadır (2). Alkannin ve şikinin kiral çifti, başta yara iyileştirici olmak üzere antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, radikal süpürücü ve antitrombotik aktiviteleri ile üzerinde pek çok çalışma yapılan potansiyel farmasotiklerdir (3, 4). Alkannin ve antipodu şikininler özellikle cilt hastalıkları, yanık, yara, egzama tedavilerinde kullanılmaktadır (5). Köklerden elde edilen ekstrelerin boyar madde olarak gıda, dokumacılık ve kozmetolojide de kullanımı bulunmaktadır (5). *Arnebia* türleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında, köklerden izole edilen bazı naftokinonların antitümör, antifungal, antibakteriyel özellikleri ortaya çıkarılmıştır (6, 7, 8, 9, 4, 10). Alkannin gıda katkısı (Food Additives) olarak FAO/WHO Komitesi tarafından kabul edilmiş ve dünyada yaklaşık 20 ülkede boyar madde olarak kullanılmasına izin verilmiştir (11).

Arnebia densiflora, boya olarak kullanılan diğer Boraginaceae familyası bitkilerine göre fazla miktarda şikinin ve türevlerini taşımaktadır. Anadolu'da yetişen ve halk arasında havaciva olarak bilinen *Alkanna*, *Echium*, *Onosma*, *Anchusa* ve *Arnebia* cinslerine ait 18 bitkiden alınan kök örneklerinin HPLC'de iki farklı kolon sisteminde incelendiği çalışmada naftokinonlar yönünden en zengin bitkinin kök kabuklarında % 16.83 oranında şikinin içeren *A. densiflora* numunesi olduğu bulunmuştur (12).

Şikinin, doku kültürü metotları ile endüstriyel boyutta üretilen ilk sekonder metabolittir (13). Tabata ve ekibi tarafından alkannin ve şikininin ticari üretiminin gerçekleştiği Japonya'da bulunan Mitsui Petrokimya Şirketi, bu konuda birçok patentin sahibi olmuştur. *Lithospermum erythrorhizon* bitkisinden doku kültürü ile endüstriyel boyutta üretilen şikinin; gıda, kozmetik ve ilaç sanayisinde boyar madde olarak kullanılmaktadır (14, 15, 16, 17, 6, 18). Yine Uzak Doğu'da yetişen *Arnebia euchroma*'dan doku kültürü ile şikinin üretilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (19).

İçerdiği naftokinonlardan dolayı *A. densiflora* gerek sanayide yüksek kullanım potansiyeli açısından gerekse tıbbi bir bitki olması nedeniyle değerlendirilmesi gereken bir bitkidir. Bu çalışmada *A. densiflora* bitkisinin çeşitli kısımlarından eksplantlar alınarak farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamları ile kallus, süspansiyon kültürleri ve biyoreaktör sistemleri kurulması ile bu sistemlerdeki şikonin ve türevlerinin arttırılması amaçlanmıştır.

Ülkemizde ve dünyada *A. densiflora* ile bu konuda yapılan herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle bölgesel endemik bir bitki olan *A. densiflora*'dan şikonin üretimi, ülke ekonomisi açısından önem taşımaktadır. Ülkemize ait kaynakları değerlendirmek ve kullanıma açmak için yaptığımız çalışmamız, aynı zamanda biyoteknoloji alanında da önemli bir bilgi birikimi sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Botanik Bilgiler

Boraginaceae familyasının *Arnebia* Forsk. cinsine dahil bir tür olan *Arnebia densiflora* Ledeb. Türkiye ve Yunanistan'da dağılım gösteren endemik bir bitkidir (1).

2.1.1. Boraginaceae Familyası

Çoğunlukla tek yıllık, iki yıllık, çok yıllık otlar, nadiren çalı veya ağaç formunda bitkilerdir. Yapraklar alternat, stipulsuz, basit, çoğunlukla sık (indumentum), kaba ve baticı (setos) tüy örtüsüne sahiptir. Çiçek durumunun uçta bulunan dalları kimoza, helizoid kimoza, ya da çiçek durumu nadiren dallanmış tirsusa benzemektedir. Kaliks birleşik 5 sepalli, uç kısımları serbest (5 lopluk) nadiren de 9 lopluk veya düzensiz dilsidir ve çoğu kez çiçek açma devresinden sonra genişlemektedir. Korolla 5 lopluk, aktinomorf (ışınsal) veya nadiren zigomorf (tek eksenli) dur, genellikle tüp kısmı belirgin ve uç kısımlar oldukça derin lopluktur. Korollanın boğaz kısmında 5 parçalı boğaz pulları veya çoğunlukla tüylerden oluşan bir kuşak bulunmakta (nektariferous) veya boğaz bölgesi pürüzsüz ve tüysüzdür. Boraginaceae familyasında korolla şeklinin değişik kombinasyonları belirtilmektedir (örneğin; klavat-kampanulat *Onosma* cinsinde veya silindirik-kampanulat; *Symphytum* cinsinde olduğu gibi). Stamen sayısı 5 adet olup petallere bitişik (epipetalus), korolla lopluklarıyla alması konumlandırılır. Ovaryum; üst durumlu, 4 (nadiren 2) lokuluslu (gözlü), stilus; ginobazik, nadiren terminal, genellikle bölünmemiş, stigma; bütün veya 2 (-4) lopluktur. Meyve genellikle 4 nutletli (findıksı), birleşme veya indirgenme sonucu nadiren daha az sayıda, 2 mantarimsı merikarptan oluşmuş ya da bir drupa meyvedir; nutletler (nukslar) yassı-piramit şeklinde torus (reseptakulum çiçek tablası) üzerinde meydana gelir. Bağlanma izi genişliği değişiktir ve dardan genişçe değişik boyutlardadır. Nutlet tabanı saplı veya sapsızdır, hafifçe horizontal olarak içe doğru kıvrık gaga benzeri bir uzantı vardır veya gagasızdır, karinalı veya karinasızdır, çoğu kez tabla ve kenara doğru farklılaşmıştır. Kenar kısmı bazen yayılan veya kıvrılan kanat içermektedir veya dikenli-çapa şeklinde tüylü (gloşitli) dir. Meyve yüzeyi pürüzsüz veya değişik süslerle donatılmıştır, tüysüz, tüylü veya gloşitli, küçük yumrular ve/veya dikenler bulunmaktadır (1).

2.1.2. *Arnebia* Forsk. cinsi

Tek yıllık ve çok yıllık olup, rizomlarından mor (erguvan) renkli boya elde edilen bu cinse dahil bitkilerin gövdesi basit ya da dallanmış, tüylü, dikenli veya kadifemsi tüylüdür. Çiçek durumu; çok yıllıklarda yoğun terminal baş şeklinde iken tek yıllıklarda gövdenin üst kısmındaki çok sayıda dalın ucunda bulunmaktadır. Salkımlar braktelidir. Kaliks derince ikiye bölünmüştür ve loblar lineardan lanseolata değişir. Huniye benzer şekilde olan korolla sarıdır, pulsuz ve kıvrımsız olan korolla boğazında halka bulunur ya da bulunmaz. Çiçekler hermafrodittir. Stamenler, bir halkada ya da düzensiz olarak farklı seviyelerde dizilmiştir. Stilus içe gömülü, düz veya bifite kadar dallanmış iki loplu bifittir. Stigma, iki loblu ya da iki eşit parçalıdır. Meyveler basık yumurtamsı ya da yarı küremsiden üçgenle değişen, dik, akuttan akuminata değişen gagalı ve ventral omurgalıdır.

Arnebia cinsinin Türkiye Florası'nda kayıtlı 5 türü vardır:

A. pulchra (Roemer ve Schultes) Edmondson

A. densiflora Ledeb.

A. purpurea S. Erik ve H. Sümbül

A. decumbens (Vent.) Cosson ve Kralik

A. linearifolia DC

2.1.3. *Arnebia* cinsinin tayin anahtarı (1)

Arnebia cinsinin Türkiye Florası'nda kayıtlı 5 türünün tayin anahtarı şu şekildedir (1, 20):

1. Çok yıllık; kalın odunsu kök; çiçek durumu tepede yoğun terminal bir baş şeklinde; korolla 20-45 mm, annulus yoktur

2. Korolla 20-24 mm, üst kısımda (lamina) yaşla birlikte kararır 5 siyahımsı noktalı; stamenler düzensizce değişik seviyelerde yerleşmiştir.....**1. pulchra**

2. Korolla 35-45 mm, üst kısımda noktalar yoktur; stamenler bir halkaya yerleşmiştir.....**2. densiflora**

2a. purpurea*

1. Tek yıllık; terminal ve lateral çiçek durumları sık değildir; korolla 15 mm'den azdır; annulus mevcuttur

3. Meyve döneminde kaliks 8-10 mm, loblar linear; gövde yoğun olarak sert kıllı (dikenli) veya değil; stigma 4 lobludur.....**3. decumbens**

3. Meyve döneminde kaliks 10-15 (-20) mm, loblar lanseolattan oblonga; gövde seyrek olarak sert kıllı (dikenli); tüysüz; az çok çıplaklaşan, stigma 2 lobludur..... 4. *linearifolia*

* Bu tür 1983 yılında S. Erik ve H. Sümbül tarafından bilime kazandırılmış ve *Flora of Turkey*'in 10. baskısında *A. densiflora*'dan sonra 2a numaralı tür olarak kodlanmıştır. *A. densiflora*'dan korolla renginin mor olması ile ayrılmaktadır (20, 21).

2.1.4. *Arnebia densiflora* Ledeb.

2.1.4.1. Sistematik bilgileri

- Regnum : Plantae
- Divisio : Spermatophyta (Phanerogamae)
- Subdivisio : Angiospermae
- Classis : Dicotyledonopsida (Magnoliopsida)
- Subclassis : Dicotyledoneae (Asteridae)
- Ordo : Lamiales (Polemoniales)
- Familia : Boraginaceae
- Genus : *Arnebia*
- Species : *Arnebia densiflora*

2.1.4.2. Genel özellikleri ve habitatu

Çok yıllık bir bitki olan *A. densiflora*, kalın odunsu gövdelidir. 25-40 cm uzunluğunda basit yapıdaki gövde, kadifemsi tüylü ve sert kıllıdır. Taban, petiyol tabanının kalıntısı ile örtülmüştür. Yapraklar, linear- lanseolattan linear eliptiğe değişir, kadife tüylüdür. Petiyol 4 cm, lamina 10-15, 0.8-1.3 cm'dir. Gövde yaprakları sapsızdır. Çiçek durumu yoğun, 6-12 cm çapında, çanak yapraklar (kaliks) çiçekte 15-20 mm iken meyvede, 30 mm ve tabana kadar bölünmüş durumdadır, dış bükey çıkıntılar yoktur, loblar küttür. Korollalar sarı ve 33-45 mm'dir. Tüp dış yüzeyde, ince tüylü ve 30-40 mm'dir, halka (annulus) yok ve kenar 12-16 mm çapında, noktasızdır. Stamenler halka şeklindedir. 4-5 mm olan meyveler, basık yumurtamsı şekilli, yeşilimsi kahverengi renkli, kabarcıklı-buruşuktur, alt yüzeyde bir çıkıntı bulunmaktadır. Çiçeklenme devresi Mayıs-Eylül ayları arasındadır ve 750-2600 m'ler arası batıya bakan sarp, kireçli kayalıklar, kayalık çıkıntılar, volkanik yüzeylerde

(Şekil 2.1) yetişir. Tip örneği 1836 yılında Nordmann tarafından Transkafkasya'dan toplanan örnek Leningrad Herbaryumu'nda bulunmaktadır (1).



Şekil 2.1. *Arnebia densiflora* bitkisinin görünümü ve habitatı

2.1.4.3. Türkiye'deki yayılışı

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu ile Flora of Turkey and East Aegean Island kitabındaki verilere dayanarak bitkinin Türkiye'deki yayılışı şu şekildedir (1):

A2: Bursa : Uludağ, 1844, Clementi

B1: Manisa : Kırkağaç Kavukdere civarı 750 m Peşmen 2161

B3 : Eskişehir : Kepen, Sivrihisar yanı, 950 m, Tchihatcheff 350 (GUE 2601)

B5 : Kayseri : Bakır Dağı'nın 22 km doğusunda, 2000 m, Hub.-Mor, 11028

B6 : Adana : Saimbeyli, Bozoğlan Dağı, Obruk Yaylası civarı 2100 m, D. 18742

B7 : Erzincan : Keşiş Dağı, Cimin civarı, 2500-2600 m, D. 31661

C4 : Konya : Ermenek, Hamitseydi Boğaz'dan Beşkuyu'ya 1700 m, D. 16246A

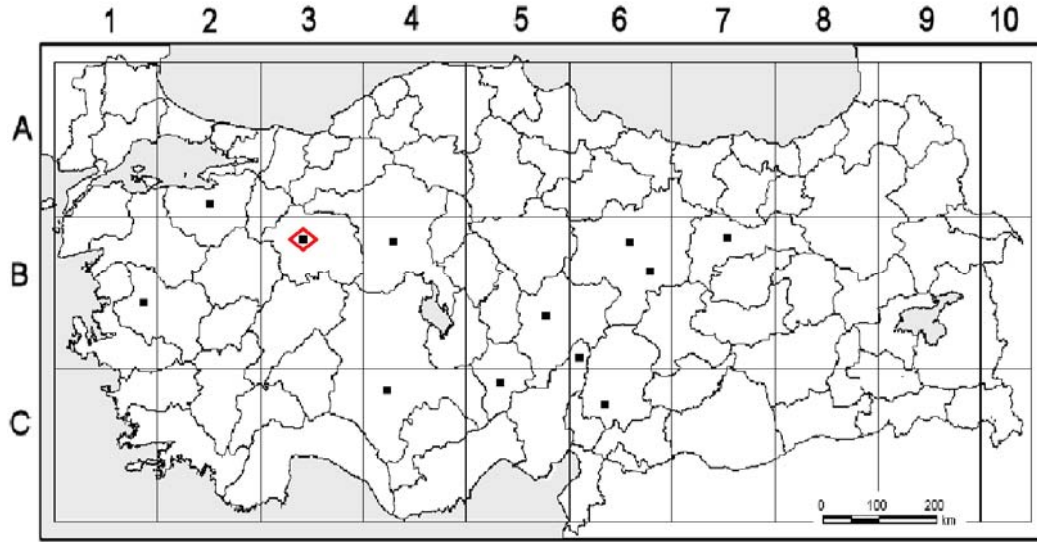
C5 : Niğde : Ala Dağ, Ulupınar Yaylası, 2000 m. Spitz 1975; 175

C6 : Maraş : Berit Dağı, 2135 m, 1865, Hausskn.

B4 : Ankara : Polatlı Topçu Okulu, Karaemin Tepe ve Eminarı Tepe civarı batıya bakan yamaçlarda 850 m (ANK)

B6 : Sivas : Şarkışla ilçesi yaylaları

B6 : Sivas : Sivas-Kangal karayolunda Kangal'a 8 km uzaklıktan 900 m



Şekil 2.2. *A. densiflora*'nın yayılışı (■) ve toplanma noktası (◆)

2.1.4.4. *A. densiflora*'nın sinonimleri ve yerel isimleri

Lithospermum densiflorum Ledeb. Ex Nordm.

Arnebia cephalotes (DC.)

Munbya cephalotes (DC.) Boiss.

Munbya densiflora (Nordm.) Boiss.

Munbya conglobata Boiss.

Macrotomia cephalotes (DC.) Boiss.

Arnebia macrothyrsa Stapf

A. densiflora Türkiye'de halk arasında enik otu (22), kızıl eyilik, eğnik (Sivas), eyilik otu, kırmızı kök, enlik veya havaciva (12) adlarıyla bilinmektedir.

2.1.4.5. *Arnebia densiflora*'nın kullanım alanları

Türkiye'de halk arasında *A. densiflora*'nın kök kabukları haricen yara iyileştirmede ve yanık

tedavisinde kullanılmaktadır. Kars, Iğdır yöresinde yapılan bir etnobotanik çalışmada *A. densiflora*'nın kök kabukları ve çam türlerinin odunlarının parçalanıp karıştırılarak tereyağ içerisinde pişirilmesi ile hazırlanan merhem yara iyileştirme ve yanık tedavisinde kullanıldığı kayıt edilmiştir (20).

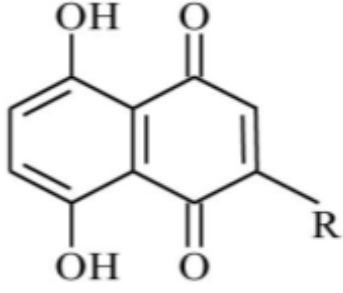
Malatya yöresinde de benzer şekilde *A. densiflora* kökleri ılık tereyağına batırılıp bir süre bekletilmekte, kökler çıkarıldıktan sonra tereyağının balmumu ile kıvamı arttırılmakta ve buna batırılan bezler yaraların üzerine sarılmaktadır (23).

2.2. *Arnebia* türlerinin kimyasal içeriği

2.2.1. Naftokinonlar

İçeriğinde naftokinon türevi bulunduran bitkiler Türkiye'de ve dünyada yüzyıllardır boyar madde olarak kullanılmaktadır. Boraginaceae naftokinonlarca zengin bir familyadır ve en fazla naftokinon içeren cinsleri; *Lithospermum*, *Echium*, *Onosma*, *Alkanna*, *Cynoglossum* ve *Arnebia*'dır. Boraginaceae köklerinden elde edilen ekstraktlar dokümacılığı takiben gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır. Şikonin ve türevlerinin, tıbbi önemlerinin yanı sıra geniş endüstriyel kullanım alanının bulunmasından dolayı, son yıllarda üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır.

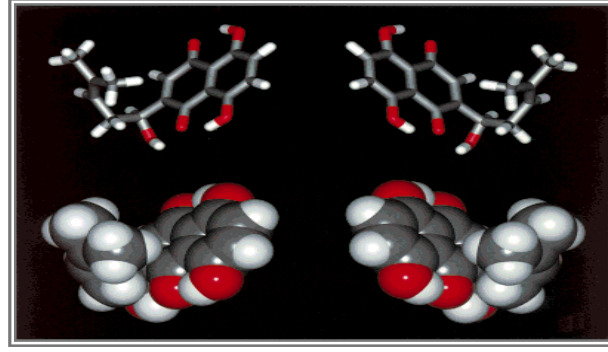
Arnebia cinsi üzerinde yapılan çalışmalarda kök kabuklarında alkannin-şikonin türevi naftokinonların major olarak buldukları saptanmıştır. Naftokinonlar; polarize ışığı çevirmeleri, yan zicirdeki hidroksil grubunun pozisyonu ve esterleşmiş hidroksil grubunun pozisyonu gibi özelliklere göre farklı isimler alırlar. Polarize ışığı çevirme durumlarına göre sola çevirenler (S)-alkannin ve sağa çevirenler (R)-şikonin olarak bilinmektedirler. Naftokinon iskeletine (Şekil 2.3) bağlı radikal grupların değişimine göre şikonin/alkannin ve türevleri meydana gelir.



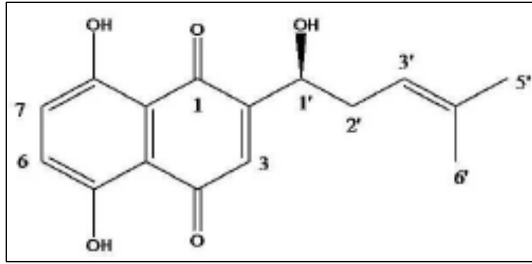
Şekil 2.3. Naftokinon iskeleti

2.2.2. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin genel özellikleri

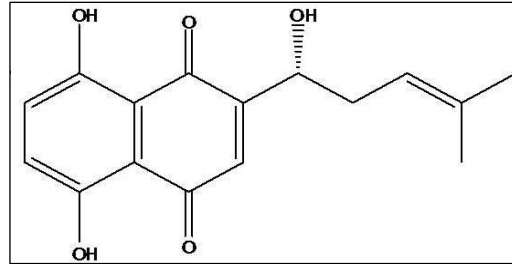
1,4 naftokinonlar, naftalen yapısı üzerinde 1 ve 4 pozisyonlarında iki keton yapısı içeren bileşiklerdir. Organik bileşiklerin bu sınıfı, 5,8-dihidroksi türevleri, hidroksinaftokinonlar olarak adlandırılmaktadır. Alkannin ve şikonin (A/S), hidroksinaftokinonların izohekzenilnaftazarin (IHN) türevleridir ve 2 numaralı karbondaki alifatik bir zincir taşırlar. İzohekzenilnaftazarinler olarak bilinen şikonin ve antipodu olan alkanninler $C_{16}H_{16}O_5$ formülüne sahiptirler. Kırmızı renkli ve lipofilik özelliktedirler (24).



a



b



c

Şekil 2.4.a. Alkannin ve şikoninin üç boyutlu yapısı **b.** Alkanninin **c.** Şikoninin moleküler yapısı (4)

2.2.2.1. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin kullanım alanları ve tarihi

Boraginaceae familyasına dahil bitkilerin kök ekstralarının yara, yanık, egzama ve hemoroid tedavilerinde kullanımı yüzyıllar öncesine dayanmaktadır (5, 2). Enantiyomerik yapıda naftokinonlar olan alkannin ve şikonin üzerine yapılan araştırmalar, Avrupa'da ve doğuda birbirlerinden bağımsız olarak aynı yönde ilerleyerek 20. yüzyılda birleşmişlerdir (25).

Avrupa'da *S* enantiyomer olan alkanninin, İngilizcede alkanet olarak bilinen *Alkanna tinctoria* Tausch bitkisinin köklerindeki koyu kırmızı pigmentlerin ana bileşeni olduğu bulunmuştur (25). *R* enantiyomer olan şikoninin hikâyesi ise ilk olarak Çin olmak üzere Doğu'da başlamıştır. Bu maddenin, Çin'de *tzu ts'ao*, *tzu-ken* (mor kök) ve *hung-tzu ken* (kırmızımsı-mor kök) gibi çeşitli isimler ile anılan *L. erythrorhizon* bitkisinin köklerinden elde edilen kırmızı pigment ekstralarının başlıca bileşenini oluşturduğu bulunmuştur. Alkanninin, M.Ö. kumaş boyası olarak kullanıldığı belirlenmiştir. *Alkanna tinctoria* köklerinin, ülser tedavisinde kullanımına dair ilk kayıtlara, Yunan doktor ve filozof

Hipokrat'ın (M.Ö. 4. ve 5. yüzyıllar) çalışmalarında rastlanmıştır. Botanik araştırmacısı Theophrastus (M.Ö. 3. ve 4. yüzyıllar) boya ve ilaç uygulamalarından söz etmiştir (26).

Farmakognozinin kurucusu olduğu düşünülen Dioscorides, M.S. 77 yıllarında *De Materia Medica*' da ayrıntılı olarak *Anchusa altera*'nın özelliklerini tanımlamış ve "*sanki içlerinde kan varmış gibi kırmızı, olağanüstü özelliklere sahip, yapraklarını yiyen içen veya uğraşanları sanki büyük zehirli bir hayvan özellikle engerek ısırması gibi zehirler. Çiğneyeni veya ağzına atanı zehirli bir hayvan ısırması gibi öldürür*" gibi ifadeler kullanmıştır. Dioscorides'in bu karmaşık anlatımından sonra, daha açık bir şekilde diğer araştırmacılar tarafından *A. tinctoria*'nın yara iyi edici etkileri bildirilmiştir. Dioscorides'le aynı dönemde yaşamış olan Pliny de, ondan bağımsız olarak *A. tinctoria*'nın tıbbi özellikleri için benzer iddialarda bulunarak "*O, elleri kanın renginde boyar, o yünleri zengin renklerde boyamak için kullanılır. O, ülserleşmiş özellikle de yaşlı yaraları iyileştirir. O, yanıkların tedavi edilmesinde de kullanılır*" şeklinde söz etmiştir. M.S. 17. yüzyılda yaşamış olan İngiliz hekim ve astrolog Nicolas Culpeper, alkanetin ülser, enflamasyon ve yanıkların tedavisine yardımcı olduğunu bildirmiştir (26).

Papageorgiou (1978), *A. tinctoria* kök ekstraktlarının yara iyileştirici ve antimikrobiyal özelliklerini doğrulayan araştırma sonuçlarını açıklamış ve aktif bileşikler olarak ilk kez alkannin esterlerini tanımlamıştır (3).

Şikoninin ipek boyası olarak kullanılması, alkanninin Avrupa'da kullanımı kadar eskilere dayanmaktadır. Şikoninin geleneksel Çin tıbbındaki uygulamaları, antiseptik ve antienflamatuvar pomada benzer şekilde ham ilaç olarak ilk kez kullananlar arasında olduğu düşünülen büyük cerrah *Hua To* (M.S. 136-141) ile başlamış, M.S. 1596'da yazılan ve Çin geleneksel tıbbının klasik derlemesi olan *Pen Ts'ao Kang Mu*'nın kapsamına da girmiştir. *L. erythrorhizon* kökleri için iddia edilen tedavi edici etkiler, yanık, anal ülser, hemoroitler, enfekte kabuklu yaralar, yatak yarası, dış yaralar ve sulu dermatitleri içermektedir. Eski birçok bitkisel metinde, *L. erythrorhizon* köklerinin tıbbi özellikleri, *A. tinctoria* için iddia edilen tıbbi özelliklerle belirgin olarak benzerdir. Şikonin ve türevlerini içeren farklı preparatlar, tıbbi amaçlarla Çin, Japonya ve Kore'de bugün halen kullanılmaktadır (26).

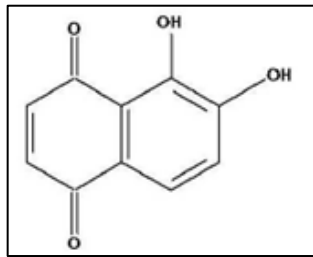
Alkannin, şikonin ve türevlerinin Japonya'da kozmetolojide ve renklendirici olarak kullanımı bulunurken, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da alkanninden gıda boyamada ve kozmetikte yararlanılmaktadır. Alkanninin Merck indekste astrenjan (damar büzücü veya kanamayı durdurucu) olarak kaydı bulunmaktadır (26).

Eski çağlardan beri *A. tinctoria* ve *L. erythrorhizon*'nun kullanımının bilimsel bir temele dayandığı, bu bitkilerin aktif komponentleri olan alkannin, şikonin ve türevleri üzerinde son 35 yıldır yapılan biyolojik aktivite araştırmaları aracılığıyla da ortaya konulmuştur (25).

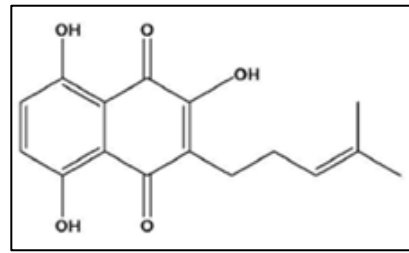
Alkannin ve şikonin kiral çiftinin, başta yara iyileştirici olmak üzere antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, radikal süpürücü ve antitrombotik aktiviteleri ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur (4, 27).

2.2.2.2. Şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin tanımlanması

Şikonin ilk kez 1922 yılında, Majima ve Kuroda tarafından, *L. erythrorhizon*'un köklerinden asetil esteri olarak izole edilmiş, kimyasal özelliklerinin birçoğu saptanmış, bilinen naftazarin bileşikleriyle olan fiziksel ve kimyasal benzerlikleri belirlenmiş ve Şekil 2.5.b'deki yapı önerilmiştir (25, 26). Ancak, bu araştırmacılar naftazarinlerin yapısını, 5,6-dihidroksi-1,4-naftokinon (Şekil 2.5.a) olarak yanlış tayin etmişler ve şikoninin optikçe aktifliğini belirleme konusunda başarısız olmuşlardır.



a



b

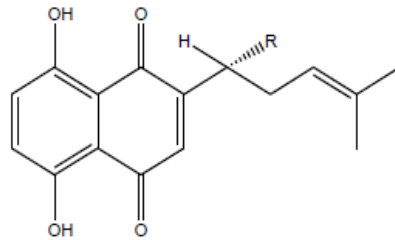
Şekil 2.5. Naftazarin (a) ve şikoninlerin (b) ilk ve yanlış olarak belirlendiği molekül yapıları (25)

Brockmann 1935 yılında naftazarinlerin yapısını 5,8-dihidroksi-1,4-naftokinon olarak düzelttikten sonra, alkannin (Şekil 2.4.b) ve şikoninin (Şekil 2.4.c) birbirlerinin enantiyomeri (birbirinin, üst üste çakışmayan ayna görüntüleri olan optik izomerlerden her biri) olduklarını ilk kez belirlemiş, yapılarını doğru biçimde tanımlamıştır. Brockmann, *L. erythrorhizon* köklerinde bir miktar rasemik bileşik (optikçe aktiflik gösteren bir bileşiğin sola ve sağa çeviren enantiyomerlerinin karışımı) için şikalkin terimini kullanmıştır (25).

Boraginaceae familyasındaki cinslerin hem alkannin hem şikonin türevlerini taşıdığı bilinmekle birlikte, daha önce yapılan araştırmalarda özellikle Avrupa ve Türkiye'deki örneklerin alkannin, Doğu'daki ülkelere ait örneklerin ise şikonin taşıdıkları belirtilmiştir (28, 29). Yüzbaşıoğlu'nun 2010 yılında *Arnebia purpurea* ekstrelerinden elde ettiği maddelerin optikçe çevirme açılarını belirlediği çalışması da bu çalışmalarını destekler niteliktedir (20). Yeşilada ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları araştırmada ise Anadolu'da yetişen Boraginaceae türlerinde de şikonin bulunduğu belirtilmiştir (12).

Arnebia türlerinde belirlenen şikonin ve alkannin türevi naftokinonların isimleri ve kimyasal yapıları Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

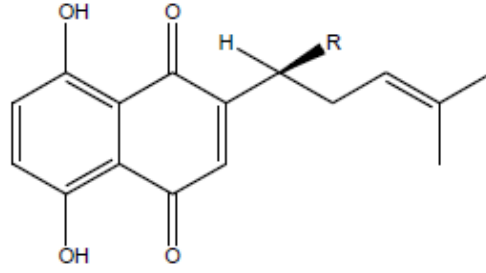
Çizelge 2.1. *Arnebia* türlerinde belirlenen şikonin türevi naftokinonlar (22, 20)



Bileşik	R- grubu	Bitkiler
Şikonin (İzoarnebin 4)	- OH	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. tinctoria</i>

Deoksişikoinin (Arnebin 7)	- H	<i>A. benthamii</i> , <i>A. decumbens</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>
Asetilşikoinin	- OCOCH ₃	<i>A. benthamii</i> , <i>A. decumbens</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i>
İzobütilşikoinin	- OCOCH(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>
β,β-Dimetilakrilşikoinin (izoarnebin 1)	- OCOCH=C(CH ₃) ₂	<i>A. benthamii</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. nobilis</i>
İzovalerilşikoinin	- OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>
α –Metil-n-bütilşikoinin	- OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>
β-Hidroksiizovalerilşikoinin	- OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i>
Terakrilşikoinin	- OCOCH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i>
β-Asetoksiizovalerilşikoinin	- OCOCH ₂ C(CH ₃) ₂ OCOCH ₃	<i>A. benthamii</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i>
Propionilşikoinin	- OCOC ₂ H ₅	<i>A. euchroma</i>

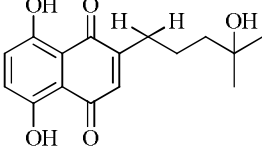
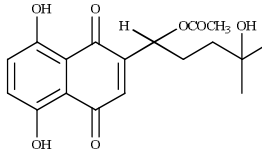
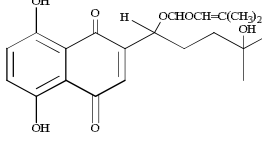
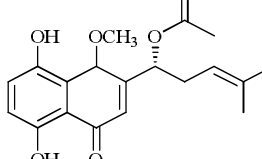
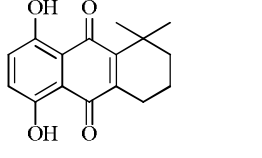
Çizelge 2.2. *Arnebia* türlerinde belirlenen alkannin türevi naftokinonlar



Bileşik	R- grubu	Bitkiler
Alkannin (Arnebin 4)	- OH	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i> , <i>A. tinctoria</i>
Deoksialkannin	- H	<i>A. benthamii</i> , <i>A. decumbens</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>
Asetilalkannin (Arnebin 3)	- OCOCH ₃	<i>A. benthamii</i> <i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>
İzobutilalkannin	- OCOCH(CH ₃) ₂	<i>A. densiflora</i>
β,β-Dimetilakrilalkannin (Arnebin 1)	- OCOCH=C(CH ₃) ₂	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>

İzovalerilalkannin	- OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i> , <i>A. hispidissima</i> , <i>A. tinctoria</i>
α-Metil- <i>n</i> -butil alkannin	OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	<i>A. densiflora</i> , <i>A. euchroma</i>
β-Hidroksiizovaleril alkannin	$\begin{array}{c} \text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	<i>A. euchroma</i> , <i>A. guttata</i> , <i>A. hispidissima</i>
Terakrilalkannin	OCOCH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	<i>A. densiflora</i>
β –Asetiloksiizovaleril alkannin	$\begin{array}{c} \text{OCOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{OCOCH}_3 \end{array}$	<i>A. euchroma</i> <i>A. guttata</i>
İzobutilalkannin	OCOCH(CH ₃) ₂	<i>A. densiflora</i>
2',3'-Epoksialkannin	OCOCHOCHCH ₃	<i>A. densiflora</i>
(RS)-Şikalkin	-OH	<i>A. hispidissima</i>

Çizelge 2.3. *Arnebia* türlerinde belirlenen diğer naftokinonlar

Bileşik	Molekül formülü		Bitkiler
Arnebin 5 (Hidroksialkannin) 5, 8 -dihidroksi- 2 -(4'- hidroksi- 4'-metilpentil) 1, 4 -naftokinon	$C_{16}H_{18}O_5$		<i>A.euchroma</i> , <i>A.hispidissima</i> , <i>A. nobilis</i>
Arnebin 6 (Asetilhidroksialkannin) 5, 8 -dihidroksi- 2 -(1 - asetoksi- 4' -hidroksi - 4- metilpentil)- 1, 4 -naftokinon	$C_{18}H_{20}O_7$		<i>A. benthamii</i> , <i>A.euchroma</i> , <i>A.hispidissima</i> , <i>A.nobilis</i>
Arnebin 2 (β,β- dimetilakrilhidroksialkannin) 5, 8 -dihidroksi- 2 -(1 - asetoksi- 4' -hidroksi - 4- metilpentil) - 1, 4 -naftokinon	$C_{21}H_{24}O_7$		<i>A.euchroma</i> , <i>A. nobilis</i>
1-Metoksiasetilşikonin 5, 8 -dihidroksi- 1 - metoksi- 4' -okzo-1, 4- dihidronaftalen-2-il)-4- metilpen-3-enil asetat	$C_{19}H_{22}O_6$		<i>A.euchroma</i>
Sikloarnebin 7 5, 8 -dihidroksi- 1,1-dimetil- 1,2,3,4-tetrahidroantrasen- 9,10-dion	$C_{16}H_{16}O_4$		<i>A. hispidissima</i>

Arnebia türlerinde naftokinonlar dışında benzokinonlar, hidrokarbonlar, alkaloidler, diterpenler, triterpenler, steroidler, flavonoidler ile fenolik asit ve türevlerinin de bulunduğunu tespit edilmiştir (20).

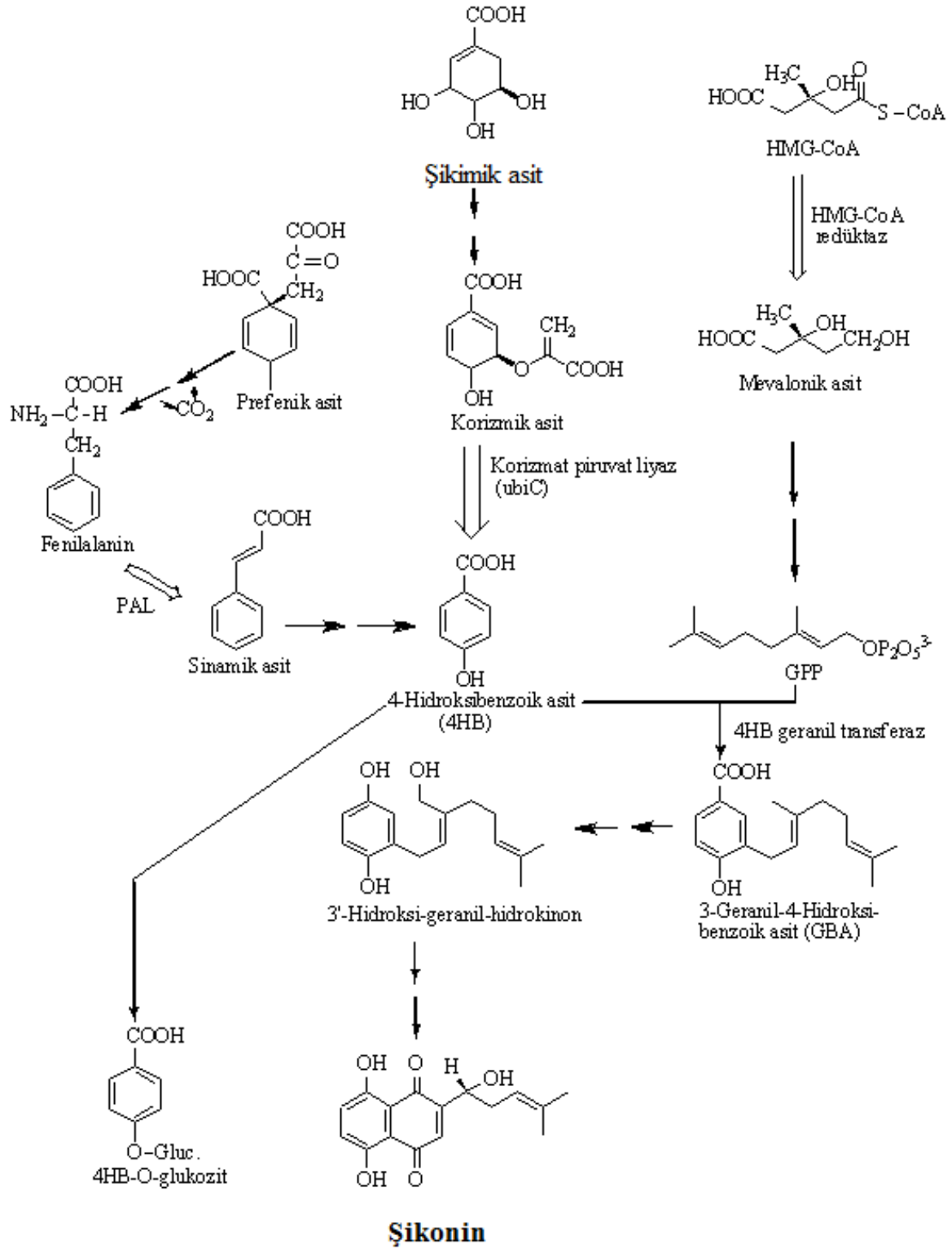
2.2.2.3. Şikonin ve türevlerinin biyosentez yolu

Şikonin biyosentezi, son yıllarda hızla artış gösteren doku kültürü yolu ile naftokinon üretimi çalışmalarının da katkısıyla açıklanabilmektedir (25, 30, 31). Şikonin biyosentezinin erken safhaları hakkında bilinenler, daha ileri safhaları hakkında bilinenlerden daha fazladır.

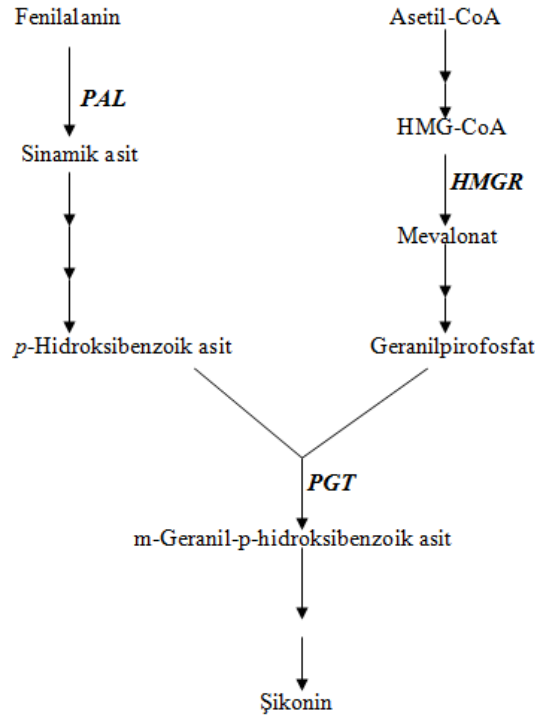
Şikonin biyosentezinde 4-hidroksibenzoik asit (4HB=PHB) ve geranil pirofosfat (GPP)'in iki önemli anahtar öncü bileşikler oldukları ve bu bileşiklerin, m-geranil PHB elde etmek için PHB geraniltransferaz enzim aracılıklı bir reaksiyonda birleşerek 3-geranil-4-hidroksibenzoik asit (GBA) elde edildiği saptanmıştır (31, 32) (Şekil 2.6, 2.7).

PHB; fenilpropanoit metabolitlerinden şekillenirken, GPP'de asetil-CoA'dan başlayan ve mevalonik asit yoluyla ilerleyen iyi tanımlanmış izoprenoit yolağından türevlenmiştir (33). Başlangıçta, şikimik asitten türevlenen ve fenilpropanoid yolağında kilit bileşik olan L-fenilalanin, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimi tarafından PHB öncüsü olan trans-sinamik asite sonrasında ise PHB'e dönüşmüştür. Mevalonat yolağından gelen geranil pirofosfat ile PHB'in, PHB-geraniltransferaz tarafından oluşturulan bağlantısı ile de şikoninlerin biyosentezine yol açılmıştır (34) (Şekil 2.6).

Şikonin biyosentezinde aracı olan PHB, ubikinonlar ve vitamin E gibi birçok metabolit için bir biyosentetik ara bileşiktir (25).



Şekil 2.6. Şikinin biyosentez yolunun ayrıntılı olarak gösterimi (32)



Şekil 2.7. Ana hatları ile şikonin biyosentez yolağı (35) (*PAL* : Fenilalanin amonyum liyaz, *HMGR*: 3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz, *PGT*: *p*-Hidroksibenzoik asit meta-geraniltransferaz)

L. erythrorhizon süspansiyon kültürlerinde radyoaktif karbon izotopu ile işaretli *L*-fenilalaninin uygulaması yapılan bir çalışmada, deoksişikonicin aracılığıyla şikonin biyosentezinin gerçekleştiği belirlenmiştir (36). *L*-fenilalaninin eklene ortamlarda şikonin türevlerinin miktarının kademeli olarak arttığını deoksişikonicin miktarının ise azaldığını belirtmişlerdir. İşaretli deoksişikonicinin; hücre dışı ekstraktlarda inkübe edildiğinde asetilşikonicine dönüşümü tespit edilirken, hücre kültürü ortamına eklendiğinde de asetil ve β -hidroksiizovalerilşikonicine dönüşümü belirlenmiştir. Kültürdeki hücrelerde ve hücre içermeyen ekstraktlarda; deoksişikonicinden C-1 pozisyonunda ve yan zincirde hidrosilasyon ve esterleşme ile şikonin biyosentezinin gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma ile şikimik asit, *L*-fenilalanin, sinamik asit, *m*-geranil PHB, *m*-geranilhidrokinon ve mevalonik asitin de araçlar oldukları ve deoksişikonicinin şikonin biyosentezinin öncüsü olduğu gösterilmiştir. *m*-geranilhidrokinon üretiminden şikonine kadar olan basamakların doğrudan kanıtı bulunmamaktadır.

Beyaz ışığa maruz bırakılan *L. erythrorhizon* hücre kültürlerinde PHB geraniltransferaz enzimi baskılanarak şikonin üretimini durdurduğu belirtilmiştir (37). PHB geraniltransferaz

enziminin *L. erythrorhizon* hücre ekstrelerinden izole edilerek özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (38, 39).

Tabata vd. çalışmalarında öncelikle İndol asetik asit (IAA)'li ortamda ve karanlıkta pigment oluşumundaki artışı (1974), devam eden çalışmalarında ise şikonin biyosentezinin fenilalaninden başlayıp ışık ve oksin tarafından kontrol edildiğini (1993) belirlemişlerdir (14, 40). Süspansiyon kültürlerinde mavi ışığın şikonin biyosentezi esnasında birçok oksidasyon sürecini kontrol eden flavin mononükleotid (FMN)'in yıkılmasına sebep olarak, beyaz ışığın ise sentezde anahtar rol oynayan ρ -hidroksibenzoik asit geraniltransferaz (PGT) enzimini inhibe ederek pigment oluşumunu engellediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada biyosentezin, FMN'in fotodegradasyonu yoluyla ışık tarafından engellenebileceği ve şikonin ile sonuçlanan oksidasyon sürecinin bir veya daha fazlası için bir kofaktörün gerektiği önerilmiştir. Bu durumun desteği olarak FMN fotodegradasyon ürünü olan lumiflavinin, şikonin biyosentezini engellediği gösterilmiş ve bu PHB geraniltransferazın bozulmasına çok benzemektedir (40). PHB geraniltransferaz *L. erythrorhizon* hücrelerinin mikrozomal kısmında lokalize olmuş ve endoplazmik retikulumdan türevlenen özelleşmiş vezikül membranları içermektedir (41).

Heide ve Berger (1989), *L. erythrorhizon* hücre kültüründen geranil pirofosfat (GPP) saflaştırılması üzerinde durarak enziminin özellikleri üzerinde çalışmışlardır (37). Burada, GPP'nin substrat olarak dimetilalil pirofosfat ve izopentenil pirofosfat kullanılan enzimatik reaksiyonun tek ürünü olduğu görülmüştür. Birbirini takip eden yöntemlerle saflaştırılan prenilttransferaz enziminin fizyolojik rolünün muhtemelen şikonin biyosentezi için GPP temin etmek olduğu belirtilmiştir.

Hücre kültürlerinde ürün verimini arttırmanın bir yolu da biyosentez yolunda iş gören genlerin ekspresyonunun çeşitli yollarla arttırılması ve düzenlenmesidir. Şikonin biyosentezinde iş gören enzimlerin kodlandığı PAL, PGT ve HMGR genlerinin ekspresyonunun nitrik oksit ile önemli miktarda arttığı Wu vd. (2009) tarafından gösterilmiştir (35). Nitrik oksit biyosentezinin *Rhizoctania cerealis*'in elisitör olarak uygulanmasıyla uyarıldığı ve buna bağlı olarak da şikonin üretiminin arttığı gözlenirken, kültür ortamına nitrik oksit biyosentezini inhibe edici sodyum nitroprusid eklendiğinde de şikonin oluşumunun azaldığı gözlenmiştir.

L. erythrorhizon iki aşamalı kültüründeki büyüme ortamına biyosentetik enzimlerden PAL ve HMGR'ın aktarılmasıyla hücrelerdeki aktiviteleri ölçülmüştür. Azot kaynağının (NO₃) tükenme noktasına yakın, şikonin türevlerinin üretimi başladığı gibi bu iki enzimin de geçici bir artış gösterdikleri bulunmuştur. Bu artış PAL için üç-dört kat olurken, HMGR'de iki-dört kat olarak belirlenmiştir. Nitrat tükenmesinden kısa bir süre önce (6.-8. günler) ortama nitrat eklenmesi ile son ürün verimi önemli derecede (% 70-80 kadar) azalırken, daha sonraki sabit büyüme aşamasında (14.-16. günler) nitrat ilavesi ile önemli bir etki görülmemiştir. Şikonin türevlerinin üretim hızının PAL aktivitesi ile ilişkili olduğuna dikkat çekilerek, PAL aktivitesi düşük seviyelerde olduğunda üretim hızının da çok düşük olduğu gözlenmiştir. PAL aktivitesinin eşik düzeyine ulaşmasıyla birlikte, şikonin türevlerinin biyosentez hızı da artmıştır. Böyle bir ilişki HMGR aktivitesi ile çıkarılamamıştır. Buradan, PAL aktivitesinin düşük olduğu fenilalaninin deaminasyon aşamasında şikonin türevlerinin üretiminin sınırlandırılabilirdiği sonucuna varılmıştır (42).

Srinivasan ve Ryu (1993), *L. erythrorhizon* kültürlerinde karbon ve nitrojen besleme stratejileri ile şikonin üretiminin geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır (43). *Agrobacterium tumefaciens* transforme edilen *L. erythrorhizon* hücre süspansiyon kültürlerinde, sakaroz zengin (C-zengin) ortamın eklenmesiyle şikonin türevlerinin birikiminde 2-3-kat artış, çözünür fenoliklerin seviyesinde ise 3-3.5 kat artış gösterirken, hücre konsantrasyonunda % 10-30 oranında ortalama bir artış gözlenmiştir. Nitrat-zengini ortam ilavesi ile (N-zengin) biyokütle konsantrasyonunda % 25-35 artışa neden olunurken, şikonin üretiminde ise sadece % 2-9'luk bir artış ve çözünebilir fenolik veriminde de yaklaşık % 3 artış belirlenmiştir. C-zengin ortamın tekrarlanan eklemeleriyle ilk uygulamadan sonra elde edilen seviyelerin üzerine % 10'dan daha az olacak şekilde şikonin üretimi gerçekleşmiştir. Bu çalışmada, N-zengin ve C-zengin ortamların sekonder metabolit üretimini hızlandırmada etkili bir strateji olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Gaïsser ve Heide (1996), *L. erythrorhizon* hücre süspansiyon kültürlerinde şikonin biyosentezinin düzenlenmesinde ve inhibisyonunda etkili olan çeşitli faktörler (mavi ve beyaz ışık, metil jasmonat, mevinolin ve arsenat) üzerinde araştırma yapmışlardır. Çalışmada, mavi ve beyaz ışığın, 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG-CoA redüktaz) ve PAL *in vivo* inhibitörlerinin ve efektör olarak da metil jasmonat ile arsenatın etkileri altında asetilşikonin, p-hidroksibenzoik asit-O-glukozit (PHB-GLc)'in ve rozmarinik asitin (RA) birikimleri araştırılmıştır. p-hidroksibenzoat geraniltransferaz, p-

hidroksibenzoat O-glukoziltransferaz ve HMG-CoA redüktazın faaliyetleri test edilmiştir. PAL inhibitörü olan 2-aminoindan-2-fosfonik asitin; asetilşikinin, PHB-GLc ve RA oluşumunu tamamen baskıladığı, HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan mevinolinin asetilşikinin oluşumunu engellediği ve PHB-GLc oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. p-hidroksibenzoat-O-glukoziltransferazın aktivitesinin, PHB'nin hücre içi konsantrasyonu tarafından değil tamamen ışık tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. Glukoziltransferazın aktivitesinin indüklenmesinde beyaz ışığın mavi ışıktan daha etkili olduğu, PHB geraniltransferaz aktivitesinin ise mavi ışık tarafından baskılandığı belirtilmiştir. HMG-CoA redüktaz aktivitesi ile asetilşikinin üretiminin birbirleri ile ilişkili olduğu ve bu durumun HMG-CoA redüktazın şikonin biyosentezinin izopren kısmında düzenleyici rolünün bulunması ile ilişkilendirilmiştir (30).

Lange vd. (1998), *L. erythrorhizon* süspansiyon kültürlerinin şikonin biyosentezinde mikrozomal 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz enziminin düzenleyici etkisini incelemişlerdir. Kültürde üretilen şikoninin karbon iskeletinin kısmi olarak izoprenoit biyosentetik yolağından olduğu belirtilmiştir. Şikonin sentezi için izoprenoidlerde mevalonat yolunun anahtar enzimi olan HMGR'nin gerekliliği incelenmiştir. Yapılan PCR ve Northern analizleri sonucunda mikrozomal HMGR enzim aktivitesi ile birlikte mRNA düzeyinin şikonin türevlerinin birikiminde yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Beyaz ışığın, şikonin oluşumunu engellerken HMGR gen ifadesini de güçlü bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Burada şikonin biyosentezinin düzenlenmesinde HMGR'nin önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (44).

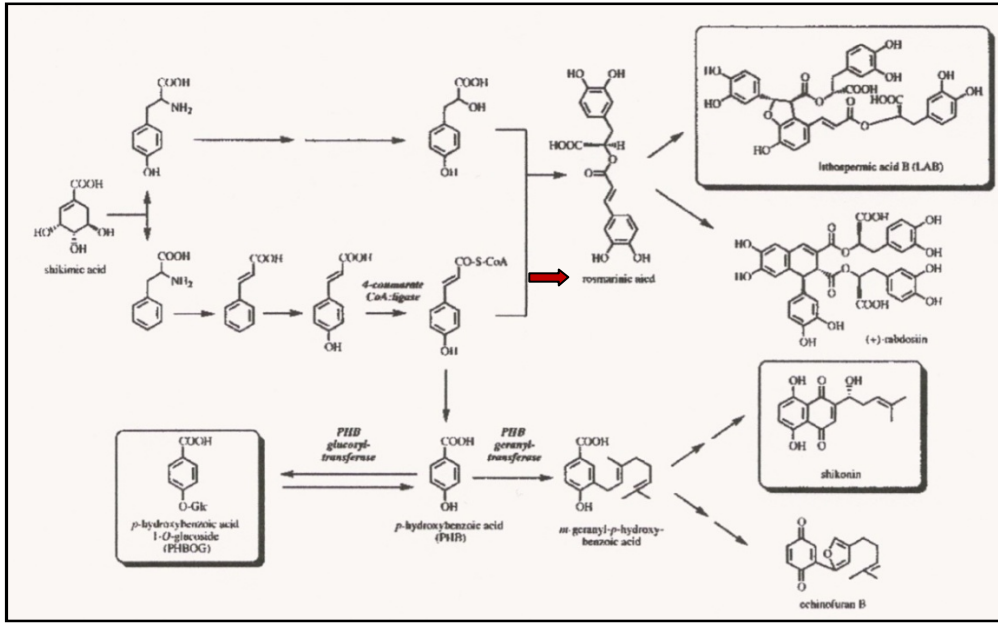
Mühlenweg vd. (1998), *L. erythrorhizon* süspansiyon kültürlerinde şikoninin biyosentezinde düzenleyici bir enzim olan Geranildifosfat: 4-hidroksibenzoat 3-geraniltransferaz enziminin saflaştırılması üzerine çalışmışlardır. LS ortamına metil jasmonat ilavesi ile bu enzimin aktivitesinin 200'den fazla kat artabileceği belirtilmiştir ve bu ortam enzimin çözünürlüğü ve saflaştırılmasında kullanılmıştır (45).

Biyosentetik yolda, şikoninin öncüsü olan PHB, *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerine bakteriyel UbiC geninin transformasyonu ile modifiye edilmiştir. Bu gen *Escherichia coli*'de normalde bitkilerde mevcut olmayan korizmat piruvat-liyaz (CPL) enzimini kodlar. Bu yapı *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile *L. erythrorhizon*'a girmiş ve saçak kök kültürlerinde yüksek CPL aktivitesi göstermiştir. Şikonin biyosentezi için CPL

reaksiyonu ile PHB üretimi sağlanabildiği gibi PAL inhibitörü olan 2-aminoindan 2 fosfonik asit ile PHB için doğal yolağın in vivo inhibisyon etkisi gözlenmiştir. UbiC geninin transformasyonu, şikonin oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmazken aromatik amino asit metabolizması ile ilgili bir nitril glikozit olan menisdaurin miktarında 5 kat artış belirlenmiştir (46).

Boehm vd. (2000), *L. erythrorhizon* 'da bakteriyel ubiA geninin ekspresyonu üzerinde çalışarak şikonin biyosentezinde genetik mühendisliği yaklaşımı üzerinde durmuşlardır. *A. rhizogenes*-aracılığıyla *L. erythrorhizon*'a bakteriyel ubiA geninin transformasyonu ile *L. erythrorhizon* 'da şikonin biyosentezinin manipülasyonu araştırılmıştır. Bu gen *Escherichia coli* 'de ubikinon biyosentezinde anahtar bir adımı katalizleyen ve zara bağlı olarak bulunan bir enzim olan PHB-3-polipreniltransferaz'ı kodlamaktadır. Substrat olarak geranil difosfat (GPP) kullanılması ile şikonin biyosentezinde temel adım olan GBA oluşumu katalizlenebilmektedir. Saçak kök hücre hatlarında yüksek UbiA enzim aktivitesi sağlanmış ve GBA miktarında artış ile birlikte şikonin üretimi kontrole göre % 22 artış göstermiştir. Burada şikonin miktarının artışı ile UbiA enzim aktivitesi arasında önemli bir korelasyon görülmemiştir. Şikonin oluşumunun artırılmasında yalnızca UbiA'nın overekspresyonu yeterli olmadığı yolağın düzenlenmesinde diğer enzimlerin de önemli iş gördüğü kanısına varılmıştır (13).

Antiviral, antibakteriyel, ateş düşürücü ve antialerjik aktiviteleri ile tıbbi değeri bulunan bir sekonder metabolit olan rozmarinik asitin *L. erythrorhizon* süspansiyon kültürlerinde şikonin üretmeyen hücrelerde fenilpropanoid yolu ile sentezlendiğine dair araştırmalar bulunmaktadır (47, 48). Nitekim şikonin biyosentez yolağında da rozmarinik asitin bulunduğu görülmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Şikonin biyosentez yolağında rosmarinik asidin yeri (49)

2.3. Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimi Çalışmaları

2.3.1. Sekonder metabolitlerin tanımı

Primer metabolitler olan protein, karbonhidrat ve yağlar besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşırlar. Sekonder metabolitler olan glikozitler (fenolikler, siyanojenikler, flavonoitler, antrakionlar, antosiyaninler, kumarinler, kardiyotonikler, saponinler) diğer triterpenik ve steroidal bileşikler, terpenler, alkaloitler, naftokinonlar, mumlar, reçineler, balsamlar ise organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gereklilik taşımamaktadır.

Organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş yollar tarafından üretilen sekonder metabolitler, başta ilaç olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirâi mücadele sektörlerinde yaygın olarak kullanılırlar.

Sekonder metabolitler bitkilerde;

- Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi değişik çevresel etmenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma,
- Herbivorlara karşı savunma
- Mikroorganizmalara (bakteriler, virüsler, mantarlar vb.) karşı savunma

- Polinasyonu ve tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbettirme
- Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevleri yerine getiren doğal ürünlerdir (50).

Bitkiler doğal yaşamlarında patojen ataklarına karşı savunma amaçlı olarak sekonder metabolit üretirler. Bitkilerin patojenin kendisine verdiği yanıt ile bazı patojen orijinli bileşiklere yani elisitörlere karşı verdiği yanıtın aynı olduğu bulunmuştur. Elisitörler sekonder metabolitlerin üretilmesine neden olan bir tür sinyaldir. Sekonder metabolit yolu, strese bir cevap olarak gelişir. Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırmak, aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda üretimi kısa sürede sağlamak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörler kullanılır. Fungal, bakteriyel polisakkaritler, glikoproteinler, inaktif enzimler ve maya kaynaklı biyotik elisitörler ile, saflaştırılmış kurdan (bir tür polimer), ksantan ve kitosan, ağır metal tuzları gibi abiyotik elisitörler, çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmaktadır (51, 52).

2.3.2. Bitki doku kültürü

Bitki doku ve hücre kültürü, bitkilerin doku (apikal meristem, mezofil vb.), organ (kök, gövde, yaprak), hücre (meristematik hücreler, kallus hücreleri) ve hücre kısımlarının bitkiden ayrılarak steril koşullarda (aseptik) yapay besin ortamları üzerinde *in vitro* olarak yetiştirilmesiyle yeni bitkilerin yani klonların ya da bitkisel ürünlerin (primer ve sekonder metabolitler) elde edilmesidir.

2.3.2.1. Kallus ve süspansiyon kültürü

Kök, gövde, apikal meristem, kotiledon, yaprak gibi organ ve dokularından alınan küçük parçaların (eksplant), yara dokusu olan kallusları oluşturmak için besin ortamlarına ekilmesiyle yapılan yöntemdir.

Kallus kültürlerinde üretilen madde miktarları, büyüme düzenleyici, uyarıcı veya öncü maddelerin katılması ve besin düzenlemeleri ile normal bitkidekilere göre arttırılabilmekte ve sekonder metabolit üretiminde kullanılabilir.

Süspansiyon kültürleri ise üretilen kallusların sıvı besin ortamına geçirildiği ve inkübasyonun çalkalamayla yapıldığı kültür tipidir. Bu şekilde hücrelerin sıvı ortamda serbest şekilde gelişebilmeleri sağlanmaktadır. Bu yöntem özellikle ekstrasellüler bileşiklerin üretiminde kullanılır. İstenen madde ekstrasellüler değilse üreyen ve inkübasyon sonunda gelişen hücreler mekanik, kimyasal veya enzimatik olarak parçalanır ve madde elde edilir. Süspansiyon kültürüne geçmek için stabil ve optimize edilmiş kallus kültürleri kullanılır. Elde edilen kalluslar cam erlenmayerler içindeki sıvı ortama aşılır ve orbital çalkalamalı inkübatörlerde geliştirilirler. Başarı sağlandıktan sonraki aşama ise süspansiyonları spesifik biyoreaktörlere transfer etmektir (53).

2.3.2.2. Bitki doku kültüründe kullanılan besin ortamları

Doku kültüründe işlemlere başlarken verilmesi gereken öncelikli kararlardan biri kullanılacak besin ortamlarının seçimidir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen bir çok besin ortamı formülasyonu mevcuttur. Besin ortamlarında yer alan komponentler kullanım sıklığına göre sırasıyla; su, makro elementler (majör tuzlar, makronutrientler), mikro elementler (minör tuzlar, mikronutrientler), vitaminler, şekerler, yarı katılaştırıcılar, bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asitler ve kimyasal olarak tanımlanamayan bazı maddelerdir (50).

Doku kültürlerinde üretici gücü yüksek hücre hatların elde edilebilmesi için; karbon kaynağı, nitrat, fosfat, büyüme düzenleyiciler gibi ortam bileşenlerinin ve miktarlarının farklı kombinasyonlarının kullanılması ve öncü molekül beslemesi yapılmaktadır. Ortam bileşenlerinin optimizasyonu sağlandıktan sonra kültür şartlarının [sıcaklık, aydınlatma, çalkalama, uyarma (elidasyon)] da en iyi duruma getirilmesi esastır.

Şikonin üretmek amacıyla yapılan kallus ve süspansiyon kültürlerinde belirli ortamlar ve bunların modifikasyonları kullanılmaktadır. Bu ortamlardan üzerinde en çok çalışılanları; MS (54), LS (55), SH (56), B5 (57), M9 (58) ve M10 (59)'dur. MS, SH ve LS ortamları genellikle ilk aşamada kallus gelişimini arttırmak amacıyla kullanılırken; B5, M9 ve M10 ortamları ile kurulan süspansiyon kültürlerinde ise şikonin miktarının arttırılması amaçlanmaktadır.

M9 ve M10, şikonin üretimini indükleyici ve inhibe edici şartlar göz önüne alınarak

düzenlenmiş ortamlardır. Bu ortamlarda şikonin biyosentezini indüklediği belirlenen Cu^{2+} iyonları ile IAA ve kinetin (KIN) hormonları kullanılırken, şikonin biyosentezini inhibe edici olan nitrat miktarı azaltılmış ve amonyum kullanımından kaçınılmıştır.

2.3.2.3. Saçak kök kültürü

Sekonder metabolit üretimi genellikle farklı dokularda gerçekleştiğinden tıbbi öneme sahip bileşiklerin üretiminde gövde ve kök kültürlerine gidilmektedir. Bu tür organ kültürleri üretim için daha stabildir. Yüksek bitkilerin kök sistemleri genellikle yavaş büyür ve hasatları zordur. Bu nedenle kök kaynaklı bileşikleri elde etmek için alternatif yöntemlere ihtiyaç olmuştur. *Agrobacterium rhizogenes*'in saçak kök kültürü oluşturma yeteneği sayesinde kök kaynaklı bileşiklerin üretimi daha kolay ve hızlı yapılabilmektedir (60). Saçak kök kültürlerinde *A. rhizogenes* plazmidindeki T-DNA'nın konuk dokuya aktarılmasıyla oksin sentez genleri okunur ve çoklu kök oluşumları ortaya çıkar.

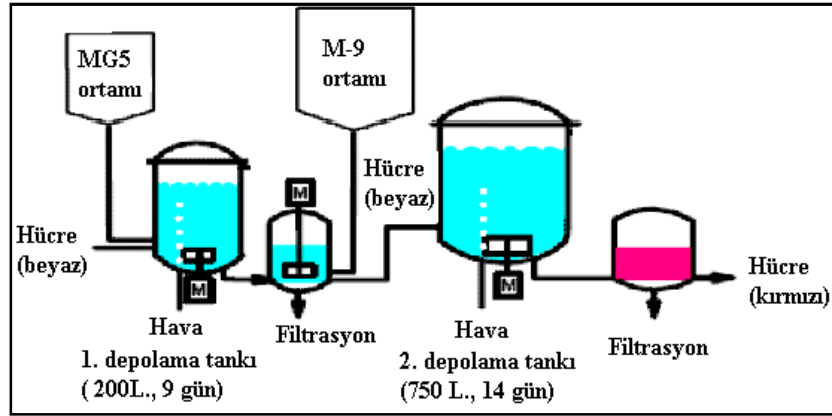
Saçak köklerle ilgilenilmesinin nedeni, dıştan herhangi bir oksin kaynağına ihtiyaç duyulmadan hızlı gelişimin sağlanmasıdır. İnkübasyon için çoğunlukla ışığa ihtiyaç duyulmamaktadır. Ayrıca saçak kök teknolojisi sadece kök kaynaklı bileşiklerin üretilmesinde değil biyodönüşüm ile yeni bileşiklerin üretilmesinde de kullanılabilir. İstenilen şekilde düzenlenmiş Ri plasmidi sayesinde saçak kökün genomik DNA'sının değiştirilebilmesi yeni bileşiklerin üretiminde çok büyük bir kullanım alanı oluşturacaktır. Bu sistemi kullanarak, tek tip saçak kökten birden fazla ürün alınabilecektir. Bu tür yaklaşımlar saçak köklerin yeni bileşikleri üretmesini teşvik eder ve hızlandırır. En önemlisi de bu bileşiklerin *in vivo* koşullardaki bitkilerden elde edilenlere oranla *in vitro* gelişme döngüsüne sahip kültürlerde çok daha kısa sürede yapılabilmesidir (61, 62).

2.3.2.4. Biyoreaktörler

Tıbbi bitkilerden biyoaktif maddelerin endüstriyel boyutlarda üretilmesi biyoreaktörlerle gerçekleştirilir. Endüstriyel boyutlarda üretilen ilk bitkisel kaynaklı farmasötikler şikoninlerdir.

Şikonin üretiminde hücre kültürleri en büyük üretim kaynağıdır. Biyoreaktör seçimi veya

tasarımı, üretilmek istenen ürünün özellikleri kadar hücre kültürünün özelliklerine de bağlıdır. Hücre süspansiyon kültürleri, immobilize hücreler ve saçak kökler gibi hücre/doku tipleri üretimin artırılmasında idealdir. Üretimde dikkat edilecek noktalar; öncelikle uygun besi ortamları ile üretilen hücre hatlarının seçilmesi, daha sonrasında ise optimal şartların sağlanabilmesi ve korunabilmesidir. Mitsui Petrokimya Ltd. Şirketi'nde biyoreaktörlerde üretilen ürünler pazara sunulmaktadır. Bitkisel kaynaklı ve ekonomik değeri bulunan bileşiklerin market araştırmasının yapıldığı bir çalışmada, şikoninin 150 kg olan yıllık üretiminden elde edilen kazanç 600000 dolardır. Japonya'da Kanebo adlı kozmetik şirketi şikonin içeren rujlar ile 2 yılda 65 milyon dolarlık gelir sağlamıştır (63).



Şekil 2.9. Şikonin üretiminde kullanılan iki aşamalı biyoreaktörün çalışma mekanizması (64)

Şikonin, *L. erythrorhizon* köklerinde ancak % 2-3'lük oranda bulunabilmekte ve bu oranla ancak 5-7 yılda ticari üretimde kullanılabilir miktar sağlanabilmektedir (65). 1983'te Mitsui Petrokimya Ltd. Şirketi tarafından şikoninin hücre kültürü tekniğiyle endüstriyel ölçüde üretildiği sistem iki aşama içermektedir (Şekil 2.9).

- 1) Hücrelerin, 200 L kapasiteli biyoreaktörlerde ilk gelişimleri gerçekleştirilmiştir.
- 2) İlk biyoreaktörlerde elde edilen toplam ağırlık ikinci biyoreaktöre transfer edilmiştir. Şikonin sentezlenmesini sağlayan kültür ortamını içeren 750 L kapasiteli bu reaktörde 23 günlük periyotta hücrelerde ağırlıklarının % 23'ü kadar şikonin üretilebilmiştir. *L. erythrorhizon* hücre kültürlerinde her hafta hücrelerden 60 mg/g oranında şikonin elde edilebilmiştir. Bu miktar, kök gelişiminin 5-7 yıl beklenilmesi

gereken bitkilerden yaklaşık 1000 kat daha hızlı bir şekilde sağlanabileceğini göstermektedir (63).

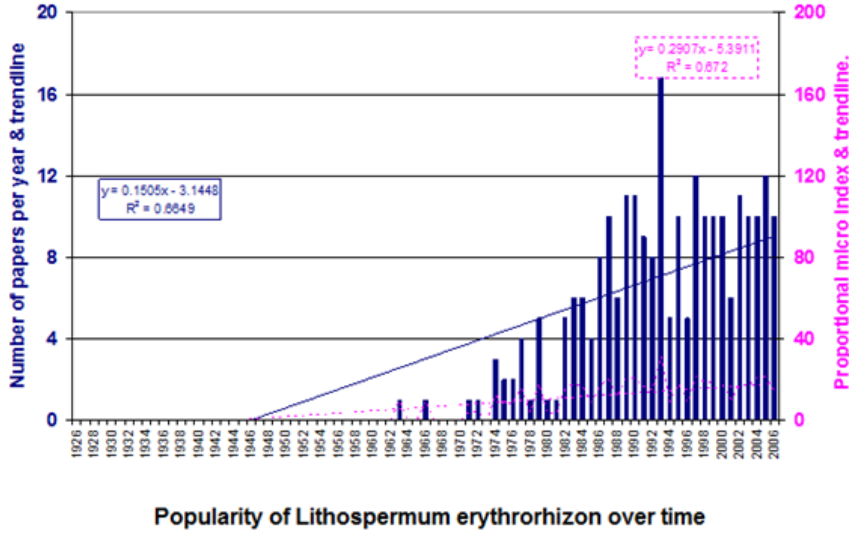
2.4. Şikonin ve türevlerinin doku kültürleri ile üretimi

Alkannin ve şikonin sekonder metabolitlerinin ticari olarak üretiminin gerçekleştirildiği doku kültürü yöntemleri üzerinde yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. *L. erythrorhizon* kullanılarak oluşturulan kallus kültürlerinden şikonin ve ester türevlerinin başarılı bir biçimde üretimi 1974 yılında Tabata ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (14). Bu doğal ürünler, bitki köklerindeki mantar tabakasında toplandıkları için, mantar hücrelerinin üretimi ile ilişkili sabit çevresel faktörlerle bu bileşiklerin biyosentezinin başlatılabileceği belirtilmiştir. Alkannin ve şikoninin biyosentezini kontrol eden faktörler üzerinde kültür ortamındaki değişimler ile desteklenen araştırmalar yapılmaktadır.

Mitsui Petrokimya Şirketi *L. erythrorhizon* bitkisinden hareketle doku kültürü ile alkannin ve şikoninin verimli ticari üretimini gerçekleştirmiş ve bu konuda birçok patentin sahibi olmuşlardır. Bu metot ile şikonin sıvı kültürde 4 g/L'nin üzerinde üretilebilmiştir. Bu süreç, bir sekonder metabolitin üretimi için bitki doku kültürünün, dünyadaki ilk ticari uygulaması olup ticari ölçek üzerinde uygulanmış az sayıdaki örneklerden biri olarak kalmıştır (26). Bu metotun üstün başarısı, diğer birçok Boraginaceae türünün kültüre edilen hücreleri ile alkannin, şikonin üretimi için yapılan araştırmaları teşvik etmiş ve sonuçta farklı düzeylerde başarılar elde edilmiştir (66).

Şekil 2.10'da da görüldüğü üzere *L. erythrorhizon* hücreleri ile ilgili kültür sürecinin ilerlemesi hala yoğun araştırma konusudur ve bu alanda her yıl birçok makale yayınlanmaktadır (49, 59). Bu tez çalışması ile *A. densiflora*'da doku kültürü yöntemleri ile alkannin ve şikoninin üretim potansiyeli hakkında bir öngörü elde edilmesi amaçlanmıştır.

Boraginaceae familyasına ait bitkiler süs bitkisi olarak kullanılmadıklarından, yapılan araştırmalar da mikroçoğaltım, somatik embriyogenez gibi çalışmalardan daha çok sekonder metabolit arttırılmasına yönelik olmaktadır.



Şekil 2.10. Yıllara göre *L. erythrorhizon* bitkisi ile yapılan çalışmalar (67)

2.4.1. Kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları

Şikonin üretimi üzerine yapılan ilk başarılı doku kültürü çalışması *L. erythrorhizon* bitkisi üzerinde 1974 yılında gerçekleştirilmiştir. Tabata vd. LS ortamında yaptıkları çalışmalarında oksin ve ışığın şikonin biyosentezindeki etkisini incelemiştir. Pigment üretiminin IAA içeren ve karanlıkta tutulan hücre kültürlerinde arttığını, buna karşılık 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve mavi ışığın etkisiyle azaldığını tespit etmişlerdir. Başlangıçta kallus kültürü, $10^{-6}M$ 'lık konsantrasyonda KIN ve 2,4-D içeren LS ortamı kullanılarak *L. erythrorhizon*'un tohumlarının çimlendirilmesiyle üretilmiş fakat bu kültürlerden naftokinon pigmentlerinin üretilmesinde başarı sağlanamamıştır. Ancak 3 ay sonra kallus kültürlerinin, IAA içeren kültür ortamına aktarılması ile pigment üretimi uyarılmıştır. Kültür sürecinin başlangıç aşamasında beyaz ışık ile aydınlatıldığında ise şikonin üretiminin tamamen engellendiği gözlenmiştir (14).

Tsukada ve Tabata (1984), *L. erythrorhizon* hücre kültürlerinde, naftokinon pigmentlerinin salgılanma sürecini ve hücre içi lokalizasyonunu elektron mikroskobu ile incelemiştir. Araştırma sonucunda, pigmentlerin "sekresyon vezikülleri"nde biriktiğini, bunların elektron yoğun, oldukça uzamış küresel şişlikler oluşturduğunu ve endoplazmik retikulumdan köken aldıklarını ileri sürmüşlerdir. Bu veziküllerin çoğunun, hücre duvarının dışına başta şikonin pigmentleri, lipidler ve proteinlerin salgılanması amacıyla membrana yapıştıkları belirtilmiştir (68).

Yazaki vd. (1987) çalışmalarında, LS ortamında *L. erythrorhizon* ile oluşturdukları kallus kültürlerinde agar kullanıldığında pigment oluşumu gözlenirken, agarın bulunmadığı kültürlerde ise şikonin üretiminin gerçekleşmediğini gözleyerek, bu etkinin agardaki polisakkaritlerin varlığı ile sekonder metabolitlerin sentezinin uyarılmasından kaynaklandığı önerisini getirmişlerdir. Ayrıca burada pigment şekillenmesinin aktif karbon tarafından desteklenirken glutamin tarafından engellendiği de belirtilmiştir (69).

Hara vd. (1987) çalışmalarında, *L. erythrorhizon* şikonin türevlerinin üretimi açısından kallus ve süspansiyon kültürlerindeki farklılıkları araştırmışlardır. LS ortamı kullanılarak hazırlanan süspansiyon kültürlerinde üretilmezken, kallus kültürlerinde şikonin türevleri üretilebilmiştir. Şikonin üretiminde besin ve oksijen kaynağı ile agarın etkisi açısından farklılıklar incelenmiştir. Şikonin türevleri agar olmadan, yeterli miktarda besin sağlandığında hava ile temas eden hücrelerde üretilebilmiştir. Kallus kültürlerinde havadaki oksijenin konsantrasyonu düşürüldüğü zaman ise şikonin bileşiklerinin üretimi belirgin bir şekilde düşerken, bol oksijen sağlanması ile de hücre büyümesi güçlendirilmiştir (70).

Kim ve Chang (1990) *L. erythrorhizon* bitkisi üzerinde SH ortamının çeşitli modifikasyonlarını kullanmışlar ve 10^{-5} M p-klorofenoksiasetik asit ve 10^{-6} M KIN içeren ortamda 6 günde şikonin üretebilmeyi başarabilmişlerdir. Daha sonra da bu hücreleri M9 ortamına transfer etmişler ve *in situ* ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir (71).

Touno vd. (2000) *L. erythrorhizon* sürgünlerinden 5 farklı ortamın katı ve sıvı kültürlerini oluşturmuşlardır. Katı MS ve sıvı B5 ortamlarında farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1, 0.5 mg/mL) IAA, IBA veya KIN hormonlarının sürgün gelişimi ve kırmızı pigment oluşumundaki etkilerinin incelemişlerdir. KIN'in; MS ortamında şikonin üretimini indükleyici rol oynadığı belirlenirken B5 ortamında aynı durumun söz konusu olmadığı görülmüştür. En fazla şikonin üretiminin (kuru ağırlığın % 2.3'ü), hormon içermeyen sıvı B5 ortamında oluşturulan 5 haftalık kültürlerde gerçekleştiği tespit edilmiştir (18).

Bulgakov vd. (2001)'un *L. erythrorhizon* kullanarak oluşturdukları kallus kültürlerinde 7 şikonin türevi (asetilşikoinin, propionilşikoinin, izobutirilşikoinin, β,β -dimetilakrilşikoinin, izovalerilşikoinin, β -hidroksizovalerilşikoinin ve α -metil-n-butirilşikoinin) üretilmiştir. B39 ortamından seçilen hücre agregatlarının p-florofenilalanin içeren ortama transfer edilmesi ile oluşan hücre hatlarında, inhibitöre olan direnç ilk kültürden daha yüksek bulunmuştur. p-

florofenilalanin dirençli kültürlerin şikonin türevi içeriği, kontrole oranla yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu, bunun da kuru hücre ağırlığının % 12.6'sına karşılık geldiği bildirilmiştir (72).

Lin ve Wu'nun çalışması (2002), düşük enerjili ultrason kullanımının bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırdığını göstermiştir. *L. erythrorhizon*'un süspansiyon kültürü hücrelerinin düşük güçte (113.9 mW/cm³) ve kısa süreli (1-8 dk) ultrasona maruz kalmasıyla, hücrelerin şikonin biyosentezi uyarılmış ve volumetrik şikonin verimi % 60-% 70 oranında artmıştır. Sonikasyonun hücre membran geçirgenliğinde kısmi bir artışa yol açmasıyla hücrelerden salgılanan şikonin oranı % 20'den % 65-70'e yükseltilmiştir. Şikonin üretiminde iki anahtar enzim olan PAL ile PGT'in ultrason ile uyarıldıkları bulunmuştur. Kültür uygulaması sürecinde artan enerji seviyelerinde ultrason uygulaması ile ise hücre gelişiminde ve şikonin veriminde biraz baskılanma tespit edilmiştir (73).

L. erythrorhizon süspansiyon kültürlerinde şikonin ve lithospermik asit B üretiminin düzenlenmesi üzerinde yapılan çalışmada şikonin üretim ortamı olan M9 ortamında şikonin türevleri (kuru ağırlığın % 10'u) kadar lithospermik asit B üretildiği belirlenmiştir. Bir kafeik asit tetrameri olan lithospermik asit B üretiminin artırılması amacıyla kültürde çeşitli faktörler incelenmiş ve burada 2,4-D veya NH₄⁺ inhibe edici, Cu²⁺'ın ise uyarıcı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, hücre kültürlerinde şikonin türevleri ile lithospermik asit B üretimi arasındaki metabolik düzenlemenin yakın ilişki içinde olduğunu düşündürürken, yetiştirme ortamındaki aydınlanma ise bunların metabolizmalarının bağımsız olarak düzenlendiğini göstermektedir. Özellikle mavi ışık, lithospermik asit B üretimi üzerinde uyarıcı bir etki gösterirken şikonin üretimini kuvvetle inhibe etmektedir (49).

Ding vd. (2004), *O. paniculatum* hücrelerinin sekonder metabolizmalarında Metil jasmonat (MJ) ile 6-benzilaminopurin (BA) ve IAA'nin etkilerini incelemişlerdir. MJ'nin hem BA hem de IAA ile birlikte kullanıldığında hücre büyümesini önemli derecede etkilediğini göstermişlerdir. M9 ortamı ile kurulan kültürlerde, MJ'nin 0.04-4.45 µM arasında artan konsantrasyonları ile birlikte IAA ve BA kullanımı hücre büyümesini arttırmış ve şikonin oluşumunu hızlandırmıştır. Şikonin oluşumunda optimum zamanın, M9 ortamına hücre inokülasyonundan 4 gün sonrası olduğu, inokülasyondan 9 gün sonra PHB-O-glukoziltransferaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, şikonin oluşumu Meja/IAA

ve Meja/BA kombinasyonlarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Şikonin oluşumu için MJ ve IAA'nın optimum kombinasyonu 4.45 µM ve 0.28 µM iken MJ ve BA konsantrasyonları 4.45 µM ve 2.22 µM olduğu tespit edilmiştir. MJ'in şikonin oluşumu sırasında PAL ve PHB- geraniltransferaz faaliyetlerini arttırdığı belirtilmiştir (74).

L. erythrorhizon hücre kültürlerinde şikonin üretiminde kültürel koşulların araştırıldığı çalışmada, havalandırma ve ortam bileşenlerindeki miktarların etkileri incelenmiştir. En iyi üretim, 100 mg/L L-fenilalanin, 2 mg/L IAA ve 800 mg/L Ca(NO₃)₂·4H₂O içeren ve havalandırmanın 150 devir/dk olduğu ortamda elde edilmiştir (75).

L. erythrorhizon sürgünlerinin, hormonsuz katı MS ortamında kültüre alındığı çalışmada, etilenin şikonin biyosentezindeki olası ilişkisi araştırılmıştır. İyi havalandırılan kültürlerde, az miktarda şikonin türevleri üretilirken, havasız petrilerde etilen varlığında gelişen kültürlerde pigment üretimi gerçekleşmiştir. Sürgünlerdeki şikonin türevlerinin miktarları, gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Sürgünlere etilen ya da etilen öncüleri uygulaması ile şikonin türevlerindeki 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit miktarlarının içerikleri artarken, bir etilen inhibitörü olan gümüş iyonu, ya da etilen biyosentezi inhibitörü olan aminoetoksivinilglisin'in üretimi ise azalmıştır. Bu çalışma ile etilenin *L. erythrorhizon* sürgün kültürlerinde şikonin biyosentezinin düzenleyici elemanlarından biri olduğunu gösterilmiştir (76).

O. paniculatum hücre kültüründe, hücre büyümesi ile şikonin ve türevlerinin oluşumuna brassinolidlerin (BR) etkisi araştırıldığı çalışmada B5 ortamına IAA ve BA ile birlikte BR eklenmesiyle (0.01-0.1 ppb konsantrasyonda) hücre büyümesinde az miktarda artış görülmüştür. Ortama sadece brassinolid eklenmesiyle (0.001-100 ppb) kontrole göre hücre ağırlığında önemli artış görülmüştür. Ortama sadece 0.001-1000 ppb brassinolid eklenmesiyle de şikonin türevlerinin oluşumunun kontrole göre fazla olurken, IAA ve BA içeren M9 ortamına 0.001-0.1 ppb brassinolid eklenmesiyle bu oran % 31-87 oranında fazla olduğu belirlenmiştir. M9 ortamına IAA ve BA ile birlikte 0.01 ppb brassinolid eklendikten 4 gün sonra hücre büyümesi ve şikonin türevlerinin oluşumunun hızlandığı tespit edilmiştir (77).

Onosma paniculatum hücre kültürlerinde ışığın, şikonin üretimi ve gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelediği bir çalışmada şikonin ve türevlerinin; karanlık ortamda büyük

miktarlarda üretilirken, sürekli kırmızı ışık altında olduklarında kısmen (% 58 oranında) baskılandıkları, sürekli beyaz ve mavi ışık ile aydınlatıldıklarında ise tamamen inhibe edildikleri tespit edilmiştir. Çeşitli genlerin farklı aydınlatmalardaki ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve çalışılan genler arasında, LDI2'nin ışığa bağlı şikonin oluşumu için kritik olduğu tespit edilmiştir. Burada da iki aşamalı kültür ortamı kullanılmış ve Gamborg B5 ortamında elde edilen kalluslar M9 süspansiyon ortamına transfer edilmişlerdir (66).

O. paniculatum hücrelerinde şikonin oluşumunun düzenlenmesinde endojen olarak nitrik oksit (NO)'in rolünün araştırıldığı bir çalışmada, ortama NO inoküle edildikten 2 gün sonra şikonin üretimi en yüksek düzeye ulaşmış (başlangıç şartlarınının 16 katı) ve bu seviyede 6 gün varlığını sürdürmüştür. Endojen olarak *Rhizoctonia cerealis* elisitörü kullanılması ile NO biyosentezi artışı ile birlikte şikonin üretimi hızlanmıştır. Eş zamanlı PCR analizinde NO'in, şikonin biyosentezinde rol oynayan başlıca enzimler olan PAL, PGT ve HMGR'in ekspresyon düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (35).

O. paniculatum'un karanlıkta kültüre alınan hücrelerinde büyük miktarlarda şikonin ve türevleri oluşturulmuştur. Şikonin biyosentezini düzenleyici genleri izole etmek ve tanımlamak amacıyla, karanlıkta kültüre alınan hücrelerin zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurulmuştur. PCR kullanılarak genler karakterize edilmiştir. Beyaz ışıkta kültüre alınan hücreler, karanlıkta alınan hücreler ile karşılaştırılmıştır. Mikrodizin analizi ile rastgele seçilen genlerin ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Etilenin ışık indüklü şikonin oluşumunda önemli rol oynadığına işaret edilmiştir (78)

Zare vd. (2010) tarafından *Echium italicum* ile kallus ve hücre süspansiyon kültürü kurularak burada üretilen şikonin ile alkannin türevleri analiz edilmiştir. Kallus kültürleri, B5 ortamında kotiledon eksplantlarının geliştirilmesiyle oluşturulmuştur. İki sıvı faz sistemli süspansiyon kültürlerinde sıvı parafin kullanılarak şikonin ve alkannin türevlerinin indüklenmesi sağlanmıştır. Sıvı parafin varlığında kültürdeki hücrelerde verimli bir pigment üretimi görülmüş ve otofloresan özellik gösteren naftokinonlar floresan mikroskobu ile incelenmiştir (79).

E. italicum'un kotiledon, hipokotil ve kök eksplantlarında kallus gelişimi ile pigment indüklenmesi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada kallus kültürleri, B5, LS, ½ LS ve White ortamlarında farklı oksinlerin (2,4-D, IAA, 1-naftalenasetik asit (NAA)), KIN ile

kombinasyonları oluşturularak kurulmuştur. Burada maksimum pigment içeren kallus oluşumu (% 100) White ortamında gözlenmiştir. Kallus kültürlerinde, major sekonder metabolit olan asetilşikinin tespit edilmiştir (80).

2.4.1.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları

Arnebia euchroma ile kurulan süspansiyon kültürlerinde in situ ekstraksiyon ile *Rhizopus oryzae* ve *Aspergillus niger*'den hazırlanmış fungal elisitörlerin de uygulanmasıyla maksimum şikonin konsantrasyonunun 245.68 mg/L olduğu saptanmıştır. Bu değer, kontrol kültürlerinde elde edilen miktarın 6.15 katı olduğu belirtilmiştir (81).

Poronnik ve Kunakh (2005)'in Boraginaceae ailesinde bitki ve hücre kültürleri tarafından üretilen şikonin üretimine ait verileri gözden geçirdikleri, bitkilerin lokalizasyonları, naftokinonların özellikleri ve biyosentezleri ile ilgili verileri özetledikleri çalışmalarında; *A. euchroma* hücre hatlarında şikonin üretiminde kuru biyokütlenin % 20'si kadar üretim gerçekleştirilebilmiştir (82).

Nadir toprak alkali metallerinin, şikonin ve türevlerinin üretimindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada *Arnebia euchroma* ile oluşturulan iki aşamalı kültürler kullanılmıştır. LS ortamında 20 gün süre ile tutulan hücreler, şikonin sentezini arttırmak amacıyla M10 ortamına transfer edilmiştir. Daha sonra Nd^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} elementleri ve uygun konsantrasyonlardaki karışımları ($La_2O_3:CeO_2:Pr_6O_{11}:Sm_2O_3 = 255:175:3:1$, mol/mol) M10 ortamına eklenmiştir. 0.05 mM konsantrasyondaki karışımın bulunduğu ortamlarda, bu elementlerin bulunmadığı ortamlara göre hücre biyokütlesinde % 98 (24.8 g/L), şikonin üretiminde ise % 165.3 (571.1 mg/L)'lik artış sağlanabilmiştir. Bu artışa, nadir toprak alkali metallerinin eklenmesiyle PAL ve peroksidaz aktivitelerinin artmasının yol açmış olabileceği belirtilmiştir (59).

A. euchroma hücre süspansiyon kültüründe Singh vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada; şikonin içeriği ile HMGR ve PGT genlerinin ekspresyonunun arasındaki pozitif korelasyon ile bu genlerin şikonin üretiminde kritik rol oynadıkları belirtilmiştir. Bu çalışmada fenilpropanoit yolunda yer alan genlerin yüksek ekspresyonlarının şikonin biyosentezinin artırılmasında genel bir özellik olduğu da vurgulanmıştır (83).

A. euchroma süspansiyon kültürlerinde L-fenilalanin (PHE)'in şikonin türevlerinden asetilşikinin ve izobutirilşikinin üretimine ve hücre büyümesine olan etkileri Syklovska-Baranek vd. (2012) tarafından incelenmiştir. Boraginaceae'nin diğer türlerinin hücre kültürlerinde şikonin üretimini arttırmak için ortama PHE eklenmesi iyi sonuç verdiği belirtilmiştir. Fenilpropanoid yolağında kilit bir bileşik olan PHE şikonin biyosentezinde öncüdür. Kültür ortamına 0.01 mM ya da 0.1 mM PHE eklenmesi hücre çoğalmasını uyarmıştır. Burada nihai ağırlığın başlangıç ağırlığına olan oranı olarak ölçülen hücre biyokütlesindeki en yüksek artış 12 kat olup kontrol kültürlerinde ise bu artış 8 kat olarak gözlenmiştir. Büyüme ortamına 1 mM PHE eklendiğinde ise hücre büyüme hızında belirgin azalma olmuştur. Tüm PHE destekli ortamlarda öncü beslemesi ile hem asetilşikinin hem de izobutirilşikinin üretimini kötü etkilemiştir. Kırmızı pigment üretiminde hücre içi ve hücre dışına salınan toplam içeriğin, PHE olmayan kontrol kültüründe en yüksek olduğu saptanmıştır. Hücrelerde ve kültür sonrası ortamda naftokinon fraksiyonunda en çok bulunan bileşenin asetilşikinin olduğu belirlenmiştir. Şikonin sadece 0.01 ya da 0.1 mM PHE eklenen kültürlerden kültür sonrası ortamı içerisinde tespit edilmiştir. Kontrol kültüründe PAL aktivitesinin artışı ile naftokinonların birikiminin iyi uyumlu oldukları bulunurken, PAL aktivitesinin en yüksek olduğu zamanla şikonin türevlerinin maksimum üretiminin tam olarak korele olamadıkları belirlenmiştir. Ekstrelerin sitotoksitesinde, PHE içeren kültürlerde yetiştirilen hücreler ile kontrol kültürleri, HL-60, HeLa ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Kontrol kültürlerinden hazırlananan ekstaktların incelenen kanser hücre hatlarına karşı en güçlü olduğu kanıtlanmış ve ortalama inhibe edici konsantrasyon değerlerinin HL-60, HeLa için ve MCF-7 hücreleri için sırasıyla 0.3, 13 ve 8 µg/mL oldukları tespit edilmiştir (34).

Malik vd. (2011), *A. euchroma* yaprak kaynaklı kallusların bulunduğu 10.0 µM BAP ve 5.0 µM IBA içeren MS ortamında süspansiyon kültürleri ile çalışmışlardır. 2 aşamalı kültürlerde; ilk aşamayı hücre biyokütlesinin arttırıldığı gelişim aşaması, 2. aşamayı ise şikonin türevlerinin üretim aşaması oluşturmuştur. Işık, sıcaklık, sakaroz ve pH gibi faktörlerin şikonin türevlerinin üretimine olan etkilerini incelemişlerdir. Işık, şikonin türevlerinin üretimini tamamen inhibe etmiştir. Farklı sıcaklık dereceleri de test edilmiş ve en yüksek verim 25°C'de 586.17 µg/g olarak belirlenmiştir. Maksimum üretim (656.14 µg/g) % 6 sakaroz varlığında gözlenmiştir. Alkali pH (7.25-9.50) değerleri iyi sonuç vermiştir. *A. euchroma* hücre süspansiyon kültürleri içinde şikonin türevlerinin üretiminde fiziksel ve kimyasal faktörlerin büyük etkisi olduğunu göstermiştir. Optimum kültür

koşullarını uygulayarak, bu hücrelerden ikincil bileşiklerin üretimi arttırmanın mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, şikonin türevlerinin *in vitro* üretimi için optimize edilmiş şartların biyoreaktörlerde büyük ölçekli üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir (84).

2.4.1.2. *A. densiflora* ile yapılan kallus ve süspansiyon kültürü çalışmaları

Kurnaz (2002), *A. densiflora* bitkisinin çeşitli organlarından kallus üretmeyi amaçlamıştır. Çalışmada bitkinin kök, çiçek eksenini, yaprak ve tohumlarından kallus üretmek için uygun besin ortamı belirlenmeye çalışılmıştır. % 3 sakaroz ve % 0.7 agar içeren MS, LS ve SH ortamlarında IAA, KIN, 2,4-D ve NAA hormonları değişik konsantrasyonlarda tek ve karışım halinde kullanılmıştır. Normal ve dondurulmuş bitkiden alınan eksplantlar 25 ± 1 °C karanlıkta 6 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. LS ve MS ortamlarında kök, tohum ve çiçek ekseninden kallus oluşumu gözlenirken, SH ortamında kallus oluşturulamamış, tohumdan kallus üretimi ise sınırlı kalmıştır. Donmuş bitki eksplantlarından da kallus üretimi sağlanmıştır (85).

Övet (2003), *A. densiflora* bitkisinin farklı hormon konsantrasyonları ile hazırlanan MS ortamına yanıtını incelemiştir. Bitkinin kök, çiçek eksenini ve yaprak kısımlarından oluşturulan eksplantlardan kallus oluşumu 3 hafta süre ile incelenmiştir. Yaprak eksplantlarında kallus oluşumu gözlenmezken en iyi gelişim çiçek eksenini eksplantlarında 5.7×10^{-7} M IAA içeren MS ortamında belirlenmiştir (86).

2.4.2. Saçak kök kültürü çalışmaları

Sim ve Chang (1993), SH ortamında *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinde n-hekzadekan ile yapılan *in situ* ekstraksiyonla 3 kat fazla şikonin üretimini sağladıktan sonra bunları iki fazlı biyoreaktöre transfer etmişler ve sonuçta günlük düzenli olarak 10.6 mg/L ve 54 günlük kültür sürecinde de 572.6 mg/L şikonin üretebilmişlerdir (87).

Sim vd. (1994), *L. erythrorhizon* saçak kök ve süspansiyon kültürlerinde *in situ* ekstraksiyon, fungal uyarıcı, geçirgenlik ajanı ve oksijen transfer hızının şikonin üretimindeki etkilerini incelemişlerdir. n-hekzadekan ile yapılan *in situ* ekstraksiyonda

şikinin üretimi süspansiyon ve saçak kök kültürlerinde, kontrol kültüre oranla 7.6 ve 3 kat daha fazla oranda ve hızlı bir şekilde olmuştur. Hızlı gaz değişimi, *in situ* ekstraksiyon ve sakaroz kullanımı ile şikinin üretimi artmıştır. *In situ* ekstraksiyonun erken aşamalarda yapılması da şikinin üretimini önemli derecede arttırmıştır. Hücre gelişiminde ve şikinin üretiminde zararlı etkileri bulunan dimetilsülfoksitin geçirgenlik ajanı olarak kullanılmasıyla hücrelerdeki şikininin çoğu ani olarak hücrelerden salınmış ve solvent yüzeyinde çözülmüştür. Elisitör olarak kullanılan *Penicillium*'un n-hekzadekan ile birlikte eklenmesi, iki kültürde de şikinin üretimini arttırmıştır. Saçak kök kültürlerinde sadece fungal elisitör eklenmesi ile şikinin indüklenmesinin normal hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında önemsiz olduğu belirtilmiştir (17).

L. erythrorhizon kök ve kök kabuklarında naftokinon türevlerinin üretimi belirli zamanlarda ve belirli hücrelerde olduğu gibi pek çok faktörden de etkilendiğini belirten Brigham vd. (1999), şikinin üretimini pozitif ve negatif yönde etkileyen faktörleri bir çizelge halinde sunmuşlardır (Çizelge 2.4). Çalışmalarında biyotik ve abiyotik faktörlerin *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinde epidermal hücrelerdeki pigment üretimini arttırdığını kaydetmişlerdir. Ortama bakır sülfat gibi abiyotik ve fungal elisitörler gibi biyotik faktörlerin eklenmesiyle pigment üretiminin indüklenerek total pigment miktarının arttığını, üretilen türevlerin oranlarının değiştiğini ve epidermal hücrelerde *de novo* pigment üretiminin başlatıldığını belirtmişlerdir. Bu bileşiklerin biyolojik aktivitesi toprak kaynaklı bakteri ve mantara karşı test edildiği zaman geniş duyarlılıklarının bulunduğu kaydedilmiştir. *A. rhizogenes* transformasyonu ile saçak kök kültürlerinde ve serada yetiştirilen bitki köklerinde en fazla oranda asetilşikinin ve β -hidroksiizovalerilşikinin olmak üzere biyolojik aktivite gösteren 7 bileşik belirlenmiştir. Köklerle temas halinde olan patojenik *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* ve *Nectria hematococca* funguslarının hiflerinin köklerde lokalize pigment oluşumunu indüklediğini belirtmişlerdir. *R. solani*'nin şikinin türevlerinin miktarını 30 kat arttırdığı kaydedilmiştir (6).

Lithospermum canescens saçak kök kültürlerine *A. rhizogenes*'in üç suşunun (ATCC 15834, LBA 9402 ve NCIB 8196) transformasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada, *A. rhizogenes* ATCC 15834 enfeksiyonuyla sekiz hatta yeterli biyokütle artışı sağlanmıştır. Transformasyonun gerçekleştiği saçak köklerdeki asetilşikinin ve izobütirilşikinin içeriği doğal *L. canescens* köklerinde bulunan miktarlarının (sırasıyla 24.35 ve 14.48 mg/g) % 10'una karşılık gelmiştir. En yüksek asetilşikinin (2.72 mg/g) ve izobütirilşikinin (0.31

mg/g) bir hatta üretilirken tüm hatlarda eser miktarda pirolizidin alkaloidlerinin bulunduğu belirlenmiştir (88).

Yamamoto vd. (2000) tarafından, *L. erythrorhizon* kullanılarak M9 ortamında geliştirilen hücrelerde şikonin üretimine yakın miktarlarda lithospermik asit B, dimerize kafeik asit ester türevleri ile bir dimer olan rabdosin üretilmiştir. LS sıvı ortamı içinde ise, şikonin üretimi baskılanırken lithospermik asit B ve rabdosin üretildiği belirlenmiştir. *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinden ana bileşen olarak lithospermik asit, kafeik asit-rozmarinik asit konjugatı izole edilmiştir (47).

Çizelge 2.4. Hücre kültürlerinde şikonin üretimini etkileyen faktörler (6)

Arttırıcı Etkiler	Azaltıcı Etkiler
Oksin	Beyaz ya da mavi ışık
Streptomisin	2,4-D
Askorbik asit	<i>p</i> -Kumarik asit
Sakaroz > 5 %	Benzoik asit
Nitrat tükenmesi	Amonyum
Bakır sülfat	Glisin
İç kaynaklı polisakkaritler	Glutamin
Metil jasmonat	Mevinolin (HMG-CoA redüktaz inhibitörü)
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit (M9 ortamında)	Asidik polisakkaritlerin azalması
Fungal elisitör	2-Aminoindan-2-fosfonik asit (PAL inhibitörü)

Syklowska-Baranek vd. (2012) çalışmalarında, *Lithospermum canescens* saçak kök kültürlerinde gelişim ile birlikte şikonin ve türevlerinden asetilşikoinin ve izobutirilşikoinin üretimini incelemiştir. Ortam değişiminin ve MJ ilavesinin asetilşikoinin ve izobutirilşikoinin üretimi üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada alınan yanıtlar uygulama yapılan transgenik hatta ve büyüme evresinde değişiklikler göstermiş, ayrıca kültürlerde tek başına şikonin tespit edilmemiştir. 32 gün süre ile LS ortamında geliştirilen ve ardından M9 ortamına aktarılarak 3 hafta sonunda ayrılan transgenik hatta asetilşikoinin ve izobutirilşikoinin miktarında sekiz kat artış elde edilmiştir (89).

2.4.2.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan saçak kök kültürü çalışmaları

Chen vd. 2008, *A. euchroma* saçak kök kültürlerinin indüklenmesinde *A. rhizogenes*'in 3 suşu ile çalışmışlardır. *A. rhizogenes*'in MSU440 suşu ile enfekte edilen *A. euchroma*'nın kotiledon eksplantları ile saçak kök kültürleri oluşturulmuştur. Amonyum içermeyen MS ortamının saçak kök kültürü gelişiminde B5 ortamına göre daha uygun olduğu belirlenmiştir (90).

CuiFang vd. 2009, *A. euchroma* saçak kök kültürlerine çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, maksimum saçak kök gelişiminin, 26°C'de bulunan B5 ortamındaki kültürlerin 33. gününde gerçekleştiği (inokulumun 19.2 katı) belirlenmiştir (91).

2.4.3. Biyoreaktör çalışmaları

Sim ve Chang (1993), SH ortamında *L. erythrorhizon* kullanarak oluşturdukları saçak kök kültürlerinde n-hekzadekan ile yaptıkları *in situ* ekstraksiyonla 3 kat fazla şikonin üretimi sağlamışlardır. Ardından bunları iki fazlı biyoreaktöre transfer etmişler ve sonuçta günlük düzenli olarak 10.6 mg/L ve 54 günlük kültür sürecinde de toplam 572.6 mg/L şikonin üretmeyi başarmışlardır (87).

Syklowska-Baranek vd. (2008), *Lithospermum canescens*'in 2 adet saçak kök hattında şikonin üretiminde LS ve M9 ortamlarının etkilerini incelemişlerdir. 3L hacimli reaktörlerde oluşturulan kültürlerde 4 hafta sonunda M9 ortamının gerek biyokütle artışı, gerekse pigment üretimi bakımından LS ortamına kıyasla daha iyi olduğu gözlenmiştir. Biyokütle artışı LS ve M9 ortamlarında sırasıyla bir hatta 10 ve 27 iken, diğer hatta 2 ve 8 olarak belirlenmiştir. Asetilşikoinin ve izobütirilşikoininin LS ve M9 ortamlarındaki toplam miktarları sırasıyla bir hatta 1.68 mg/L ve 6.17 mg/L iken diğer hatta 1.11 mg/L ve 4.73 mg/L olarak bulunmuştur (92).

2.4.3.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan biyoreaktör çalışmaları

A. euchroma'da immobilizasyon ve süspansiyon kültürlerinin birleştirilmesiyle oluşturulan biyoreaktör sisteminde 15 saatte 777 mg/L hacminde şikonin üretilenmiştir. Bu oranla

süspansiyon kültürlerinden % 26 daha fazla bir üretim sağlanabilmiştir (81).

Ge vd. (2006), 2-1 şeklinde periyodik şekilde immobilize kültür ile süspansiyon kültürünün otomatik olarak kontrol edildiği biyoreaktörlerde *A. euchroma* ile çalışmışlardır. Bu reaktörlerin, süspansiyon kültürü ile karşılaştırıldığında; hücre büyümesi, şikonin içeriği, şikonin üretimi ve hücre agregasyonunun geliştirilmesi bakımından daha avantajlı oldukları belirtilmiştir. Optimum periyodun 10 dk süspansiyon/15 saat immobilize kültür olduğu sistemde; şikonin içeriğinin % 4.6 olduğu, hücre kuru ağırlığının ise 16.8 g/L ile süspansiyon kültüründen % 26 oranında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (93).

2.5. Şikonin ve Türevleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.5.1. Yara iyileştirici aktivite

Yara iyileşmesi birçok hücre tipinin etkileşimlerini, çeşitli büyüme faktörlerini, onların araçlarını ve ekstraselüler matriks proteinleri içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir (94). Alkannin ve şikoninin yara iyileştirici özellikleri ile ilgili araştırmalar da son yıllarda hız kazanmıştır. Boraginaceae familyasına dahil olan bitkilerin içeriğinde buldukları şikonin ve türevleri nedeniyle yara iyileştirici olarak kullanımlarına dair pek çok çalışma bulunmaktadır ve bu kullanım halk tıbbında da yaygındır.

Çin'de yaygın olarak kullanılan ve ana bileşenlerini *Lithospermum* köklerinden elde edilen şikonin ve türevlerinin (Shikon) oluşturduğu bitkisel merhem olan Shiunko'nun eter ekstraktlarındaki şikonin ve asetilşikoininin farmakolojik etkileri incelenmiş ve aralarında çok az fark görülmüştür. Her iki pigment de, kan koagülasyonunda etki göstermezlerken sıçanlarda heparinin antikoagülan etkisini inhibe etmişlerdir. İki pigmentin de % 0.1'lik merheminin 50 mg lık yüzeysel olarak uygulanması ile histamin, anti-rat tavşan serumu ve sıcaklık ile artmış olan damar geçirgenliği ve akut ödem inhibe edilmiştir. % 0.1'lik fenilbütazon merhemi ile benzer etki gözlenmiştir. Bu pigmentler aynı zamanda sıçanlarda granuloma dokularının proliferasyonunu arttırarak yara iyileşmesini teşvik etmişlerdir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak cilt yaralanmalarında yapısında Shikon bulunan Shiunko merhem önerilebilmektedir (95).

Ozaki vd. (1993), Japonya'da kullanılan preparatlar olan nanshikon ve koshikonun içeriklerinin sıçanlarda granülasyon dokusunun proliferasyonunu hızlandırıcı etkisini araştırmışlardır. Nanshikon ve koshikonun eter ekstraktlarındaki toplam naftokinon içeriğini sırasıyla % 25.4 ve % 56.1 olarak belirlemişlerdir. Koshikonun daha çok asetil, nanshikonun ise terakril türevi bileşiklerden oluştuğunu belirlemişlerdir. Ekstrelerin toplam naftokinon türevlerindeki şikonin içeriğinin koshikonda % 85.5 iken nanshikonda % 3.8 olduğu tespit edilmiştir. Granüloma dokusunun proliferasyonu deri altına yerleştirilen pamuk pellet-indüklü implant ile uyarılmıştır. Doza bağlı olarak pamuk pellet-indüklü granüloma dokularında çalışıldığında; nanshikon ve koshikonun granüloma dokusunun çoğalmasını hızlandırıcı etki bakımından aynı oldukları, bu etkinin toplam naftokinon içeriğine bağlı olup optikçe aktif izomer oranının etkili olmadığı belirtilmiştir (96).

Ozaki vd. (1994), alkannin, şikonin ve asetilşikoninin granülasyon dokusunun proliferasyonunu hızlandırıcı etkisini sıçanlar üzerinde araştırmışlar ve yaklaşık aynı etkiyi gösterdiklerini belirlemişlerdir. Burada şikonin ve alkanninin mutlak konfigürasyonu ve bunların yan zincirinin hidroksi grubundaki asetilasyonunun etkilerinde farklılık göstermediği belirtilmiştir (97).

Şikoninin granüloma dokularında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimi ve neovaskülarizasyonu indüklediği bir hava kesesi modeli ile kanıtlanmıştır. Deri altına enjekte edilen hava kesesinin içine, 24 saat sonra şikonin (50–1000 µg) enjekte edilmiş ve 7 gün sonra granülasyon dokusunun şekillenmesi kese duvarlarının ağırlığının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Daha yüksek miktarlardaki şikonin uygulamalarıyla granülasyon dokusunun şekillenmesi anlamlı biçimde artmıştır. 5-7. günlerde şikonin uygulaması yapılan keselerin duvar kalınlıklarında artış olduğu, 7. günde granülasyon dokusunda neovaskülarizasyon ve enflamatuvar hücre birikimi belirlenmiştir. Enjeksiyondan 1 gün sonra kese duvarlarında eksprese edilen VEGF miktarının önemli derecede artarken 7. günde ise azaldığı tespit edilmiştir (98).

Khatoon vd. (2003), Boraginaceae familyasına ait *Alkanna*, *Arnebia*, *Maharanga* ve *Onosma* cinslerine ait 8 türün kök ve rizomlarının bileşiminde bulunduğu Ratanjot'un

ekzama, yara ve isilikte etkili olduğu, Hindistan'da göz hastalıkları, bronşit, karın ağrıları ve kaşıntı tedavisinde kullanıldığını belirtmişlerdir (99).

Diyabete bağı olarak oluşan yaralarda, ileri varis oluşumları sonrasında görülen bacak ülserasyonlarında ve yanıklarda, bileşiminde *Alkanna tinctoria* kök ekstrelerinin bulunduğu Helixderm merhem % 80 üzerinde etkili olduğu belirlenmiş ve merhem 5 haftalık süreçte bacak ülseri üzerine uygulanması ile önemli derecede iyileşme gözlenmiştir (25, 100). Michaelides vd. (1993), Helixderm merhem yanıkların iyileşme sürecinde (kızarıklık, ödem, ağrı, reenfeksiyon gibi durumlarda) hızlı ve rahat iyileşme sunduğunu belirtmişlerdir (101).

Karayannopoulou vd. (2011), tarafından yapılan çalışmada, alkannin-şikonin bazlı merhem yara iyileşmesi üzerine etkinliği, köpekler üzerinde Laktatlı Ringer solüsyonu (LRS) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. 2-5 yaş aralığındaki on adet karışık cins köpek üzerinde her bir kolun yüzeyine deri defekti oluşturulmuştur. Yaralara günde bir kez, sağ taraftakine alkannin-şikonin bazlı merhem sürülmesi, sol taraftakine de LRS ile yıkanması yoluyla 20 gün süre ile uygulama yapılmıştır. İyileşme sürecinde; doku perfüzyonunun, alkannin-şikonin bazlı merhem ile muamele edilen taraf üzerinde LRS uygulanan kısma göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Histolojik anjiyogenezin (4. ve 11. günde), kolajen üretim skorunun (4.,11., ve 20. günde) ve epitel kalınlığı skorunun (11. günde) alkannin-şikonin bazlı merhem ile tedavi edilen yaralarda anlamlı düzeylerde daha yüksek olduğu bulunmuştur (102).

Lithospermum erythrorhizon kökünün yara iyileşmesindeki etki mekanizması biyokimyasal ve proteomik platformda aktif bileşeni olan şikonin ile birlikte araştırılmıştır. Kökün etanol ekstreleri ve şikoninin her ikisinin de hücre çoğalmasını % 25'e varan oranda yükseltebildikleri belirlenmiştir. Proteomik analiz sonuçları ile kök ekstreleri veya şikonin uygulanan fibroblast hücrelerinde eksprese olan yirmi iki farklı protein tespit edilmiştir. Bu proteinlerin fonksiyonları olan antioksidan aktivite, antiapoptotik aktivite, hücre hareketliliğinin düzenlenmesi, kolajen salgılanması, hücre çoğalmasının teşvik edilmesi gibi özellikler; kökün yara iyileşmesini hızlandırması üzerindeki sinerjik etkisiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, bir hayvan modeli olan Sprague Dawley sıçanları üzerinde kökün yara iyileşmesini hızlandırdığı doğrulanmıştır. Bu bulgular; *L. erythrorhizon* kökünün, yara

iyileşme sürecini indüklemesinin moleküler temelini belirlemeye yardımcı olunmuştur (103).

2.5.1.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan yara iyileştirici aktivite çalışmaları

Arnebia nobilis'ten elde edilen Arnebin-1 (β,β -dimetilakrilşikonin)'in normal ve hidrokortizon uygulanmış hasarlı yaraların iyileşmesi üzerindeki hızlandırıcı etkisi araştırılmıştır. Arnebin-1, hayvanlarda hidrokortizon ile muamele edilmiş veya edilmemiş olan yaralar üzerine günlük topikal olarak uygulanmıştır. Arnebin-1 uygulaması yaranın reepitelizasyon ve kalın granülasyon doku şekillenmesi için hücre çoğalması, hücre göçü ve kalın granüle dokudan damar şekillenmesini desteklemiştir. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaradaki genişlik ve uzunlukta azalma olduğundan, hidrokortizon uygulanmış ve uygulanmamış yaraların iyileşmesi anlamlı biçimde arttırılmıştır. Arnebin-1 uygulanmış yaralarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yara iyileşmesini arttırdığı bilinen transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF β 1) ve fibronektin, kollajen sentezinin arttığı görülmüştür. Bu çalışmada Arnebin-1 uygulaması ile yara iyileşmesi artışının hem transkripsiyon hem de translasyon düzeyinde transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF β 1)'in artan ekspresyonu aracılığıyla olabileceği gösterilmiştir ve Arnebin-1'in steroid ile zarar görmüş yaralardaki iyileşmeyi sağlamak için iyi bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmüştür (104).

Mani vd.'un çalışmasında (2004), *Arnebia nobilis*'ten türetilen şikonin analogu olan 93/637 SA'nın, sıçan tam kesi yaralarında normal ve hidrokortizon-indüklü iyileşmeye olan etkisi değerlendirilmiştir. Günlük % 0.1 oranında polietilen glikol bazlı merhem uygulanan yaralarda, hidrokortizon-indüklü hayvanlardan oluşan kontrol grubundaki yaralarla karşılaştırıldığında kaydadeğer bir küçülme görülmüştür. 93/637 SA uygulamasının, hücre göçü ve neovaskülarizasyon içeren granülasyon dokusu oluşumunu, kollajenizasyon ve reepitelizasyonu teşvik ettiği belirtilmiştir. Yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinen temel fibroblast büyüme faktörü ekspresyonunun kontrollere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (94).

2.5.1.2. *A.densiflora*'nın yara iyileştirici aktivitesi

A. densiflora kökleri Malatya yöresinde yara tedavi etme amacıyla, ılık terayağına batırılıp bir süre bekletilmekte, köklerin çıkarılmasının ardından tereyağının balmumu ile kıvamı arttırılmakta ve buna batırılan bezler yaraların üzerine sarılarak kullanımı bildirilmiştir (22).Aktan (1994) doktora tez çalışmasında, *A. densiflora* kök ekstresinin yara iyileştirici aktivitesi üzerinde durmuştur. Bu araştırmada, ratların sırtlarında oluşturulan tam kalınlık cilt kesisi yaralarına 3 ve 7 gün süreyle ve % 2, 5 ve 10'luk oranlarda uygulanan *A. densiflora* kök ekstresi içeren merhemlerinin yarada ödemi azaltırken, kollajen lif gelişimini ve epitel rejenerasyonunu hızlandırdığını ve epitel kalınlığını arttırdığını belirlenmiştir. Sonuçta özellikle % 5 ve 10'luk dozlarının yara iyileşmesini hızlandırıcı etkilerininin % 5 oranında kullanılan dekspantenol'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (23).

A. densiflora köklerinin *n*-hekzan, kloroform, etilasetat ve metanol ekstrelerinin yara iyileştirici aktiviteleri; erkek Sprague–Dawley fareleri (160–180 g) ve Swiss albino fareleri (20–25 g) üzerinde linear insizyon ve eksizyon yara modelleri üzerinde incelenmiştir. Çalışmada % 1'lik *n*-hekzan ekstresinin, glikol stearat: propilen glikol: likid parafin (3:6:1) ile hazırlandığı merhem, referans olarak kullanılan 0.5 g Madecassol ile her iki yara modeli üzerinde de karşılaştırılabilir düzeyde yüksek etkinlik göstermiştir (105).

A. densiflora kök ekstrelerinin rat damak mukozasındaki yaralara etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bisturi ile ratların damak ortalarında 10 mm çaplı yaralar oluşturulmuştur. Yaraların bulunduğu deney grubuna günde 1 kez % 10 kök ekstresi içeren merhem uygulanmıştır. Yaralanmadan sonraki damak mukoza örnekleri 4., 7., 14. ve 21. günlerde ayrılarak histolojik olarak incelenmiştir. Araştırma sonucunda, % 10 kök ekstresi içeren merhem yara iyileşmesinde aşamalı olarak etki gösterdiği belirlenmiş ve tedavi edici olarak önerilmiştir (106).

2.5.2. Antitümöral aktivite çalışmaları

Son yıllarda kemoterapotikler üzerinde çalışmaların yoğunlaşması sebebiyle alkannin ve şikonin çifti, birçok tümöre ve onların mekanizması üzerine olan antikanser aktivitelerinden dolayı ilgi çekmiştir (4).

Şikoninlerin antitümör aktiviteleri, tümör hücre gelişiminin inhibisyonu ve apoptoz ve nekroptozun indüklenmesi, protein tirozin kinaz inhibisyonu, telomeraz inhibisyonu, anjiyogenez inhibisyonu, DNA topoizomeraz inhibisyonu şeklinde gerçekleşebilmektedir. (107, 108, 109, 110, 111, 4, 10, 112, 113, 114, 115).

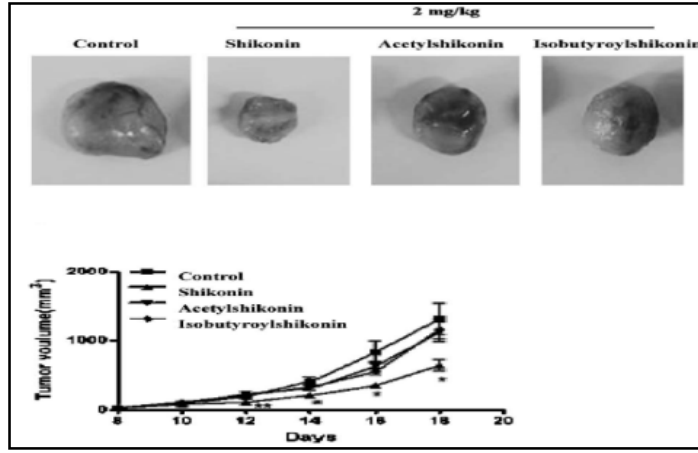
Şikoninin, insan mesane kanseri hücrelerinde (T24) N-asetiltransferaz aktivitesini ve gen ekspresyonunu inhibe ettiği belirleyen Yeh vd. (2004) (116), bunu takip eden çalışmalarında (2007) ise şikoninin T24 hücreleri üzerinde potansiyel apoptotik etkilerini *in vitro* olarak değerlendirmişlerdir (117). Şikoninin oluşturduğu apoptoz indüksiyonu, hücre canlılığı ve morfolojik değişiklikler araştırılarak, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri flow sitometri yöntemi ve ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir. Şikoninin mesane karsinomunun tedavisi için potansiyel bir madde olabileceğine dikkat çekilmiştir.

Operasyon geçirmemiş, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmamış geç evre akciğer kanseri olan 19 kişi üzerinde şikonin karışımı kullanılmasıyla akciğer kanserinin büyümesinin engellendiği ve vücudun bağışıklık fonksiyonunu artırmış olabileceği klinik olarak gözlenmiştir. Tümör çaplarının % 25'in üzerinde azaldığı ve bir yıllık sağ kalım oranı % 47 olarak belirlenmiştir. Tedaviden sonra hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde düzelerek, iştahları ve vücut ağırlıkları artmış, günlük yaşamlarını kendileri idare edebilmişlerdir. Ayrıca akciğer kanserinin neden olduğu öksürük, kanlı balgam ve göğüs ağrısı gibi belirtilerin hafiflemiş olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin seviyeleri ve interlökin-2 düzeyleri artmış, periferik kan yapısı, kalp, böbrek ve karaciğer üzerinde zararlı etkileri olmadığı belirlenmiştir (118).

İki akciğer kanser hücre hattına ait tümör hücreleri üzerinde β -hidroksizovalerilşikoninin etki mekanizması üzerine yapılan çalışmada hücre ölümünün indüksiyonunda güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir (¹¹⁹).

Şikonin türevi olarak sentezlenen 5,8-dimetoksi-1,4-naftokinon S-64 (DMNQ S-64)'ün, A549 akciğer karsinoma hücrelerinde kaspaz 8, 9 ve 3 aktivasyonu ve COX-2 inhibitör aktivitesi ile güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği akış sitometrisi, Western blotting ve ELISA yöntemleriyle belirlenmiştir (120).

Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2008) ise akciğer kanserinde *L. erythrorhizon*'dan izole edilen şikonin ve türevlerinden asetilşikoinin ile izobütirilşikoininlerin tümör gelişimini baskıladıkları ve en etkili bileşiğin ise şikonin olduğu tespit edilmiştir (10) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Şikonin, asetilşikoinin ve izobütirilşikoininin akciğer tümör gelişimini inhibe etmeleri (10)

Lipozomların kontrollü salım ve hedeflenmiş ilaç dağıtımı gibi özellikleri ile yeterli ilaç taşımaları geleneksel formülasyonlarda önemli avantajlar sağlarken, yaygın olarak birçok lipozomal formülasyonun kullanılmasına yol açmıştır, bunlardan bazıları da kanser ilaçlarıdır. Kontogiannopoulos vd.'nin çalışmalarında şikoninin terapötik indeksini arttırmak amacıyla şikonin yüklü lipozomlar hazırlanmıştır. 1,2-dipalmitoilfosfatidilkolin ve yumurta fosfatidilkolini lipidlerinin kullanımıyla şikonin, lipozomlar içine başarılı bir şekilde dahil edilmiştir. Lipozomlar, yüksek yakalama verimliliği ve iyi *in vitro* salınma profili ile iyi fizikokimyasal özellikler göstermişlerdir. Ayrıca lipozomların *in vitro* sitotoksiteleri üç insan kanser hücre hattına (meme, glioma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) karşı test edilmiştir ve büyüme inhibitör aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir (121).

L. erythrorhizon 'dan izole edilen şikoninin, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde apoptozu indüklediği, akış sitometrisi analizi aracılığıyla gösterilmiştir. Şikonin uygulanan hücrelerde apoptik DNA fragmentasyonu oranının doz bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir (122).

Zhang vd. (2009), şikoninin MCF-7 hücrelerinde östrojen biyosentezinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan steroid sülfatazın gen ekspresyon seviyesini düşürdüğünü ve

proliferasyonu engellediğini belirlemişlerdir (123).

Yao ve Zhou'nun çalışmalarında (2010), Shikon'dan izole edilen şikoninin antiöstrojenik aktivitesi meme kanseri hücreleri üzerinde incelenmiştir. Şikoninin östrojen reseptörü α (ER- α) protein düzeyini azalttığı bulunmuştur ve şikonin ER- α pozitif meme kanseri hücrelerinde hormon tedavisi için bir potansiyele sahip olduğu belirtilerek yeni ilaç gelişmeleri için bir hedef olarak önerilmiştir (124).

Yüzbaşıoğlu (2010), *Arnebia purpurea*'nın kök ve toprak üstü kısımlarından hazırladığı ekstraler üzerinde yaptığı izolasyon ve aktivite çalışmaları ile köklerden üçü karışım halinde olmak üzere toplam 5 naftokinonun (izovalerilalkannin, α -metil-n-butilalkannin, izobutilalkannin, asetilalkannin ve alkannin) yapısı spektrofotometrik yöntemler (UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, Kütle spektrometresi) kullanarak aydınlatmıştır. Elde edilen maddelerin sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi ile L929 fare fibrosarkoma hücreleri üzerinde çalışılmış ve 5 naftokinon türevi güçlü sitotoksik aktiviteleri ile öne çıkmıştır (20).

Cui vd (2008), *L. erythrorhizon* köklerinden izole ettikleri 4 hidroksinaftokinon ve *Macrotomia euchroma* köklerinden elde ettikleri 3 naftokinonun (asetilalkannin, izobutilalkannin, 2',3'-epoksialkannin) sitotoksik aktivitelerini insan kolorektal kanser hücrelerinde (HCT116) ve insan hepatoma (Hep G2) hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi yoluyla araştırmışlardır. İzole edilen tüm hidroksinaftokinon türevlerinin her iki tip kanser hücrelerinde de güçlü inhibe edici etkileri olduğu belirlenmiştir. HCT 116 hücrelerinde 0.3±0.09 ile 0.46±1 μ M, Hep G2 hücrelerinde ise 0.22±0.03 ile 0.59±0.06 μ M aralığında değişen IC₅₀ değerleri ile HCT 116 hücrelerinde 0.32±0.02 μ M ve Hep G2 hücrelerinde 0.24±0.03 μ M IC₅₀ değerine sahip olan şikonin kadar etkili oldukları belirlenmiştir. Asetilalkannin, izobutilalkannin, 2',3'-epoksialkanninin IC₅₀ değerleri ise; HCT116 üzerinde sırasıyla (0.34±0.09 μ M, 0.30±0.09 μ M, 0.39±0.08 μ M Hep-G2 hücreleri üzerinde sırasıyla (0.39±0.07 μ M, 0.42±0.03 μ M, 0.34±0.04 μ M) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar hidroksinaftokinon türevlerinin her iki hücre üzerinde de güçlü hücre büyümesini engelleyici etkilerinin bulunduğunu göstermiştir (125).

Antimutajenik aktiviteye sahip olan şikonin insan kolorektal karsinoma COLO 205 hücreleri ve insan lösemi HL-60 hücrelerine karşı güçlü inhibitör etki gösterirken, insan kolorektal karsinom HT-29 hücrelerine karşı daha az inhibisyon göstermiştir. IC₅₀ değerleri COLO

205, HL-60 ve HT-29 hücrelerinde sırasıyla 3.12 μ M, 5.5 μ M ve 14.8 μ M olarak bulunmuştur. Şikoninin, COLO 205 hücrelerinde birçok kompleks mekanizma ile birlikte apoptozu da indüklediğini belirlemişler ve bunun kemoterapide önemli bir mekanizma sağlayabileceğini belirtmişlerdir (126).

İnsan kolorektal kanser hücreleri (HCT-116)'nin gelişiminin inhibisyonunda β,β -dimetilakrilşikinin inhibitör aktivitesi *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. β,β -dimetilakrilşikinin G0/G1 hücre döngüsünü bloke ettiği akış sitometrisi ile gösterilmiştir. Proapoptotik proteinler olan Bax ve Bid'nin indüklenmesi ve antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xl'nin ekspresyonunun azalması da Western blotting yöntemiyle belirlenmiş ve HCT-116'nın baskılanması ile ilişkilendirilmiştir (127).

Kolon kanser tedavisinde, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nü hedefleyen ajanların kullanımı yeni bir gelişme alanı olarak görülmektedir. Buradan yola çıkılarak, Calonghi vd. (2007), yeni bir EGFR inhibitörü olarak kullanılan ve yapısında şikonin ile aynı naftokinon çekirdeği içeren bir molekül olan FR18 üzerinde çalışmışlardır. İnsan kolon kanseri hücre hattı olan HT29'da; FR18'in 10 nM gibi düşük konsantrasyonlarda bile etkin olduğu, EGF'ün EGFR'ne bağlanmasını engellediği, 30 nM'dan 5 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda da apoptozisi harekete geçirdiği akım sitometri, immünopresipitasyon ve Western blot analizi, konfokal spektral mikroskopi ile gösterilmiştir. FR18'in iyi bir anti-tümör potansiyeline sahip bir ajan olduğu ve kolon kanserinin terapötik uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmiştir (128).

Japonya'da yanık tedavisinde kullanılan bir Çin bitkisel merhemi olan Shiunko'dan izole edilen şikoninin; farelerde tümör nekroz faktör α (TNF- α) ve B16 melanoma indüklü anjiyogenezi ve civciv embriyosunun yolk kese membranlarında da normal gelişimsel anjiyogenezi inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca şikoninin, kültüre alınan insan aortik endotel hücrelerinde kapiller benzeri yapıların şekillenerek bağlantı oluşumunu ve proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (129). Singh vd. (2003), şikoninin insan epidermoid kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ve bunu fosforile olmuş apoptoz ile ilişkili proteinlerin hücre içi düzeylerini arttırırken, proliferasyonu ile ilişkili proteinlerin fosforlanma seviyelerini azaltarak (EGFR, ERK1/2 ve protein tirozin kinaz) gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir (110). Başka bir çalışmada ise şikoninin insan habis melanoma hücrelerinde p53 ve kaspaz 9 yollarını aktive ederek hücre gelişimini doz ve

zaman bağımlı bir şekilde önlediği tespit edilmiştir. Burada Bcl-2 protein düzeylerinin azalmış ve Bax protein düzeylerinin artmış olması ile p53 proteininin yüksek ekspresyonunun pozitif korelasyonu vurgulanmıştır (130).

Mao vd.'nin çalışmalarında (2008), kronik miyeloid lösemi hücrelerinde şikoninin apoptozisin indüksiyonunda rol oynadığını belirtmişlerdir. Hücelere 0.5 µM şikonin uygulamasıyla, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin hızlı bir şekilde üretilmesiyle şikoninin kronik miyeloid lösemi tedavisinde umut verici olabileceği belirtilmiştir (131).

L. erythrorhizon hekzan ekstralarının deri kanserine olan etkilerini belirlemek amacıyla, 0.1-10 mg/kg konsantrasyonda ve 3 gün aralıkla 21 gün süre ile intraperitoneal olarak verilerek bu süre sonunda histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. 10 mg/kg dozda uygulanan ekstralarda, melanoma tümör gelişiminde % 43, ağırlığında ise % 36 azalma tespit etmişlerdir (132).

Onosma paniculata köklerinin petrol eteri ekstraktlarının aktivite yönlendirmeli fraksiyonlarında β-hidroksizovalerilşikoinin, asetilşikoinin, dimetilakrilşikoinin ve α-metilbutirilşikoinin ile izovalerilşikoininin karışımı izole edilmiş ve bunların melanoma hücrelerinde apoptozu indükleyici etkileri gösterilmiştir. Tüm bileşikler 8 kanser hücre hattına karşı güçlü bir sitotoksik sergilemişlerdir. Dimetilakrilşikoininin 4 melanoma hücre hattına karşı en güçlü sitotoksik aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, dimetilakrilşikoininin ile α-metilbutirilşikoinin ve izovalerilşikoinin karışımının da bu hücre hatlarının hücre döngüsünün ilerlemesine engel olduğunu ve apoptozu indükledikleri belirlenmiştir (133).

Şikoninden türetilen 1-(1,4-dihidro-5,8-dihidroksi-1,4-diksonaftalen-2-il)-4-metilpent-3-enilfuran-2-karoksilat (SH-7) bileşiği, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda şikoninine oranla daha güçlü bir şekilde topoizomerez I ve daha da güçlü topoizomerez II inhibitör aktivitesi göstermiştir. HL-60 lösemi hücrelerinde apoptozu indükleyici etkisi iyi tanımlanan topoizomerez II aktivitesi yanında az toksisite özelliklerinin SH-7'yi ilaç araştırma ve geliştirmede potansiyel ilaç adayı yaptığı belirtilmiştir (134).

Şikoninin insan promiyelositik lösemi hücreleri olan HL-60 hücrelerinde; etki mekanizması incelenerek kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3 aktivasyonu gibi

apoptozu indükleyen özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (135, 136).

Hashimoto vd. (1999), HL-60 hücrelerine 10^{-6} M'lık konsantrasyonda β -hidroksiizovalerilşikinin uygulamışlar ve DNA fragmantasyonu, nükleer parçalanma ve kaspaz-3-benzeri etkinlik aktivasyonu gibi apoptozun karakteristik özelliklerini gözlediklerini bildirmişlerdir (137).

Chen vd. (2012) da apoptozun indüklenme mekanizması üzerinde çalışmışlardır. Hücre proliferasyonunda şikoninin etkisini MTT aracılığıyla belirlemişlerdir. Şikoninin 1-8 μ g/mL aralığındaki konsantrasyonlarının, HL-60 hücrelerinin çoğalmasını zaman ve doz bağımlı olarak inhibe ettiklerini belirtmişlerdir. 2 μ g/mL konsantrasyondaki şikoninin HL-60 hücrelerinde apoptozu zaman bağımlı olarak indüklediğini tespit ederek bunu Bcl-2'nin ekspresyon seviyesindeki düşüş ile de ilişkilendirmişlerdir (115).

Su vd. 2010, 11 adet şikonin glikoziti sentezleyerek antitümör aktivitelerini *in vitro* olarak araştırmışlardır. Bileşiklerin bazılarının hem ilaç dirençli hem de duyarlı hatlara (MCF-7, HL-60) karşı sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir (138).

Zhou vd. 2010, şikoninden hareketle 22 adet 5,8-O-dimetil açılşikinin türevi sentezlemişler ve sitotoksitelerini karşılaştırmışlardır. Hücre bazlı çalışmalarda dimetil türevleri şikoninle yaklaşık aynı etkiyi gösterdiklerini, bazılarının ise MCF-7 hücrelerinde seçici sitotoksite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Fare karsinomasına subkutan uygulamada 3 bileşiğin ise klinikte antikanser ilaç olarak kullanılan florasilden daha etki olduklarını belirlemişlerdir (139).

İnsan servikal kanser hücreleri olan HeLa hücrelerinin gelişiminin inhibe edilip ölümünün indüklenmesine şikoninin etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, şikoninin zaman ve doza bağımlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği (IC_{50} değeri: 18.9 ± 4.1 μ mol/l) ve apoptozu indüklediği MTT çalışmaları, floresan mikroskopi ve Western blot analizleri ile belirlenmiştir (140, 141). Rao vd. (2011), yeni β -hidroksiizovalerilşikinin analogları sentezleyerek bunların, güçlü antitümör aktivite sergilediklerini HeLa hücrelerinde belirlemişlerdir (142).

Wang ve Ma'nın çalışmasında (2012); 2-metil-n-butil şikoninin, insan mide kanseri hücre hattı SGC-790'da hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (143). Yoshimi vd. 1992, bağırsak karsinomasının gelişiminin inhibisyonunda şikoninin etkili olduğunu göstermişlerdir (144).

Çin'de bitkisel bir terapötik olarak kullanılan ve Zicao'dan izole edilen şikoninin, kültüre alınmış TCA-8113 oral kanser hücrelerinde apoptozisi uyarma yeteneği incelenmiştir. Şikonin TCA-8113 hücrelerine 10-40 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla, apoptozda doz ve zamana bağlı olarak değişen olayların sırasını hücre canlılığı kaybı, kromatin yoğunlaşması, nükleozomlar arası DNA fragmantasyonu ve sub-G1 faz birikimini göstererek ortaya koymuştur. TCA-8113 hücrelerinin apoptozuna proteaz kaspaz-8,-9 ve 3'ün aktivasyonu ve Bcl-2 proteininin düşük ekspresyonu eşlik etmiştir (145).

L. erythrorhizon 'dan izole edilen şikoninin, 1'-OH'ından farklı büyüklükte açil grupları içeren bileşiklerin sentezlendiği bir çalışmada açilşikonin analoglarından kısa zincirli olanların daha güçlü DNA topoizomerez I aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Sentezlenen 32 türevden 15'i şikoninden daha güçlü aktivite gösterirken, asetil, propionil, 4-pentenoil şikonin kamptensinden yaklaşık 4 kat daha güçlü inhibitör aktivite göstermiştir. Etki potansiyelinin artırılmasında, açil kısmının boyutu önemli iken, olefinik çift bağların bulunmasının da yarar sağladığı belirtilmiştir (146). Plyta vd. tarafından yapılan çalışmada (1998), en az 1 fenolik hidroksil grup taşıyan naftokinonların potansiyel topoizomerez I inhibitörü olabilecekleri belirtilmiştir (147).

Kanser ilaç direncininin aşılması; ölüm indükleyicilerin (apoptoz, nekroptoz, otofaji gibi) kombine sınıfının kullanılması yoluyla ve çoklu ölüm yollarının eşzamanlı aktivasyonu ile mümkün olabilmektedir. Bu nedenle kemoterapilerin başarısında; kanserin zayıf noktasının hedeflenmesi kritik bir rol oynamaktadır. Nekroptozun indüklenmesi de bu yollardan biridir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada; kanser ilaçlarının antrasiklin antibiyotikleri, taksanlar, vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler gibi apoptotik indükleyicilere karşı dirençli iken şikonin gibi nekroptotik indükleyicilere karşı duyarlı oldukları gösterilmiştir. Kanser kemoterapisinde özellikle apoptotik ilaç dirençli kanserlerde nekroptozun indüklenmesi kanserin zayıflatılmasında önemli potansiyele sahip olduğundan şikoninlerin bu amaçla kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir (148, 149, 150).

Geleneksel Çin tıbbının kökenini oluşturan Kampo tedavisinde Kampo tıbbi bitkilerinden *L. erythrorhizon*'un sahip olduğu şikonin bileşiği kanser hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksisite göstermektedir. Mikroarray tabanlı araştırmalarla Kampo türevi doğal ürünlerin kanser hücrelerine cevabı moleküler belirleyicilerle gösterilmiştir. Kampo türevi doğal ürünler gelecekte tümör tedavilerinde farmakogenomik stratejiler için değerli bir kaynak depo olabilecektir (151).

Bitkilerden yeni antikanser ajanlarının belirlenmesi amacı doğrultusunda, Sevimli-Gür ve arkadaşlarının, *Alkanna cappadocica*'da diklorometan/metanol (1:1) ekstraktlarını fraksiyonladıkları çalışmada (2010), 4 bilinen (11-deoksialkannin, β,β -dimetilakrilalkannin, 11-O-asetilalkannin ve alkannin) ve 4 yeni bileşik (5-O-metil-11-deoksialkannin, 8-O-metil-11-deoksialkannin, 5-O-metil-11-O-asetilalkannin ve 5-O-metil- β,β -dimetilakrilalkannin) spektroskopik yöntemlerle tanımlanmıştır (LC-ESIMS, 1D ve 2D NMR). İzole edilen bileşiklerin sitotoksisiteleri 12 adet insan kanser hücre ve 2 adet normal hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. 5-O-metil-11-O-asetilalkannin 0.09 ve 14.07 μM arasındaki IC_{50} değeri ile çarpıcı sitotoksisite göstermiştir. Bu bileşiklerden 6 tanesi pozitif kontrol olarak kullanılan etaposit ve deksorubisinden daha etkili bulunmuştur. Tek O-metilli alkannin türevi bileşikler ve bunların sitotoksisiteleri ilk kez belirlenmiştir (152).

2.5.2.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan antitümöral aktivite çalışmaları

A. euchroma'dan elde edilen naftokinon pigmentlerinin mide ve özefagus kanser hücrelerinin çoğalmasını önlediğini 1990 yılında Lu ve Liao'nun çalışmalarıyla açıklanmıştır. Pigmentlerin 5-10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda kaydadeğer antitümör aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (153).

Arnebia nobilis kök ekstrelerinden alınan β,β -dimetil akril şikoninin, antikanser özelliklere sahip olmakla birlikte toksik olduğu gösterilmiştir. Bunun üzerine β -dimetil akrilolil şikoninin çeşitli analogları sentezlenmiş ve bunlardan biri olan 93/637 (SA)'nın β,β -dimetilakril şikonine kıyasla çok daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Şikonin analogu 93/637'nin prostat kanseri hücrelerinin gelişimine olan inhibe edici etkisi gösterilmiş ve prostat kanserinin tedavisinde potansiyel bir terapötik kullanılması önerilmiştir (154). Bir başka çalışmada da 93/637'nin 500 nm'lik konsantrasyonunun lenfoma hücre hatlarında

gelişimi inhibe ettiği ve apoptozu indüklendiği belirlenmiştir (112).

Xiong vd. (2009), *Arnebia euchroma* hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen asetilşikinin antitümör etkisini *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırmışlardır. *In vitro* çalışmalarda insan akciğer adenokarsinoma hücreleri (A549), insan karaciğer karsinoma hücreleri (Bel-7402), insan meme adenokarsinoma hücreleri (MCF-7), fare Lewis akciğer karsinoma (LLC) hücreleri üzerinde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi ile, *in vivo* olarak ise C57BL/6 farelerde LLC modeli ile araştırılmıştır. LLC dokusunda Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonu immunohistokimyasal boyama ile teşhis edilmiştir. A549, Bel-7402, MCF-7 ve LLC hücre hatlarında asetilşikinin hücre çoğalmasını doza bağımlı olarak inhibe etmiştir. Bu hücrelerdeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 5.6±0.86 µg/mL, 6.82±1.5 µg/mL, 3.04±0.44 µg/mL ve 2.72±0.38 µg/mL olarak bulunmuştur. *In vivo* çalışmada ise asetilşikinin, tümör büyümesini baskıladığı ve 2 mg/kg dozdaki asetilşikinin inhibisyon oranının % 42.85 olduğu bulunmuştur. İmmunohistokimyasal boyama sonuçları da asetilşikinin tümör hücre apoptozisini indüklediğini ortaya koymuştur (155).

2.5.3. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Brigham vd. (1999) *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinde epidermal hücrelerdeki üretilen pigmentlerin, toprak bakterilerinin gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir (6).

Bileşiminde *L. erythrorhizon* kök ekstraktlarının bulunduğu Shikon'un yapısını oluşturan naftokinon türevlerinin *in vitro* antifungal aktiviteleri çok sayıda fungal patojenlere karşı incelenmiştir. Bu bileşiklerin mantarlara karşı geniş bir duyarlılıkları bulunduğu kaydedilmiştir. Şikoninin 4 µg/mL'lik MIC değeri ile flukonazolden; maya benzeri mantar olan *Candida krusei*'ye karşı 4, *Saccharomyces cerevisiae*'a karşı 2 kat güçlü, *C. glabrata*'ya karşı ise aynı potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Deoksişikinin ise *C. krusei*'ye karşı 4 kat daha güçlü (MIC; 4 µg/mL), *S. cerevisiae*'ye karşı 3 kat daha güçlü (MIC; 2 µg/mL) aktivite sergilemiştir. Asetilşikinin ve β-hidroksiizovalerilşikinin, *C. krusei* hariç diğer fungal patojenlere karşı standarttan daha düşük aktivite sergiledikleri belirlenmiştir. Filamentli bir mantar olan *Trichosporon cutaneum*'a karşı tüm naftokinonlar

standarttan daha düşük aktivite sergilemiştir. Bu sonuçlar, Şikon preparatının klinik kullanımını için rasyonel bir temel sağlayarak antifungal aktiviteye sahip bir antienflamatuvar ajan olarak tıbbi tedavide kullanılabileceğini göstermektedir (9).

Şikonin ve türevlerinin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Helicobacter pylori* türlerinin gelişimini inhibe edici etkileri belirlendiği gibi (156, 4), ayrıca *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Trichosporon sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Saccharomyces cerevisia* ve *Cryptococcus neoformans* türlerine karşı antiviral aktiviteye de sahip olduklarını gösteren araştırmalar bulunmaktadır (9, 25).

Şikoninin, adenovirüs tip 3 (AdV3)'ün gelişimini önleyici etkisi *in vitro* olarak MTT yöntemi ile belirlenmiştir. AdV3 içindeki Hekzon proteininin ekspresyonu lazer tarama immunfloresans yöntemi kullanılarak konfokal mikroskop ve Western blot analizi ile tespit edilmiştir. Buna ek olarak, AdV3 tarafından enfekte edilen hücrelerin apoptoz oranı da akış sitometrisi ile tayin edilmiştir. 0.0156-1 µM aralığında kullanılan şikoninin AdV3 büyümesini % 23.8-69.1 inhibisyon oranı ile konsantrasyona bağımlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Şikoninin AdV3 içinde Hekzon proteininin ekspresyonunu ve apoptozun derecesini azaltmak yoluyla potansiyel antiviral mekanizmaya ve anti-AdV3 yeteneklere sahip olduğu gösterilmiştir (157).

Ali vd. (2011) çalışmalarında naftokinonların yapıları ile antileishmanial aktivite ilişkilerini araştırmışlardır. 1,4-naftokinonların 2. karbon atomlarına bağlı bir metil veya metoksil grubunun bulunması antileishmanial aktivitesini önemli ölçüde artırırken, bu pozisyonda bir hidroksil grubunun varlığı ise etkinliği azaltmıştır. Yan zincirde hidroksi grubunun bulunması durumunda da etkinliğin arttığı gözlenmiş ve 1-3 µM aralığındaki IC₅₀ değerleri ile şikonin/alkannin türevlerinin önemli ölçüde leishmanisidal olduğu belirtilmiştir (158).

L. erythrorhizon'dan izole edilen 6 şikonin türevi ve 3 şikinofuranın, viral ve mikrobiyal patojenlerde yaygın olarak bulunan sialidaz (glikozil hidrolaz) enzimlerine karşı güçlü ve seçici inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir. Glikozil hidrolaz (GH) 33'e karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi Şikinofuran E gösterirken, GH 34 sialidaza karşı ise çalışılan tüm şikoninler yaklaşık aynı etkiyi göstermişlerdir ve IC₅₀ değerleri 40 µM olarak belirlenmiştir.

Kinetik analizler naftokinonların yarışmasız bir mekanizma ile hareket ettiğini göstermiştir (159).

2.5.3.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Japonya'da geniş bir kullanım alanına sahip olan saflaştırılmış şikonin tıp, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılmaktadır. Şikonin Rusya'da antiinflamatuvar merhem yanık merhemlerinin bileşimine girmiştir. Şikonin geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (5).

Karyagina vd. (2001), *A. euchroma* bükisinin modifiye MS ortamında geliştirdikleri sıvı kültürlerinin sulu etanol ve yağ ekstraktları ile ticari şikoninin antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmışlardır. % 0.005'lik şikonin solüsyonu ile % 0.003'lük şikonin içeren bitki ekstresi kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktivite 37°C de ve 3 gün süreyle geliştirilen *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* kültürlerinde MIC testi ile tespit edilmiştir. Kültür hücrelerinin sulu etanollü ekstraktlarında Gram pozitif bakterilerin gelişim inhibisyonları % 90-95 oranında bulunmuştur. *A. euchroma* sulu etanollü ekstraktlarının ticari antimikrobiyal preparatlarla da karşılaştırıldığı çalışmada, bu ekstraktın jel, sıvı sabun, krem ve antimikrobiyal kozmetiklere alternatif olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca bu ekstraktların antifungal özelliklerini de incelemişlerdir. Patojenik etki gösteren ve deri ile bronşiyal alerjik hastalardan alınan *Candida* ve *Trichosporon* türlerinde ve sağlıklı derilerinden izole edilen 2 *Malassezia sympodialis* türüne karşı olan antifungal aktiviteyi MIC testi ile incelemişlerdir. Maya ya hücrelerini modifiye edilmiş yatık Sabouraud agar ortamında 27°C'de ve 2 gün süreyle geliştirmişlerdir. pH indikatörü bulunan ortamlardaki renk değişimine bakılarak hücre gelişiminin inhibisyonu belirlenmiştir. Şikonin 0-100 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmış ve indikatör rengin yeşil olması ile tamamen inhibe edici konsantrasyonun minimum miktarı belirlenirken, sarıya dönüşüm ile de minimum inhibe edici konsantrasyon belirlenmiş ve antifungistik etki tespit edilmiştir (160).

Shen vd. (2002), tarafından metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli enterekoklara (VRE) karşı *Arnebia euchroma* ekstraktının etkinliği araştırılmıştır. *A. euchroma* ekstraktından biyolojik aktivite rehberli izolasyon çalışmasıyla

elde edilen altı naftokinon türevinin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MIC) 1.56 ve 3.13 µg/mL arasında olduğu ve bu değerlerle 6.25 mg/mL MIC değerine sahip olan alkannin ile şikonine göre daha yüksek anti-MRSA aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Bu türevlerden 7 tanesinin aynı zamanda, anti-MRSA'ya benzer minimum inhibitör konsantrasyonlarda, vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'a karşı anti-VRE etkinlik gösterdikleri de belirlenmiştir. Sentezlenen aromatik ester türevlerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve hiçbirinin test edilen gram negatif bakterilere karşı aktif olmadıkları görülmüştür. Bunların seçilen kanser hücre hatları üzerinde sitotoksisiteleri 0.6-5.4 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar alkannin ve ester türevlerinin, antitümör aktiviteye sahip anti-MRSA ve anti-VRE ajanların potansiyel adayı olduğunu göstermektedir (161).

Arnebia hispidissima'nın petrol eteri ekstresinin ve bu bitkiden elde edilen triterpenlerden β-amirin, β-amirin asetat, lupeol ve betulinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus thuringiensis*'e karşı antibakteriyel; *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizoctonia phaseoli* ve *Penicillium chrysogenum*'e karşı antifungal etkileri disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Referans olarak bakteriler için 1 mg gentamisin; mantarlar için ise mikostatin kullanılmıştır. Petrol eteri fraksiyonu, *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı 14 mm'lik, *Penicillium chrysogenum*'a karşı ise 7 mm'lik inhibisyon zon çapı (IZ) ile maksimum aktivite göstermiştir. Elde edilen triterpenlerden β-amirin'in *E. coli*'ye karşı; (IZ=16 mm) β-amirin asetatın ise *R. phaseoli*'ye (IZ =10 mm) karşı maksimum aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (162).

Hindistan'da geleneksel olarak ülser, çıban, kesikler, kalp rahatsızlıkları ve baş ağrısı, ateş, dil ve boğaz sorunlarının tedavisinde kullanılan *Arnebia hispidissima* köklerinin etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi Singh vd. tarafından bildirilmiştir. İzole edilen izovalerilşikinin 20 µg/mL dozu ile *Enterobacter cloacae*'ye karşı, β,β-dimetilakrilşikinin 65 µg/mL'den yüksek dozlarda *C. albicans*'a karşı en güçlü antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (163).

2.5.3.2. *A.densiflora*'nın antimikrobiyal aktivitesi

A.densiflora ekstresi ve etken maddeleri üzerinde yapılan bir biyolojik aktivite çalışmasında, *Streptococcus agalatica*, *Bacillus subtilis* mikroorganizmalarına karşı inhibe edici etkileri bulunmuştur (24).

A. densiflora köklerinden çözücü olarak n-hekzan kullanılarak elde edilen ekstrenin tıbbi alanda kullanımına yönelik olarak yapılan Bozan'ın çalışmasında *A. densiflora* kök ekstresinin antibakteriyel etkisinin kuvvetli antibiyotik olarak bilinen ampisilin ve eritromisin değerlerine göre daha düşük olmasına rağmen, antibakteriyel sınır olarak kabul edilen MİK değerleri içinde yer aldığı bulunmuştur (106).

Veteriner ve tıp hekimliğinde kan parazitlerine karşı kullanılan *A.densiflora*'dan elde edilen ekstrelerin *Theileria annulata* şizontları ile enfekte periferik mononükleer kan (PBM) hücrelerine karşı etkinlikleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. *A.densiflora* bitkisinden % 4.55 verimle elde edilen n-hekzan ekstrelerinin, çalışılan tüm konsantrasyonlarda (125, 62.5, 25.625, 7.81, 3.91 µg/mL) hem sağlıklı hem de enfekte hücreleri kontrol gruplarındakilere kıyasla anlamlı düzeylerde öldürdüğü belirlenmiştir (164).

Erecevit vd. (2011), geleneksel tıpta tedavi için kullanılan dört farklı familya (Lamiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Hypericaceae)'ya ait 11 taksonun antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Bu taksonların metanol ile hazırlanan ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Trichophyton* sp. ve *Epidermophyton* sp.'ye karşı disk difüzyon metodu ile incelenmiştir. Bu çalışmanın sonunda, *Arnebia densiflora*'nın en yüksek aktivite gösteren 2 türden biri olduğu belirlenmiştir. (inhibisyon zonu 14-40 arasında değişmiştir.) Elazığ Baskil'den toplanan bitkinin çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı etkili olduğu, en yüksek etki gösterdiği türlerin ise *S. aureus* (31 mm), *K. pneumoniae* (27 mm), *C.albicans* (40 mm) ve *C. tropicalis* (32 mm) oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile bitki ekstrelerinin infeksiyonların tedavisinde güçlü birer kaynak olarak kullanılacakları belirtilmiştir (165).

2.5.4. Antienflamatuvar ve antioksidan aktivite çalışmaları

Shikon'un eter ekstrelerinin 50 mg/alan dozunun uygulanması ile histamin, serotonin, bromelain, anti-sıçan tavşan serumu ve sıcaklık ile uyarılmış olan vasküler geçirgenliği ve akut ödemi inhibe ettiği ve ayrıca UV veya dış sıcaklık ile uyarılan bölgesel deri eritemini de baskıladığı belirlenmiştir (95).

Seto vd. (1992), Shikon'un yapısında bulunan şikonin ve türevlerinin granüloma oluşumu ve gecikmiş tip alerjideki etkileri üzerinde çalışmışlardır. Şikoninin indirgenmiş ve pentaasetillenmiş şikonin türevi olan MDS-004'ün granüloma oluşumunu hızlandırıcı etkisi ile kulak ödemi gibi gecikmiş tip alerjilerdeki inhibitör etkisinin şikoninden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. MDS-004 kulak üzerine 1 mg dozda bölgesel olarak uygulandığı zaman okzasolon ve dinitroflorobenzen ile uyarılmış kulak ödemi şikonin gibi güçlü bir biçimde baskılamıştır. MDS-004'ün ağız yoluyla 80 mg/kg dozunda uygulanması ile, karrageenan tarafından uyarılan sıçan pençe ödemi ve 100 mg/kg dozda ise asetik asit tarafından uyarılan gastrik ülserin iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir (166).

Şikoninin sıçanlarda kapillerlerin çoğalması ve kollajen üretiminin artması ile birlikte granülasyon dokusu oluşumunu arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (167, 168, 169).

Şikoninin karrageenan ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, şikonin uygulanan pamuk pelet indüklü granülasyon dokusunda hemoglobin ve hidroksprolin miktarı ile birlikte doku ağırlığı da artmıştır. Ratlarda şikoninle birlikte granülasyon dokusu oluşumunun huzlanmasına kollajen üretiminin artışı ve kapillerlerin proliferasyonu da eşlik etmiştir. Şikonin pençe ödeminde karrageenan gibi az uyarmasına rağmen granüloma şekillenmesini daha fazla arttırmıştır. Bu veriler, şikoninin granülasyon şekillenmesi üzerindeki biyolojik etkisinin altında yatan mekanizmanın karrageenandan farklı olduğunu göstermiştir (168).

Şikonin ve türevlerinin antienflamatuvar etkilerinin, lökotrien B4 (LTB4)'ün biyosentezinin inhibisyonu (170), mast hücrelerinin degranülasyonunun baskılanması ve damar sisteminin korunması, nötrofil salınmasının baskılanması (144), fosfotidilinositol sinyallerinin bozulması ve CC kemokin reseptör 1'e bağlanan kemokin lijantlarının blokajı (171) gibi çeşitli aktivitelerin mekanizmaları ile bağlantılı olduğu araştırmalarla gösterilmiştir.

Subbaramaiah vd. (2001) tarafından siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörlerinin belirlenmesi amacıyla 266 bitki ve 968 ekstrakt taranmıştır. *Arnebia euchroma*'nın da içinde bulunduğu 12 bitkide COX-2 aktivitesinin inhibe edici etki belirlenmiştir (172).

Tümör nekroz faktör α (TNF- α) enflamatuar hastalıkların patogenezinin katkı sağlamaktadır ve yeni antiinflamatuvar ilaçların geliştirilmesi için bir hedef olmuştur. Şikoninin; insan TNF- α promotorunun transkripsiyonal aktivasyonunu inhibe ettiği ve mRNA ekspresyonu ile protein üretimini baskıladığının belirlendiği bir çalışmada antiinflamatuvar terapötik olarak kullanılabileceği önerisi getirilmiştir (173).

Alkanna tinctoria kök ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkilerini ve yapı aktivite ilişkisi üzerinde çalışmışlardır. Alkannin ve şikoninin her ikisinin de monomerik ve oligomerik yapıları ile ester türevlerinin yüksek radikal süpürücü aktivitelerinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Aktivite üzerinde ana iskelet olan naftokinon yapısının major rolü bulunurken, yan zincirlerin minör etkili olduğu belirlenmiştir (174).

Takano-Ohmuro vd. (2008), bitkisel ilaç olan "Shikon"un içeriğindeki şikoninin enflamasyonu baskılamadaki moleküler hedefleri üzerinde çalışmışlar, insan bazofil degranülasyonuna yanıt verilmesinde şikoninin etkisini incelemişlerdir. Şikoninin doza bağımlı olarak anti-IgE antikoruna ile indüklenen bazofillerden histamin salınımını inhibe ettiği $2.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$ değerindeki IC_{50} değeri ile belirlenmiştir (175).

Şikoninlerin güçlü antioksidan ve radikal süpürücü etkiye de sahip oldukları tespit edilmiştir. Antioksidatif aktiviteleri; O_2 , süperoksit anyon radikali ($\cdot\text{O}_2$), hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi birçok reaktif oksijen türüne, DPPH radikaline, LDL oksidasyonuna, demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonuna karşı etkileri ile belirlenmiştir (7, 176, 177).

Şikoninin yüzeysel antiinflamatuvar etkisi kulak ödemi üzerinde incelenmiştir. Her kulağa günde 1 mg şikonin yüzeysel olarak uygulandığında ödemi azalttığı, COX-2 ekspresyonunu % 70, uyarılabilen nitrik oksit sentaz seviyesini de % 100 oranında azalttığı belirlenmiştir. (178).

Lu vd. 2011, *L. erythrorhizon*' dan ekstrakte edilen şikoninin 4 mg/kglık dozunun en etkili antiinflamatuvar ajan olan dekzmetazonun 2.5 mg/kg'ı ile aynı etkiye sahip olduğunu *in vivo*

çalışmaları ile belirlemişlerdir. Şikoninin 1 mg lık uygulamasıyla yaklaşık % 45; 4 mg/kglık uygulamasıyla ise % 65 oranında inhibisyon sağlanmıştır. Şikoninin bu etkiyi proteazom inhibisyonu ile gerçekleştiği belirtilmiştir (179).

2.5.4.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan antienflamatuvar ve antioksidan aktivite çalışmaları

Tanaka vd. (1986), Çin'de bitkisel bir preparat olan Zicao'nun; petrol eteri, kloroform, alkol ve sulu ekstralarının oral olarak 500 mg/kg dozunda verilmesiyle, karragenin tarafından uyarılmış sıçan-pençe ödeminin % 27-65 aralığında baskılandığı belirlemişlerdir. Ayrıca bu etkide enantiyomerlerin R ve S formlarının arasında fark bulunmadığı da belirtilmiştir (180).

Kaith vd. (1996) *A. euchroma*'nın köklerinin petrol eteri, kloroform, alkol ve sulu ekstralarının antienflamatuvar aktivitelerini karragen ile indüklenmiş fare pençe ödemi metotunu kullanarak araştırmışlardır. 100-150 g ağırlığında albino farelere ekstraların 500 mg/kg konsantrasyondaki dozları uygulanırken, kontrol grubuna % 1'lik tuz içeren taşıyıcı çözelti, standart olarak kullanılacak gruba ise ibuprofen 50 mg/kg dozda oral olarak verilmiştir. 300 dk sürede ekstraların maksimum inhibisyonları sırasıyla % 61.2, 45, 27.5 ve 60 olarak bulunmuş ve bu değerlerin % 61.6 oranında inhibisyon gösteren referans ilaç olan ibuprofenle kıyaslanabilir düzeyde oldukları gösterilmiştir (181).

Lin vd. (1980)'un çalışmalarında, *A. euchroma*'dan elde edilen asetilşikinin histaminle indüklenen kapiller permeabilite, fare pençe ödemi ve koton pellet ile oluşturulan granülomu inhibe ettiğini ve bunun yanında böbreküstü bezi çıkartılmış farelerde de antienflamatuvar etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca farelerdeki LD₅₀ değerinin 22.75 mg/kg olduğunu belirtmişlerdir (182).

A. hispidissima'nın etanolik ekstresi ve bu ekstreden kromatografik metotlar ile elde edilen arnebin-5, arnebin-6, terakrilşikinin, arnebinon ve asetilşikinin antienflamatuvar aktiviteleri, fareler üzerinde oluşturulan karragen ile indüklenmiş pençe ödemi ve komplet Freund adjuvanı (CFA) ile indüklenmiş kronik artrit deneyleri ile araştırılmıştır. Karragen ile indüklenen fare pençe ödemi deneyinde 150-200 g ağırlığında erkek Wistar, CFA ile indüklenmiş kronik artrit deneyinde ise 25-30 g ağırlığında Swiss albino fareler

kullanılmıştır. Kontrol grubuna % 2'lik tuz çözeltisi verilmiş, standart olarak ise asetilsalisilik asitin etanoldeki % 1'lik çözeltisi kullanılmıştır. Arnebinonun 5 mg/kg'lık dozu ile; 8 saat sonunda karragen ile indüklenmiş akut artrit'in inhibisyonunda % 27.17, birinci günün sonunda ise CFA ile indüklenmiş kronik artrit'in baskılanmasında % 62.45 inhibisyon değeri ile çalışılan bileşikler arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile *A. hispidissima*'nın etanol ekstresinin ve başta arnebinon olmak üzere tüm naftokinon türevlerinin anlamlı düzeyde antienflamatuvar aktivitelerinin bulunduğu gösterilmiştir (183).

Singh vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada (2004) da *A. hispidissima*'nın *n*-hekzan ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen arnebin-1, arnebin-7, tiglik asit, alkannin, arnebinol ve sikloarnebin-7 naftokinonlarının antienflamatuvar etkileri, yine fareler üzerinde oluşturulan karragen ile indüklenmiş pençe ödemi ve komplet Freund adjuvanı (CFA) ile indüklenmiş kronik artrit modelleri ile araştırılmıştır. Her iki deneyde de kontrol grubuna tuz çözeltisi verilmiş, standart olarak ise % 1 karboksimetilselüloz içinde asetilsalisilik asit (50 ve 100 mg/kg dozlarda) çözeltisi kullanılmıştır. Farelere *n*-hekzan ekstresinin 100 ve 500 mg/kg'lık, naftokinonların ise 50-100 mg/kg'lık konsantrasyonları uygulanmıştır. Karragen ile indüklenmiş akut artrit'in inhibisyon deneyinde 4-6 haftalık, 150-200 g, erkek Wistar albino fareler üzerinde sikloarnebin-7'nin 50 mg/kg'lık dozunun 4. saatin sonunda % 56.3 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. CFA ile indüklenmiş kronik artrit'in baskılanmasında ise 4-6 haftalık 25-30 g, erkek Swiss albino farelere 50 mg/kg'lık dozda uygulanan arnebin-1'in 1. günün sonunda % 60.4 oranındaki inhibisyon etkisi saptanmıştır ve her iki metotta da *n*-hekzan ekstresi ve naftokinonların özellikle de arnebin-1'in anlamlı düzeyde antienflamatuvar etki gösterdikleri belirtilmiştir (163).

Şikonin ve açılşikonin türevlerinin radikal süpürücü etkilerinin incelendiği bir çalışmada açıl türevlerinin yüksek radikal süpürücü aktivitelerinin bulunduğu belirlenmiştir (184).

2.5.4.2. *A. densiflora*'nın antienflamatuvar ve antioksidan aktivitesi

Aktan (1994), *A. densiflora* kök ekstresini pençe ödemi oluşturan hayvanlara günlük 1, 3 ve 5 mg/kg'lık dozlarında intraperitoneal yol ile uygulamak suretiyle gerçekleştirdiği çalışmasında antienflamatuvar aktivite belirlemiştir (23). Bu etkinin, 5 mg/kg'a kadar doz

bağımlı olup ve 3 mg/kg dozundaki diklofenak sodyumun etkisine eşit güçte olduğu tespit edilmiştir. Ekstrenin 3 mg/kg'lık dozu ile % 38 ödem inhibisyonu gerçekleştiren ekstrenin antiinflamatuvar etkisinin damar permeabilitesini azaltmasının yanında prostaglandin sentezini de inhibe etmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Arnebia densiflora'nın kök, gövde ve çiçeklerinin kloroform, etil asetat, metanol ve sulu ekstresinin asetilkolinesteraz inhibisyon değeri, ELISA mikroplak okuyucu kullanılarak; antioksidan aktivitesi ise DPPH radikal süpürme testi ve Fe²⁺-ferrozin test sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, kök metanol ve sulu ekstrelerinin 200 µg/mL 'lik konsantrasyonda orta derecede DPPH radikal süpürücü etki gösterirken, tüm ekstrelerin standart olarak kullanılan butilhidroksianisole oranla daha iyi demir iyonu bağlayıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Sadece kök kloroform ekstresi 62.5 µg/mL de asetilkolinesteraza karşı orta derecede inhibisyon göstermiştir (185).

2.5.5. Diğer etkileri ve kullanımına ilişkin çalışmalar

Chen vd. (2002), Çin bitkisel terapotiği olan Zicao'nun aktif bileşenlerini oluşturan *L. erythrorhizon* 'dan izole edilen şikoninin, çeşitli etki mekanizmalarıyla hücre içi ve hücreler arası kompartmalarda çoklu hedefleri ile protein-protein etkileşiminde etkili bir inhibitör olduğu hipotezini geliştirmişlerdir. Bu genel inhibitör etkisi ile şikoninin, geniş bir biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (186).

Şikoninin 0.5 µg/mL konsantrasyonu *Entamoeba histolytica* üzerinde anti-amibik etki göstermiştir (5).

Onosma armenicum'dan izole edilen asetilşikinin sıçan midelerinde etanolle oluşturulan mide hasarına (ülser) ve mide dokusundaki bazı oksidan-antioksidan parametrelere olan etkisi araştırılmış ve doku örneklerinde histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Bu araştırma ile 40 mg/kg düzeyinde verilen asetilşikinin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz enzim aktivitelerini ve nitrik oksit düzeyini arttırdığı ayrıca malonilaldehit düzeyini ve miyeloperoksidaz aktivitesini azaltarak antiülser etki gösterdiği belirtilmiştir (187).

Şikonin kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve astım alerjilerini baskılamaktadır. Alerjik hastalıklar için ilaçların taranmasında yeni bir platform sağlamıştır (188).

Kamei vd. (2002), çalışmalarında glukoz alımını düzenleyen insüline benzer küçük moleküller keşfetmek amacıyla 3T3-L1 adipositlerinde hücre esaslı glikoz alımı tarama testi kullanmışlardır. Şikoninin glukoz alımını düzenlediği ve insüline düzenlenen glukoz alımının potansiyelini konsantrasyon-bağımlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir (189). Lee vd. 2010 tarafından da şikoninin, 3T3-L1 adipositlerinde yağ damlacıklarının oluşumunu ve trigliserit birikimini inhibe ettiği bulunmuştur. Trigliserit birikiminin inhibisyonu için IC₅₀ değeri 1.1 µM olarak bulunmuştur.

Andrikopoulos vd. (2003), naftazarinlerin LDL oksidasyonuna karşı % 27-64.1 oranlarında koruyucu etki gösterdiklerini *in vitro* olarak belirlemişlerdir (190).

Hu vd. (2004), *Macrotomia euchroma* köklerinden izole edilen asetilşikonin ve β,β-dimetilakrilşikonin rat torasik aortunun vasküler fonksiyonunu endotel bağlı olarak iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Agonist indüklü (asetilkolin ve histamin) gevşemenin konsantrasyon bağlı olarak inhibe edildiği 0.2-1.5 µM aralığında bulunan IC₅₀ değerleri ile belirlenmiştir (191).

Ozgen vd. (2006)'un çalışmalarında, Türkiye'de yara iyileştirici ve yanıklarda geleneksel olarak kullanılan *Onosma argentatum* köklerinin n-hekzan-diklorometan ekstraktlarından izole edilen deoksişikonin, asetilşikonin, 3-hidroksi-izovalerilşikonin ve 5,8-O-dimetil asetil şikoninin, insan amniyon fibroblastların büyümesinin düzenlenmesindeki etkileri belirlenmiştir. 4 bileşiğin 0.05-5 µg/mL konsantrasyonlarında insan amniyon fibroblastları büyümesinin düzenlenmesindeki etkileri görülürken, sitotoksitelerinin 5-50 µg/mL aralığında olduğu belirlenmiştir (192).

Şikonin ve türevlerinin yağlı solüsyonları UV ışınlarına karşı koruyucu özelliğe sahiptir (4).

Ishida ve Sakaguchi (2007), *L. erythrorhizon* kök ekstraktlarında bulunan naftokinonların ciltte biyolojik değişikliklerin önemli bir tetikleyicisi olan ve deride hasara yol açan UVB'nin zararlı etkilerine karşı epidermal hücreleri koruyucu olduğunu belirtmişlerdir

(193).

Zhao vd. (2008); şikoninin insan solunum yolu düz kas hücreleri üzerinde proliferasyonu önleyici etkisini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Trakeden alınan solunum yolu düz kas hücreleri ile oluşturulan doku kültürleri, 0 (kontrol grubu), 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/mL şikonine 12, 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakılmış ve hücre poliferasyonu kolorimetrik olarak belirlenmiştir. 20 ve 40 µg/mL şikonin uygulanan hücrelerde özellikle 48 saat sonra hücre proliferasyonunda sırasıyla % 30.1 ve 42.9 oranında inhibisyon gözlenmiştir (194).

Lee vd.'un çalışmalarında (2008), *L. erythrorhizon*'dan süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile hazırlanan kırmızı pigmentlerin, etanol ile ekstre edilenlere göre daha stabil oldukları belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları 400 bar ve 60°C olarak belirlenmiştir. Yama testlerinde kırmızı pigmentlerin % 10'a kadar cilt tahrişi açısından kabul edilebilir olduğu ve kozmetik renklendirici ürünlerde süperkritik olarak ekstre edilen şikonin ve türevlerinin kırmızı pigment olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (195).

Wang vd. (2009) Zicao'dan elde edilen şikoninin lupus nefritine potansiyel koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. 28 haftalık lupus nefritli 60 adet dişi farelere vücut ağırlığına göre 24.40 mg/kg şikonin 14 hafta süreyle oral olarak verilmiştir. Şikoninin, böbreklerde hücre adezyon moleküllerinin mRNA ekspresyonunu baskılayarak DNA'nın inhibisyonuna katkı sağlamasıyla lupus nefriti üzerindeki terapötik etkisini ilişkilendirmişlerdir (196).

Kim vd. 2010, şikoninin romatoid artrit üzerindeki terapötik etkisini incelemişlerdir. Farelere oral yolla günde 2 mg/kg doz ile ve 35 gün süre ile verilen şikoninin, kemik yoğunluğunu arttırdığı, kıkırdak yapısını koruyucu olduğu ve eklemlerdeki şişliği ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Şikoninin kullanımı ile romatoid artrit şiddetinde belirgin bir azalma tespit edilmiştir (197).

Şikonin, vücutta geniş kitleye sahip olan iskelet kaslarında, glukoz homeostazisini arttırmada etkili olduğu tespit edilmiştir. Şikonin diabetik Goto-Kakizaki sıçanlarda, plazma glukoz seviyeleri ve insülin hassasiyeti ölçülmüştür. Karın içine şikonin 10 mg/kg konsantrasyonda günde 1 kez olmak üzere 4 gün süreyle uygulanmıştır ve plazma glukoz seviyelerinde kaydedeğer azalma görülmüştür. İnsülin hassasiyet testinde ise 0.5 U/kg insülinin enjeksiyonuyla şikonin uygulanan ratlarda daha düşük plazma glukoz seviyesi

görülmüştür. Şikonin, iskelet kası hücrelerinde glukoz alımını, insülin bağımsız olarak aracılığıyla kalsiyuma bağı olarak arttırmaktadır (198).

Gwon vd. (2012), *L. erythrorhizon*'un etanol ekstresinin obeziteye olan etkilerini değerlendirmek amacıyla, fareleri ekstre takviyesi ile ya da ekstre takviyesi olmadan normal veya yüksek yağlı diyet ile 8 hafta boyunca beslemiştir. Ekstre, yüksek yağlı diyetle bağı olarak artan vücut ağırlığı, beyaz adipoz doku kütlesi, serum trigliserid, total kolesterol ve hepatik lipid düzeylerini düşürürken lipojenik ve adipojenik gen ekspresyonu da azaltmıştır. Ayrıca, ana bileşik olan asetilşikinin doza bağımlı olarak adiposit farklılaşmasını baskılamıştır. Bu bulgular, *L. erythrorhizon* 'un adipogenezis yolağı ile ilişkili genlerin baskılanması yoluyla obeziteyi önlediğı belirtilerek obezitenin önlenmesinde yararlı bir besin takviyesi olabileceğini düşündürmektedir (199).

2.5.5.1. *Arnebia* türlerinin diğerk etkileri ve kullanımına ilişkin çalışmalar

Yao vd (1991) *A. euchroma* köklerinden elde ettikleri ekstrelerin, prostaglandin biyosentezi üzerine olan inhibitör etkisi üzerinde *in vitro* olarak çalışmışlardır. Köklerin 750 µg/mL konsantrasyonundaki sıcak su ekstrelerinin prostaglandin sentetaz enzimini % 35 oranında inhibe ederken, kloroform ekstrelerinin 200 µg/mL'lik konsantrasyonu ile % 73.5 oranında inhibisyon sağlanabildiğini belirlemişlerdir (200).

A. euchroma köklerinden izole edilen 4 şikonin türevinin; kollajen ve araşidonik asit, platelet aktive edici faktör, adozin difosfat veya trombin tarafından indüklenen tavşan plateletlerinin agregasyonunu derişime bağı olarak baskıladıkları belirlenmiştir. Kollajen indüklü platelet agregasyonunun inhibisyonunda asetilşikinin, terakrilşikinin, β,β-dimetilakrilşikinin ve şikoninin IC₅₀ değerleri sırasıyla 2.1, 2.8, 4.2, 10.7 µM olarak belirlenmiştir. Rat aortunda şikonin ve asetilşikinin yüksek potasyum ve norepinefrin indüklü kasılmaları inhibe ederken, terakrilşikinin ve β,β-dimetilakrilşikinin norepinefrinin yol açtığı fazik kasılmaların etkisini arttırdığını göstermişlerdir (201).

Benzer bir çalışmada Ko vd (1995), asetilşikinin derişime bağı olarak; araşidonik asit, U46619, platelet aktive edici faktör ve trombin tarafından uyarılan tavşan plateletlerinden ATP salımını ve agregasyonu baskıladığını belirlemişlerdir. Kollajen, platelet aktive edici faktör ve

trombinin neden olduğu tromboksan B2 şekillenmesi asetilşikonin tarafından baskılanırken, araşidonik asitten prostaglandin veya tromboksan B2'nin şekillenmesinin baskılanmadığı tespit edilmiştir. Asetilşikoninin, fosfotidilinositolun yıkılmasının baskılanması yoluyla aktivite gsterdiği bildirilmiştir (202).

Hindistan'da yapılan etnobotanik bir çalışmada *Arnebia benthamii*'nin hardal yağında bekletilmiş köklerinin halk arasında sa çıkartma amacı ile kullanıldığı bildirilmiştir (203). Nepal'in batısında ise *A. benthamii*'nin kurutularak toz haline getirilen köklerinin kan temizleyici, soğuk algınlığı ve vücut ağrılarını iyileştirici olarak halk arasında kullanımının yanında yağda bekletilmiş köklerinin de sa çıkartma amacıyla ve sa boyamada da kırmızı rengi dolayısıyla kullanıldığı belirtilmiştir (204).

2.5.5.2. *Arnebia densiflora*'nın diğer etkileri ve kullanımına ilişkin alışmalar

Aktan (1994) *A. densiflora* kök ekstresinin antienflamatuvar, analjezik, yara iyileştirici ve karaciğer üzerine olan etkilerini incelediği çalışmasında ekstrenin doz bağımlı olarak analjezik ve antienflamatuvar etki gsterdiğini ve bu etkinin diklofenak sodyuma yakın olduğunu belirlemiştir. Ayrıca ekstrelerin 5 mg/kg dozuna kadar karaciğer hücreleri ve enzimleri üzerine belirgin toksik etkileri olmadığı *in vivo* deneylerle tespit edilmiştir (23).

A. densiflora ekstresi üzerinde yapılan stabilite ve toksisite çalışmalarında, şikonin türevlerinin asidik ortamda stabil kaldıkları, sıcaklığın ve ışığın etkisiyle bozunma hızlarının arttığı gözlenmiştir. Fareler üzerinde yapılan toksisite çalışmalarında ise LD₅₀ değerı 17.83 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Bu değerle Resmi Gazete'de yayınlanan kullanılmasına izin verilen gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılan boyar maddelerle karşılaştırıldığında kullanım sınırına girdiği ve tıbbi formlasyonlann bileşimine girebileceği belirtilmiştir. Alkannin ve şikoninler Color İndex'te Natural Red ve Shikon veya Tokyo Violet olarak yer aldığı ve alkanninlerin gıda katkı maddesi olarak FAO/WHO komitesi tarafından kabul edildiği vurgulanmıştır (24).

Ağmil (1998)'in çalışmasında; Boraginaceae familyasına ait İç Anadolu Bölgesi'nden toplanmış *Arnebia densiflora* köklerinin içerdiği boyanın saf yönden dokunmuş kumaş parçaları üzerindeki boyama özelliği 8 farklı boyama metodu ile incelenmiş , esitli tonlarda

renkler elde edilmiş ve renk değişimi, yıkama ve ışık haslıkları değerlendirilmiştir (205).

2.6. Şikonin ve Türevlerinin Analizine İlişkin Fitokimyasal Çalışmalar

Ikeda vd. (1991)'ın çalışmalarında ticari şikoninlerde ve çeşitli Boraginaceae bitkilerinde; alkannin ve şikonin enantiyomerlerinin karışım halinde çeşitli oranlarda buldukları belirtilmiştir (Şekil 5.12). 3 ticari şikonin standardında şikonin:alkannin oranlarının 62:38 (Wako Pure), 72.9:27.1 (Ichimaru Pharcos), 16.6:83.4 (Funakoshi Pharmaceuticals) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. 3'üncü şikonin standardında ise şikoninden çok alkannin bulunduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde ticari alkannin standardında da şikonin:alkannin oranı 93.1:6.9 (Funakoshi Pharmaceuticals) olarak tespit edilmiştir. Hidrolize edilmiş birinci ticari şikonin örneğinin (62:38, Wako Pure), ters faz HPLC kromatogramında izomerler ayrılmamış ve aynı alıkonma zamanında (5.54. dk) görülüp, normal faz kromatogramında ise kiral kolon ile izomerler ayrılmış, şikonin 14.44., alkannin ise 20.54. dk'da tespit edilmiştir (28).

Yine bu çalışmada farklı bölgelerden toplanan bitki köklerinde ve bir kallusta şikonin:alkannin oranını incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Bitki	Toplandığı yer	Şikonin:alkannin oranı
<i>L. erythrorhizon</i>	Kyoto, Japonya	93.4 : 6.6
<i>L. erythrorhizon</i>	Hokkaido, Japonya	86.0 : 14.0
<i>L. erythrorhizon</i>	Ko-shikon (Yingzicao), Çin	84.4 : 15.6
<i>L. erythrorhizon</i> kallus		83.6 : 16.4
<i>A. euchroma</i>	Nan-shikon (Ruanzicao), Çin	2.6 : 97.4
<i>Alkanna tinctoria</i>	Türkiye	1.0 : 99.0
<i>Alkanna tinctoria</i>	Yunanistan	3.1 : 96.9

Şekil 2.12. Çeşitli Boraginaceae bitkilerinde karışım halinde bulunan şikonin ve alkannin enantiyomerlerinin oranları (28)

Ticari ilaç olarak kullanılan Zicao'nun içeriğini oluşturan 6 Boraginaceae türünün kök ve kök kabuklarında bulunan naftokinon pigmentleri (şikonin, asetilşikonin, β , β -

dimetilakrilşikinin) belirlendiği çalışmada ayrıca çeşitli ilaçların ana bileşenleri de tespit edilerek kaliteleri üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir (206).

L. erythrorhizon köklerinde şikonin türevlerinin enantiyomerlerini belirlemek amacıyla bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Chiracel AD kolonda hareketli faz olarak % 5 izopropanol içeren n-hekzan 1 mL/dk akış hızı ile kullanılmış ve *L. erythrorhizon* kökündeki şikonin/asetilşikinin veya alkannin/asetilalkannin oranları belirlenmiştir. Bu madde çiftlerinin oranları arasındaki korelasyonun bitkinin köken aldığı ülke için karakteristik olduğu tespit edilmiştir. Kore kökenli tüm türlerde şikonin/asetilşikinin ve alkannin/asetilalkannin oranının Çin kökenli olanlardan önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (207).

Bir şikonin türevidir olan propionilşikinin izolasyonu ilk kez, *L. erythrorhizon* köklerinden silika jel kolon kromatografisi ve preparatif İTK ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen pigmentin yapısı NMR ve kütle spektroskopisi analizi ile tespit edilmiştir (208).

Kore'de yetiştirilen *L. erythrorhizon* köklerinden beş adet şikonin türevinden deoksişikinin, şikonin, asetilşikinin, izobutilşikinin ve β -hidroksiizovalerilşikinin izole edilmiştir. Saflaştırılan kırmızı renkli pigmentler asidik, nötr ve alkali pH değerlerinde sırasıyla, kırmızı, mor ve mavi oldukları belirtilmiştir. Bunların ısı ve ışığa karşı fiziksel stabiliteleri, olası değerde eklenen gıda renklendiriciler için sulu çözelti içinde araştırılmıştır. Termal degradasyon reaksiyonları pH 3.0'te (50 mM glisin tamponu) % 50 EtOH/H₂O ortamında gerçekleşmiştir. Deoksişikinin ($t_{1/2}$ =14.6 saat, 60°C) ve izobutilşikinin ($t_{1/2}$ =19.3 saat, 60°C) diğer şikonin türevlerine ($t_{1/2}$ =40-50 saat, 60°C) göre kısmen daha az kararlı oldukları belirlenmiştir. İzole edilen pigmentlerin termal bozunma aktivasyon enerjileri hesaplanarak aktivasyon enerjisinin, deoksişikinde en yüksek (12.5 kcal/mol), β -hidroksiizovalerilşikinde ise en düşük (1.71 kcal/mol) olduğu bulunmuştur. Pigmentlerin ışık stabiliteleri birbirine yakın olup fotodegradasyonun yarılanma ömrü değerleri 20000 lux ışık yoğunluğu için 4.2-5.1 saat olarak tespit edilmiştir (209).

Sağlık ve kamu otoriteleri tarafından, enantiyomerik ilaçların geliştirilmesinde ve onaylanmasında, çeşitli deneysel koşullar altında farmasötik formülasyonlarda bulunan enantiyomerlerin kararlılıklarının ve stabilitelerinin kontrolü için başlangıç maddesi ve son

ürünün enantiyomerik saflığının kontrol edildiği analiz metotlarının tam belgeleri istenmektedir. Assimopoulou ve Papageorgiou (2004)'da çalışmalarında *Alkanna* kök örneklerinin kullanıldığı birçok ticari preparatta alkannin ve şikonin enantiyomerlerinin oranları araştırmışlardır. Burada, alkannin ve şikonin enantiyomerlerinin oranlarının biyolojik aktivitelerini etkilemediği belirtilmiştir. Işık, hava ve sıcaklık ticari örneklerdeki alkannin ve şikonin oranlarını değiştirmemiştir (210).

Polimerizasyonun; alkannin, şikonin ve bunların türevleri gibi doğal olarak ortaya çıkan izohekzenilnaftazarinler (IHN)'in eczacılık, kozmetik ve gıda renklendiricilerde kullanımlarını önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir (211, 212). Bu etkinin antimikrobiyal aktivitenin azalması, aktif monomerik IHN türevlerinin azaltılması, çözünürlüklerinin düşürülmesi, kırmızı renklendirmelerde parlamanın azalmasına yol açarak gerçekleştiği belirtilmiştir.

Papageorgiou vd. 2002, farklı coğrafik bölgelerden toplanan *A. tinctoria* kökleri ile ticari alkannin ve şikonin numunelerinin polimerizasyon derecelerini moleküler elek kromatografisi ile belirlemişler ve ayrıca zeytinyağı ile ekstraksiyon şartlarında polimerizasyon açısından optimizasyonu sağlamışlardır. Bu çalışma ile nihai ürün olan Helixderm merhemini biyolojik aktivitesini arttırmayı amaçlamışlardır (211). Assimopoulou ve Papageorgiou (2004) ise çalışmalarında, IHN polimerizasyonu üzerine, çeşitli önemli değişkenlerin (işleme ve depolama) etkisini yine moleküler elek kromatografisi aracılığıyla araştırmışlardır. Burada, hidroksinaftokinon polimerlerinin konsantrasyonlarının; sıcaklık ve çözücü polariteleriyle anlamlı şekilde artarken, hava ve ışığa maruz kalma durumlarında önemli şekilde etkilenmediği belirtilmiştir. Düşük sıcaklıklar, IHN ve hidroksinaftokinon içeren farmasötik preparatların endüstriyel şartlarının optimizasyonunda önerilmiştir. IHN içeren kozmetik ve ilaç preparatlarının hazırlanmasında endüstriyel şartların optimizasyonunda aktif monomerik IHN fraksiyonlarının en yüksek seviyeye ulaştırılması gerektiği belirtilmiştir (211). Assimopoulou ve Papageorgiou (2004), bir başka çalışmada IHN polimerizasyonunda alkali ortamın etkisini ve IHN esterlerinin hidrolizini moleküler elek kromatografisi ile araştırmışlardır. IHN esterlerinin hidrolizi ve hidroliz şartlarının optimizasyonu sırasında polimerik alkannin, şikonin ve IHN oluştuğunu belirtmişlerdir. Köklerden IHN'in polar olmayan çözücülerle ekstraksiyonunu takiben yapılan hidroliz işlemi ile polimerik IHN, alkannin ve şikonin oluşumunun en aza indirgenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca alkali ortamda IHN esterlerinin hidrolizi sırasında, asidifikasyondan

sonra fenoksil radikallerine semikinonların eklenmesiyle polimerik IHN yapılarının meydana geldiği belirlenmiştir (213).

Lu vd. (2004) Çin tıbbi bitkisi olan *L. erythrorhizon* 'dan HSCCC aracılığı ile şikonin izolasyonu ve saflaştırılması üzerinde çalışmışlardır. Preparatif HSCCC'de n-hekzan-etilasetat-etanol-su (16:14:14:5) ile iki fazlı solvan sistemi oluşturularak 200 dk içerisinde ayırım gerçekleştirilmiştir. % 38.9 şikonin içeren 52 mg ekstreden, % 98.9 saflıkta ve toplamda 19.6 mg şikonin, % 96.6 geridönüşüm oranıyla elde edilmiştir (214).

Assimopoulou ve Papageorgiou (2004)'nun çalışmalarında, alkannin-şikonin ticari örneklerinin ve *A. tinctoria* köklerinin yağlı ekstreleri şeklindeki izohekzenilnaftazarin (IHN) türevlerinin inklüzyon kompleksleri β -siklodekstrin (CD) ve hidroksipropil- β -siklodekstrin (β -HPCD) ile oluşturulmuştur. Bu kompleksler, aktif monomerik IHN'leri azaltan CD'lerin içindeki polimerik alkannin-şikonin ve IHN türevlerinin yüzdesi sudaki çözünürlük, renksizleşme bakımından incelenmiştir. Hem CD ve hem de β -HPCD'lerde alkannin-şikonin ve IHN türevlerinin sudaki çözünürlüklerinin arttığı, böylece inklüzyon komplekslerinin alkannin-şikonin için hem iç (kapsül, tablet) hem de dış hidrofilik farmasötik ve kozmetik preparatlar (kremler, jeller, spreyler) için kullanılabileceği belirtilmiştir. Oluşan inklüzyon komplekslerinin alkannin-şikoninin kısmi dekolasyonu ile soluk mor bir renk aldıkları gözlenmiştir. CD'lerin başlangıçtaki kapsüllenmemiş örneklerle karşılaştırıldığında seçici bir şekilde daha fazla monomerik ve daha az polimerik IHN içerdikleri; böylelikle geliştirilen inklüzyon komplekslerinin biyolojik aktivitenin etkisini arttırmak amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir (215).

Çin'de yaygın olarak kullanılan bitkisel merhem Shiunko'nun markır maddelerinin eş zamanlı kantitatif tayininde, 280 nm Ultraviyole (UV) absorbans ölçümü ile RP-HPLC yöntemi uygulanmıştır. Shiunko'nun içeriğinde *Lithospermum* köklerinden elde edilen şikonin, asetilşikonin, β,β -dimetilakrilşikonin, izobutilşikonin, deoksişikonin ve izovalerilşikoninin yanı sıra *Angelica* köklerinden elde edilen ferulik asit de bulunmaktadır. Asetonitril ile ekstre edilen Shiunko merhem örnekleri, ters fazlı C18 kolon aracılığıyla oda sıcaklığında % 47 asetonitril, % 53 asetik asit (pH 2.56) ile 1.0 mL/dk'lık bir akış hızı ve 35 dk'lık akış süresi ile ayrılmıştır (216).

Monomerik alkannin ve şikoninler geniş bir yelpazede biyolojik aktiviteye sahip farmasötik maddelerdir. Bu nedenle, alkannin ve şikonin örneklerindeki kirliliklerin, bozunma ürünleri veya yan ürünlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Boraginaceae bitkilerinde biyoaktif ikincil metabolitlerin sentezi, alkannin-şikoninlerin doku kültürü ile üretimleri, alkannin ve şikoninlerin esterlerinin alkali hidrolizi ve alkannin-şikoninlere ısı uygulamaları sırasında oligomerik alkannin ve şikoninlerin oluşukları belirtilmiştir. Bu çalışmada, dimerik yapıdaki alkannin-şikonin bileşikleri, alkannin ve şikonin ticari örneklerinden moleküler elek kromatografisi ile izole edilmiştir, tek ve iki-boyutlu NMR spektroskopisi ile de yapıları belirlenmiştir. Bu örneklerde, oligomerik yapılarda en bol bulunan yapının bir naftokinon biriminin yan zincirine ikinci bir naftokinonun aromatik halkasının bağlanması ile oluşan dimerik naftokinonlar oldukları belirlenmiştir. Bu tip bir bağlantıda ikinci monomer ünitesinde mevcut olan bir izohekzenil yan zincirinin ayrılmasıyla daha fazla oligomerizasyona izin verilebileceği belirtilmiştir (217).

Alkannin-şikonin ve türevleri kimyasal parçalanma, ısıl bozunma ve polimerizasyon gibi birçok dönüşüme karşı hassastır. Bunların çalışma ve saklama süreçlerindeki stabilitesi, onların farmasotik ve kozmetikte kullanımında çok önemlidir. Çünkü alkannin ve şikoninin polimerizasyonu sonucunda antimikrobiyal aktivitesinde azalma, aktif monomerlerin konsantrasyonunda azalma ve uygulamalarında sınırlama, koyu kırmızı renklerinde kayıp ve çözünürlüğün azalmasına yol açmaktadır. Bu yüzden safsızlıkların belirlenmesi, bozunma ürünlerinin ve yan ürünlerin belirlenmesinde birçok analitik yöntemin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca materyalin alkannin ve şikonin ve türevlerinin tanımlanması, kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi, doğal ürünler olması, örneklerin doku kültürü yoluyla ya da sentetik olarak hazırlanması ya da IHN esterlerinin hidroliziyle oluşumu bunların farmasotikte kullanımı için hayattır. Bu amaçla, alkannin ve şikonin ve türevlerinin analitik metotlarla ayrılması ile ilgili çalışmaların derlemeleri de bulunmaktadır (4).

Boraginaceae familyasına ait 9 türde 8 adet naftokinon türevi (şikonin, asetilşikonin, deoksi şikonin, β -asetoksi izovaleril şikonin, izobütül şikonin, β,β -dimetilakrilşikonin, 2 metil n-bütiril şikonin ve izovaleril şikonin) HPLC-DAD ile ayrılmıştır. Pozisyonel izomer olan 2 metil n-bütiril şikonin ve izovaleril şikonin ilk kez ayrılmıştır. Çin'in farklı alanlarından gelen Chinese Materia Medica'da geçen adıyla Zicao olarak bilinen türler olan *A. euchroma*, *A. guttata*, *L. erythrorhizon* ve 6 *Onosma* türünde çalışılmıştır. Pozisyonel izomer olan 2

metil n-bütiril şikonin ve izovaleril şikonin ayrımı yapılmıştır. Çin farmakopesinde Zicao olarak kullanılan 3 türde (*A. euchroma*, *A. guttata*, *L. erythrorhizon*) ve Tibet halkı tarafından kullanılan diğer 6 *Onosma* türünden en çok *O. waltonii*'de olmak üzere kaydadeğer miktarda naftokinon türevi bulunarak bu türlerin alternatif naftokinon kaynağı olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (218).

Pekin vd. (2007)'in çalışması ile Anadolu'da bulunan 13 endemik *Alkanna* türünde serbest ve toplam alkannin miktarları analiz edilmiştir. Numunelerin ekstraksiyonu hekzan ile sonikasyonu takiben 1 N NaOH kullanarak hidroliz ile yapılmıştır. Analiz için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. LC-MS deneyleri pikin kimliğini ve saflığını belirlemek için yapılmıştır. Kantitatif sonuçlar ile, çalışılan örneklerden *A. tubulosa*'nın köklerinde toplam alkannin miktarının (% 0.84) en yüksek olduğu belirlenirken, *A. mughlae*'de serbest alkannin yüzdesinin en yüksek (% 0.04) olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile, üzerinde en çok çalışılan *Alkanna* türü olan ve % 0.11-0.54 oranında toplam alkannin ve % 0.002-0.01 oranında serbest alkannin içeren *A. tinctoria* ile karşılaştırıldığında, bu 2 türün eczacılık bakımından değerlendirilmesi gereken alternatif kaynaklar olabileceği gözler önüne serilmiştir (219).

Alkannin ve şikonin türevlerinin bitki kök ekstraktları ve ticari örneklerde oligomerik yapılarının HPLC yoluyla tespiti ilk kez Assimopoulou vd. tarafından (2008) yapılmıştır. Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi algılama-kütle spektrometresi (HPLC-DAD-MS) yöntemi ile eş zamanlı olarak alkannin ve şikoninin monomerik ve oligomerik polimer türevlerinin ayrımları sağlanmıştır. Çalışılan birçok örnekte oligomerik alkannin ve şikonin bileşenleri tespit edilerek polimerizasyon modları sunulmuştur (220).

Sagratini vd. (2008) *Onosma echioides* köklerinde ekstraksiyon ve analiz çalışmaları ile alkannin ve şikonin miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışmalarında *O. echioides*'in altı popülasyonunun köklerinde farklı çözünürlükte 5 solvan (hekzan, petrol eter, kloroform, etil asetat, metanol) ve üç ekstraksiyon tekniği (soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon ve hızlı katı-sıvı dinamik ekstraksiyonu (RSLDE)) kullanılmıştır. Ekstrelerin analizleri HPLC-DAD sistemi ile yapılmıştır. En verimli ekstraksiyon tekniğinin, etil asetat ve Soxhlet aparatı kullanılarak 6 saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. *O. echioides* örneklerinde 0.02-0.24 mg/kg aralığında bir alkannin/şikonin içeriği belirlenmiştir. Diğer naftokinon türevleri

(deoksalkannin/ deokssikonin ve 5,8-dihidroksi-2-(4-metil-6-okso-5,6-dihidro-2H-piran-2-il)- [1,4] naftokinon ve arnebin-6) ESI iyonizasyon kaynağı bulunan HPLC-MS aparatı kullanılarak karakterize edilmiştir (221).

Albreht vd. (2009), *Echium italicum* L. kök epidermislerinde 9 adet şikonin ve türevini (Şikonin, asetilşikoinin, propionilşikoinin, izobütülşikoinin, tigloilşikoinin, 3,3-dimetilakrilşikoinin, angelilşikoinin, 2-metil-n-butirilşikoinin ve izovalerilşikoinin) belirlemişlerdir. Alkannin ve şikoninin ayrılması için yeni bir ince tabaka kromatografisi geliştirmişlerdir. Çalışmada şikoninin saponinleştirilmesinden sonra açıl klorür ile esterleştirilerek yedi bileşik elde edilmiştir. Ekstrelerden 5 ana bileşik (asetilşikoinin, izobütülşikoinin, angelilşikoinin, 2-metil-n-butirilşikoinin ve izovalerilşikoinin) yarı-preparatif HPLC ile ayrılarak yapıları ¹H ve ¹³C nükleer manyetik rezonans spektrumu ile doğrulanmıştır (29).

A. tinctoria köklerinin ve ticari numunelerinin ekstrelerindeki alkannin-şikoinin ve esterleri yüksek hızlı karşı akım kromatografisi (HSCCC) ayrılmış, preparatif izolasyonu yapılmış ve saflaştırılmıştır. HSCCC fraksiyonlarının bileşenleri ve saflıkları HPLC-DAD-MS ile belirlenmiştir. Oligomerik yapılar MS ile belirlenmiştir. HSCCC'den ayrılan fraksiyonların saflıkları, sabit fazlı silika jel olan sefadeks LH-20 kolondan izole edilen fraksiyonlardan biri ile karşılaştırılmıştır. Ticari alkannin ve şikoninlerin ayrımında, HSCCC ile ayrılan monomerik alkannin ve şikoninlerin saflığının ve kolon kromatografisinde ayrılanlardan daha yüksek olduğu görülmüştür (222).

L. erythrorhizon 'un naftokinon pigmentlerinin ekstraksiyonunda süperkritik akışkan ekstraksiyonu yapılmış ardından ekstrelerin ayrımı ve saflaştırılması iki fazlı bir çözücü sistemi olarak petrol eteri-etil asetat-metanol-su (5:5:8:2) kullanılan HSCCC ile yapılmıştır. 150 mg kuru örnekte 3 çeşit naftokinon bulunduğu tespit edilmiştir. Bunların; 17.6 mg β-hidroksizovalerilşikoinin, 17.6 mg asetilşikoinin ve 19.7 mg izobütirilşikoinin oldukları belirlenmiştir. Sıvı kromatografisi ile bu bileşiklerin saflıkları sırasıyla % 96.7, 99.3 ve 95.5 olarak belirlenmiştir. Bunların yapıları ¹H NMR ve ¹³C NMR ile tespit edilmiştir (223).

Tian vd. (2009), sıçan tam kan örneklerinde dimetilakrilşikoininin belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Uygulama öncesi dimetilakrilşikoininin sikloheksan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından 2-merkaptotanol ile derive edilmiştir. Thermo Finnigan

TSQ Kuantum üçlü quadrapol ve elektrosprey iyonizasyon kaynağı kullanılarak kütle spektrometresi yapılmış ve sıçan tam kan örneği (0.25 mL) içinde, DASK 3-3000 ng/mL doğrusal aralığında belirlenmiştir (224).

Zhu vd. (2010) yeni bir HPLC/elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (HPLC/ESI-MS/MS) geliştirerek rat plazmasından izovalerilşikinin ayrımını sağlamışlardır. Rat plazmasından etil asetat ile ekstrakte edilen analit, % 10 HCl ile muamele edilip metanol ile protein çöktürülmüş ve XB-C (18) analitik kolonda mobil faz olarak metanol: 10 mM amonyum asetat içeren su : % 0.05 formik asit içeren asetonitril 45:10:45 oranlarında kullanılarak ayrılmıştır. Geliştirilen bu yeni yöntem ratlarda intravenöz uygulamadan sonra şikinin analoglarının farmakokinetik çalışmalarında hızlı ve kesin bir prosedür olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (225).

Alkannin ve şikininlerin saflaştırılması, ilaç kullanımında ve biyolojik deneylerde çok önemlidir. Dimerik ve oligomerik alkannin-şikinin türevleri, biyoteknolojik sentez yoluyla üretilen örneklerin çoğunda ya da izole edilen doğal ürünlerinde monomerik olanlar ile bir arada bulunmaktadır. Monomerik ve oligomerik alkannin-şikinin izolasyonu ile ticari numunelerin saflaştırılması üzerine gerçekleştirilen çalışmada, Sephadex LH-20 kullanılarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile monomerik ve dimerik alkannin-şikinin türevleri içeren ticari örneklerin etkili bir şekilde saflaştırılması, biyolojik deneyler için saf monomerik/dimerik alkannin-şikinin fraksiyonlarının ayrılması ve izolasyonu sağlanmıştır. HPLC DAD ile fraksiyonların tespiti, teşhisi ve miktar tayinini gerçekleştirilmiştir (226).

Çin'de yaygın olarak bulunan üç endemik Boraginaceae bitkisinin (*A. euchroma*, *L. erythrorhizon* ve *O. confertum*) köklerindeki ana bileşenlerin enantiyomerik oranlarının ayrımı yapılmıştır. Ayrıca üç farklı yaklaşım ile hidroliz ürünlerinin optik saflıkları araştırılmıştır. Ana bileşenlerin enantiyomerlerinin değerlerinde HCl'nin etkisi incelenmiştir. *A. euchroma* da esas olarak S-formu baskın iken, *L. erythrorhizon* ve *O. confertum* 'da R-formunun baskın olduğu belirlenmiştir. Alkannin, şikininin ve bunların türevlerinin optik saflıkları ayırma ve hidroliz sırasındaki asit ile muameleden etkilenmemiştir. Şikininin, *O. confertum*'da bulunan şikininin ester türevlerinden (β - β -dimetilakrilşikinin) alkanninin *A. euchroma* köklerinde bulunan β -dimetilakrilalkanninden sağlandığı bulunmuştur (227).

Akgun vd. (2009) tarafından, Türkiye’de yetişen *Alkanna* türlerinde izohekzenilnaftazarinlerin analizi için yeni ve valide edilmiş bir yöntem geliştirilmiştir. Anadolu’da yetişen 16 *Alkanna* türünün kökleri n-hekzan ile ekstrakte edilip ters faz HPLC ile 25 dk içinde Synergi Max RP kolon aracılığıyla analiz edilmiş ve dört IHN türevi (alkannin, asetilalkannin, deoksalkannin, ve β , β -dimetilakrilalkannin) tespit edilmiştir. Pik kimlikleri LC-MS deneyleri ile doğrulanmış ve en baskın bileşiğin β , β -dimetilakrilalkannin olduğu belirlenmiştir (228).

Graikou vd.’un çalışmaları aracılığı ile *L. canescens* transgenik köklerinin n-hekzan ekstraktlarında dört alkannin (izobutilalkannin, β , β -dimetilakrilalkannin, asetilalkannin ve β -hidroksiizovalerilalkannin), iki şikonofuran (şikonofuran C ve D) ve esterlenmiş asitler gibi steroller tespit edilmiştir (2011). *L. canescens* türü transgenik köklerinin ilk detaylı kimyasal analizi yapılmış ve bu türde yeni metabolitler olarak izobutilalkannin ve β -hidroksiizovalerilalkannin pigmentlerinin buldukları bildirilmiştir (229).

Ito vd. (2011), gıda renklendiricisi "Shikon color" olan ticari *L. erythrorhizon* kök ekstresinden, 2-metilbut-2-enoik asitin tiglik asit ile esterlenmiş yeni bir türevi olan tigloilşikonin’i az miktarda izole etmişlerdir. Tigloilşikoninin yapısı farklı teknikler kullanılarak açıklanmış, stereokimyası kiral fazlı HPLC analizi ile tespit edilmiştir (230).

2.6.1.1. *Arnebia* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar

Li vd. (1999), *A. euchroma* köklerinden elde edilen şikonin ile şikonin metabolizması üzerine çalışmışlardır. Sığan karaciğer mikrozomları *in vitro* ortamda inkübe edilerek şikonin metabolizması üzerine çeşitli faktörlerin etkileri incelenmiş, metabolitlerin ayrılmasında ve tespitinde HPLC kullanmışlardır. Ana metabolitler RP-HPLC ile saflaştırılarak yapıları UV, ¹H-NMR, MS ile belirlenmiş ve bunların dihidroksillenmiş şikonin, 2-OH şikonin ve 6-OH ya da 7-OH şikonin oldukları belirtilmiştir (231).

Arnebia hispidissima köklerinden şikonin ve arnebifuranonun yanı sıra, iki yeni şikonin esteri; bütilşikonin ve 2'-metil-hekza-1',3'-dienoilşikonin izole edilerek fiziko-kimyasal yöntemler ile karakterize edilmiştir (232).

Sharma vd. (2008) tarafından, *A. euchroma* ile kurulan hücre süspansiyon kültürlerinden asetilşikinin, β -asetoksizovalerilşikinin izole edilerek saflaştırılmasında basit ve hızlı bir preparatif HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bileşikler C18 kolon aracılığıyla ve hareketli faz olarak asetonitril/metanol (95:5) kullanılarak 10 dk içinde izokratik yöntemle ayrılmıştır. İzole edilen bileşiklerin % 98'den fazla saf olduğu tespit edilmiştir (233).

Hindistan'da bulunan *Arnebia* cinsine ait dört türde (*A. euchroma*, *A. guttata*, *A. benthamii*, ve *A. hispidissima*) şikonin ile birlikte türevlerinden asetilşikinin ve asetoksizovalerilşikinin yüksek performanslı ince-tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda bu bileşiklere farklı solvanların etkileri (hekzan, kloroform, etil asetat, ve metanol) incelenmiştir. Mobil faz olarak asetonitril:metanol: % 5 formik asit içeren su 40:02:08 oranlarındaki karışımı kullanılmıştır (234).

Yüzbaşıoğlu (2010), *A. purpurea*'nın kök ve toprak üstü kısımları kısımlarından hazırlanan ekstreler üzerinde izolasyon ve aktivite çalışmaları yapmıştır. Köklerin n-hekzan, herbaların ise metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Metanol ekstresi düşük ısı ve alçak basınç altında uçurulduktan sonra suda çözülüp partisyona tabi tutulmuş, petrol eterli fazda yağsı bileşikler ve pigmentler uzaklaştırılmış ve sulu fazda çalışılmıştır. Hazırlanan ekstrelerden çeşitli kromatografik (açık kolon, vakum sıvı ve orta basınçlı sıvı kromatografisi) izolasyon çalışmaları sonucunda, köklerden üçü karışım halinde olmak üzere toplam 5 naftokinon (izovlerilalkannin, α -metil-n-butilalkannin, izobutilalkannin, asetilalkannin ve alkannin yapısı spektrofotometrik yöntemler (UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR, Kütle spektrometresi) kullanılarak aydınlatılmıştır (20).

Wei vd. (2011), *A. euchroma*'dan şikonin ve türevlerinin endüstriyel üretim sürecinde yoğunlaştırma aşamasındaki sıcaklık, pH ve etanol miktarlarının değişiminin şikonin içeriğine olan etkisini incelemiştir. Sıcaklığın 40-60°C, pH'nın 3-7 ve etanol içeriğinin % 35-70 olduğu şartlar altında 6 saat stabil kaldığı belirlenirken, örnek çözeltilerindeki çok düşük etanol içeriğinin şikonin miktarında büyük kayıplara yol açtığına dikkat çekilmiştir. Ayrıca yağda çözünen maddelerin konsantre etme işlemi esnasında çökmesinin içeriklerinde önemli kayıplara yol açtığı belirtilmiştir (235).

Xiao vd. (2011), *A. euchroma*'da iyonik sıvı bazlı ultrasonik yardımcı ekstraksiyonun ardından HPLC ile şikonin ve β - β' -dimetilakrilşikinin tespit etmişlerdir. Burada şikonin için

1.75-140 µg/mL, β,β'-dimetilakrilşikoinin için 2.15-1360 µg/mL konsantrasyon aralıklarında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve % 69.79 ile % 82.35 arasında geridönüşüm sağlanmıştır. İyonik sıvı bazlı ultrasonik yardımcı ekstraksiyonda uçucu organik solventler bulunmamasının yanında ultrasonik ve Soxhlet ekstraksiyonuna kıyasla daha az örnek, zaman ve solvan kaybı olması bakımından tercih edilebileceği, üç ekstraksiyon yönteminde de ekstraksiyon ürünlerinin aktif bileşenlerinde önemli farklılıklar görülmediği belirtilmiştir (236).

2.6.1.2. *A. densiflora* üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar

Bozan'ın araştırmasında (1990), Sivas-Kangal yöresinden toplanan *A. densiflora* köklerinin n-hekzan ekstresinden kromatografik yöntemlerle terakrilalkannin, α-metil-n-bütillakrilalkannin-izovalerilalkannin karışımı ve β,β-dimetilakrilalkannin izole edilmiştir (22). Bozan ve arkadaşlarının *A. densiflora* köklerini kullanarak yaptıkları HPLC çalışmasında *A. densiflora* ekstrelerinde % 20.54 oranında bulunan terakrilalkanninin ana madde olarak bulunduğu bildirilmiştir (237). Bitkinin kökleri Soxhlet apereyi ile 2 saat sürede ve % 5.7 verimle n-hekzan ile ekstre edilmiş ardından etilasetat ile çözülerek HPLC çözeltileri hazırlanmıştır. Mobil faz olarak 1 mL/dak. akış hızı ile metanol:su:formik asit (95:5:0.1) kullanılmış ve 12 dk süre ile yürütülmüşlerdir. 5.7., 6.5., 9.0. dk'larda β,β-dimetilakrilalkannin, terakrilalkannin, izovalerilalkannin ve α-metil-n-bütillalkannin naftokinonları belirlenmiştir. % 2.18±0.07, 21.5±0.3, 30.5±0.3 bu çalışma yine Bozan ve arkadaşları tarafından yapılan TLC densitometresi çalışmasının verileri ile de doğrulanmış ve burada da yakın değerler elde edilmiştir. Burada da % 2.4, 22.4, 32.1 olarak bulunmuştur (238).

A. densiflora kök ekstrelerinde terakrilalkannin, α-metil-n-butillalkannin, izovalerilalkannin izole edilmiştir (2, 24).

Türkiye'de yetişen Boraginaceae familyasına ait 18 tür üzerinde yapılan ve alkannin-şikoinin miktarının belirlendiği çalışmada (12); *A.densiflora*, kök kabuklarında bulunan % 16.83 oranındaki şikoinin içeriği ile birinci sırada yer almıştır.

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Anadolu ve Yunanistan için bölgesel endemik bir tür olan *A. densiflora* Ledeb. bitkisi, köklerinde doğal olarak alkannin/şikinin türevi naftokinonlar bulundurmaktadır (Kırımer vd. 1992). Şikinin ve antipodu olan alkanninler özellikle cilt hastalıkları, yanık, yara, ekzema tedavilerinde kullanıldığı gibi, boyar madde olarak gıda, dokumacılık ve kozmetolojide de kullanılmaktadır (Papageorgiou 1980). Köklerden izole edilen şikinin ve türevlerinin; yara iyileştirici, antienflamatuvar, antitümöral, antimikrobiyal, antioksidan, radikal süpürücü ve antitrombotik aktivitelerine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (6, 7, 1, 9, 10, 184).

Japonya'da *L. erythrorhizon* bitkisinden doku kültürü ile endüstriyel boyutta üretilen ilk fitokimyasal olan şikinin; gıda, kozmetik ve ilaç sanayiinde boyar madde olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (14, 15). Yine Uzak Doğu'da yetişen *A. euchroma*'dan doku kültürü ile şikinin üretilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (19).

Hem tıbbi açıdan önemi bulunan hem de endüstriyel olarak yaygın kullanım alanı bulunan şikinin üretiminde *A. densiflora*'nın kaynak olarak kullanıldığı bir çalışma ülkemizde ve dünya literatüründe mevcut değildir. Bu nedenle bölgesel endemik bir tür olan *A. densiflora*'dan şikinin üretiminin ülke ekonomisi açısından önem taşıyacağı düşüncesi, çalışmanın hareket noktasını oluşturmuştur.

Bu tezde; biyoteknolojik bir yöntem olan, doku kültürü metodu ile bitkinin çeşitli organlarından kallus üretilip, bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürlerine geçilmesi, üretilen kalluslarda ve süspansiyonlarda şikinin ve türevlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Kullanılan hormonlar ve kültür şartlarında değişiklikler yapılarak, elisitör uygulamaları aracılığıyla şikinin miktarı arttırılmaya çalışılmıştır. Bu aşamayı takip eden bir sonraki basamakta ise şikinin veya türevlerinin biyoreaktörlerde üretimleri ve optimizasyonlarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Kallus ve süspansiyon kültürleri ile biyoreaktörlerde başarılı bir şekilde üretimi sağlanan şikinin ve türevlerinin varlığının, fitokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmesi üzerinde durulmuştur.

Dünya literatüründe, *A. densiflora* bitkisinin kaynak olarak kullanılıp *in vitro* yöntemlerle naftokinon türevi sekonder metabolitlerinin üretildiği bir çalışma bulunmadığı için bu araştırma ile bir ilk gerçekleştirilmiştir. Ülkemize ait kaynakların değerlendirilmesi ve kullanıma sunulması hedeflenerek yapılan çalışma ile biyoteknoloji alanında da önemli bir bilgi birikimi sağlanacağı düşünülmektedir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2007-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Ana Bilim Dalı, Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı ve Nobel İlaç Farmasotik Araştırma ve Geliştirme Merkezi (FARGEM)'nde gerçekleştirildi.

4.1. Materyal

A.densiflora Ledeb. bitkisi, Eskişehir-Sivrihisar, Aşağı Keven köyünün kireçli tepelerinden 17.05.2007 ve 31.05.2008 tarihlerinde çiçeklenme zamanı olan Mayıs ayında toplanmıştır. Toplanan bitkilerin bir kısmı sterilizasyondan sonra uygun ortamlara ekilmiştir. Diğer kısmı da -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bitki Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Ketenoğlu tarafından teşhis edilmiştir ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (GUE 2601) bulunmaktadır.

4.2. Yöntem

Tez çalışması ana hatlarıyla 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Bitki materyalinin sterilizasyonunun (özellikle kök kısımları eksplant olarak kullanılmıştır) ardından doku kültürü aşamasına geçilmiştir.
2. Eksplantlardan parçalanabilir yapıda verimli kalluslar elde edildi ve bunlardan hücre hatları oluşturulmuştur.
3. Ortamlarda, hücre hattından alınan kalluslarda şikonin ve türevlerinin üretimini sağlayıcı ve arttırıcı modifikasyonlar yapılmıştır. Bunun sonucunda kallus, süspansiyon kültürleri ve biyoreaktör sistemlerinde uygun ortamlar belirlenerek optimizasyonları sağlanmıştır.
4. Optimize edilen ortamlarda oluşturulan *in vitro* kültürlerde üretilen şikonin ve türevlerinin miktar tayinleri yapılmıştır.

Eksplant sterilizasyonunun ardından doku kültürü ile kallus elde edilmesinde farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilen MS (Murashige and Skoog,

1962) (54), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) (55), B5 (Gamborg vd.,1976) (57) ve SH (Schenk ve Hildebrandt 1972) (56) ortamları kullanıldı. Süspansiyon kültürlerinde MS, M9 (58) ve M10 (59) ortamları kullanılırken biyoreaktör sistemlerinde M9 ve M10 ortamları kullanılmıştır.

4.2.1. Besin ortamının hazırlanması

4.2.1.1. Stok çözeltiler

Besin ortamı hazırlanırken ortamın içerdiği makro elementler için 10x'lik; mikro elementler ve vitaminler için 100x'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır (239). Stok çözeltiler koyu renkli cam şişelerde ve +4 °C'de saklanmışlardır. Besin ortamı hazırlanırken, stok çözeltilerden alınacak miktarlar aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (53).

$$\text{İstenilen stok hacmi} = \frac{\text{istenilen konsantrasyon} \times \text{ortam hacmi}}{\text{stok çözeltinin konsantrasyon}}$$

Hazırlanan besin ortamlarına karbon kaynağı olarak MS, LS, SH ve M9 için % 3 (30 g/L), B5 ortamı için % 2 (20 g/L), M10 ortamı için ise % 5 (50 g/L) oranında sakaroz kullanılmıştır. Kallus kültürlerinde katılaştırma ajanı olarak % 0.7 (7 g/L) agar ilave edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kullanılan MS, SH, B5, LS, M9 ve M10 ortamlarının tam içerikleri

	ORTAMLAR (mg/L)						
	MS	MS3	SH	B5	LS	M9	M10
KNO₃	1900	1900	2500	2500	1900	80	680
NH₄NO₃	1650	1650			1650		
CaCl₂.H₂O	440	440	200	150	440		539
MgSO₄. 7H₂O	370	370	400	250	370	750	
KH₂PO₄	170	170			170		
(NH₄)₂SO₄				134			
NH₄H₂PO₄			300				
NaH₂PO₄.2H₂O				150			
Na₂SO₄						1480	1917
Ca(NO₃)₂4H₂O						694	19
KCl						65	
NaH₂PO₄.2H₂O						19	
H₃BO₃	6.2	6.2	0.5	3	6.2	4.5	1.6
ZnSO₄.7H₂O	8.6	8.6	0.1	2	10.58	3	
MnSO₄.H₂O	16.89	16.89	10	10	16.89		
KI	0.83	0.83	0.1	0.75	0.83		
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25	0.25	0.01	0.25	0.25		
CoCl₂.6H₂O	0.025	0.025	0.1	0.025	0.025		
CuSO₄.5H₂O	0.025	0.025	0.2	0.025	0.025	0.3	
CuCl₂2H₂O							0.1364
Na₂EDTA	37.2	37.2	2	37.2	37.2		
NaFeEDTA						1.57	2
FeSO₄.7H₂O	27.8	27.8	1.5	27.8	27.85		
Myo-inositol	100	100	1000	100	100		100
Tiyamin-HCl	0.4	0.4		1	0.4		
Nikotinic asit			5	0.1			
Pridoksin HCl			0.5	0.1			
IAA			5			1.75	
NAA	1.8621	5					
KIN	0.0645		0.2152	2.1522	2.1522		0.5
2,4 D			2.2104		0.221		
BAP		0.5					
IBA				0.4065			
Sakaroz	30000	30000	30000	20000	30000	30000	50000
Agar	7000	7000	7000	7000	7000	7000	7000
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

4.2.1.1.1. Major tuz stok çözeltilerinin hazırlanması

1 L'lik balonjojeye konulan yaklaşık 700 mL distile su üzerine sırasıyla Çizelge 4.2'deki maddeler tartılarak eklenmiştir. Besin ortamından 1L hazırlanması durumunda bu major tuz stoğundan 100 mL alınmıştır.

Çizelge 4. 2. MS, LS, SH, B5, M9 ve M10 ortamları için major tuz stok çözeltisi (10x), (g/L)

Major tuzlar	MS-LS	SH	B5	M9	M10
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	16.5				
Potasyum nitrat (KNO_3)	19	25	25	0.8	6.8
Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.7	4	2.5	7.5	
Kalsiyum nitrat [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]	-			6.94	0.19
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	1.7				
Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.4	2	1.5		
Amonyum sülfat [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	-		1.34		
Amonyum dihidrojen fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)			1.5		
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)				14.8	19.17
Potasyum klorür (KCl)				0.65	
Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)				0.19	

4.2.1.1.2. Minör tuz stok çözeltilerinin hazırlanması

Minör tuz stokları da majör tuz stoklarına benzer şekilde 1 L'lik balon jodelerde hazırlanmıştır. Çizelge 4.3'deki maddeler sırasıyla tartılmıştır. Major tuz stokları hazırlanırken kobalt klorür ve bakır sülfatın MS, SH ve B5 ortamlarındaki miktarları düşük olduğundan ayrı bir stok olarak hazırlandıktan sonra minör stok çözeltisine ilave edilmiştir. Bu amaçla MS ve B5 ortamları için 25 mg kobalt klorür ve 25 mg bakır sülfat tartılıp, 100 mL distile suda çözülmüştür. Bu çözeltiden 10 mL alınıp önceden hazırlanan minör stok çözeltisine ilave edilmiştir. Minör tuz stoğu bu şekilde hazırlandıktan sonra distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 1 litrelik besin ortamına hazırlanan bu minör tuz stoğundan 10 mL eklenmiştir.

Çizelge 4. 3. MS, SH, B5, LS, M9 ve M10 ortamları için minor tuz ve demir içeren stok çözeltisi (100x), (mg/L)

Minör tuzlar	MS	SH	B5	LS	M9	M10
Borik asit (H_3BO_3)	620	50	300	620	450	160
Sodyum EDTA ($Na_2EDTA.2H_2O$)	3720	200	3720	3720		-
Sodyum demir (III) EDTA (NaFeEDTA)					157	200
Demir sülfat ($Fe_2SO_4.7H_2O$)	2780	150	2780	2780	-	-
Mangan sülfat ($MnSO_4.H_2O$)	1689	1000	1000	1689		
Sodyum molibdat ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	25	1	25	25		
Çinko sülfat ($ZnSO_4.7H_2O$)	860	10	200	1058	300	-
Kobalt klorür ($CoCl_2.6H_2O$)	2.5	10	2.5	2.5		
Bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$)	2.5	20	2.5	2.5	30	
Bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$)						13.64
Potasyum iyodür (KI)	83	10	75	83		

4.2.1.1.3. Vitamin stok çözeltilerinin hazırlanması

Maddeler Çizelge 4.4.'de gösterilen miktarlarda tartılmıştır ve 1 L'lik balonjodaki 700 mL distile su üzerine eklenmişlerdir. 1000 mL'ye tamamlanan karışımdan, 1 L'lik besin ortamı hazırlanırken 10 mL alınmıştır.

Çizelge 4.4. MS, SH, B5 ve LS ortamları için vitamin stok çözeltisi (100x), (mg/L)

Vitaminler	MS	SH	B5	LS
Tiyamin HCl	40	-	100	40
Nikotinik asit	-	500	10	-
Piridoksin HCl	-	50	10	-

Myo-inositol, hazırlanan besin ortamına büyüme düzenleyicilerden önce çizelge 4.1'de belirtilen miktarlarda eklenmiştir.

4.2.1.2. Bitki büyüme düzenleyicileri

Kallus ve naftokinon oluşumunu uyarmak, kültürlerdeki hücrelerin gelişimini devam ettirmek amacıyla, ortamlara çeşitli konsantrasyonlarda NAA, IAA, IBA, BAP, KIN ve 2,4-D hormonları eklenmiştir (Çizelge 4.1). Bu amaçla bitki büyüme düzenleyicilerinin 1 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır.

4.2.1.2.1. Naftalen Asetik Asit (NAA) stok çözeltisi (1 mg/mL)

100 mL'lik balonjojeye birkaç mL distile su ve 100 mg NAA (Sigma, N073) eklenmiştir. Maddenin çözünmesini sağlamak amacıyla, 1M NaOH karışımın üstüne damla damla ilave edilmiştir. Çözünme sağlandıktan sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çizelge 4.1'deki miktarda olacak şekilde MS ortamlarına katılmıştır.

4.2.1.2.2. Indol asetik asit (IAA) stok çözeltisi (1 mg/mL)

100 mL'lik balonjojeye birkaç mL distile su ve 100 mg IAA (Sigma, I2886) eklendi. Maddenin çözünmesini sağlamak amacıyla, 1M NaOH karışımın üstüne damla damla ilave edilmiştir. Çözünme sağlandıktan sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çizelge 4.1'deki miktarlarda olacak şekilde SH ve M9 besin ortamlarına katıldı.

4.2.1.2.3. Benzil amino purin (BAP) stok çözeltisi (1 mg/mL)

100 mg BAP (Sigma, B3408) hassas terazide tartılıp, 100 mL'lik balon jodedeki birkaç mL distile suyun üstüne eklenmiştir. Maddenin çözünmesini sağlamak amacıyla, çözünene kadar 1M HCl, karışımın üzerine damla damla ilave edilmiştir ardından 100 mL'ye tamamlanmıştır. 0.5 mg/L konsantrasyonda MS3 besin ortamına katılmıştır.

4.2.1.2.4. Kinetin stok çözeltisi (1 mg/mL)

100 mg KIN (Sigma, K0753) hassas terazide tartılarak birkaç mL distile su koyulan 100 mL

hacimli balonjojeye aktarılmıştır. Maddenin çözünmesini sağlamak amacıyla, çözüne kadar 1M HCl, karışımın üstüne damla damla ilave edilmiştir. Maddenin tamamı çözüldükten sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çizelge 4.1'deki miktarlarda MS, SH, B5, LS ve M10 ortamlarına katılmıştır.

4.2.1.3. pH ayarı

Ortamların pH ayarları agar ilave edilmeden önce yapılmıştır. Hazırlanmış olan ortamlar geniş ağızlı erlenmayerlere konulmuştur. Manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan ortamlara 1 M HCl ya da 1 M NaOH damlatılarak pH değerleri 5.8'e ayarlanmıştır.

4.2.1.4. Besin ortamlarının hazırlanması

1Lbesin ortamı hazırlanmak için, 1L hacimli balonjojeye 250 mL distile su koyulmasının ardından MS, LS, SH ve M9 ortamları için 30 g, B5 ortamı için 20 g, M10 ortamı için ise 50 g sakaroz eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen balonjojeye daha sonra ortam formülüne uygun stoklardan katılmıştır. Bu stoklardan sırasıyla major tuz stoğundan 100 mL, minor tuz stoğundan 10 mL ve vitamin stoğundan da 10 mL konulup MS, SH, B5, LS ve M10 ortamlarına Çizelge 4.1'de belirtildiği miktarlarda myo-inositol eklenerek homojen olarak karışmaları sağlanmıştır. Ardından ortamlara, yine Çizelge 4.1'de belirtilen konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri, stoklardan gerekli miktarlarda alınarak eklenmiştir. pH ayarlamasının ardından distile su eklenerek hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Kallus kültürleri için ortamlara jelleştirici ajan olarak 7 g agar eklenmiştir. Süspansiyon kültüründe ve biyoreaktörlerde kullanılan ortamlar sıvı olduğundan agar eklenmemiştir. Erlenmayerlerin ağızları alüminyum folyo ile kapatılmıştır.

4.2.1.5. Sterilizasyon

Denemeler öncesinde çalışma yapılacak laboratuvarın alet ve ekipmanların sterilizasyonu yapılmıştır. Materyal olarak kullanılan eksplantların yanı sıra ekim ve transferlerin yapılacağı kabinin bulunduğu ekim odasının da sterilizasyonu sağlanmıştır.

4.2.1.5.1. Besin ortamının sterilizasyonu

Hazırlanmış olan besin ortamları otoklavda 1.2 bar basınç altında, 121°C'de 15 dk süre ile steril edilmiştir.

4.2.1.5.2. Diğer malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmaların ekim safhasında, eksplant sterilizasyonu sırasında kullanılan kaba filtre kağıdı (kare şeklinde kesilip dörde katlanmış) ve cam huni, 1000 mL'lik boş beher içine koyulmuştur. Eksplant ekimi sırasında üstünde trimleme yapılacak olan kaba filtre kağıtları petri içine sığacak şekilde kesildikten sonra bir petriye yerleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu için kullanılacak olan distile su otoklav şişelerine konulmuştur. Metal malzemeler (bistüri, pens gibi), yüzey sterilizasyonu için kullanılan metal kapaklı cam kavanozlar, magentalar, erlenmayerler ve reaktörlerin tüm parçaları ayrı ayrı alüminyum folyo ile sarılıp otoklavda 121°C'de 15 dk süre ile steril edilmişlerdir. Petriler ise alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra etüvde 180°C'de 2 saat bekletilerek steril edilmiştir.

4.2.1.5.3. Ekim odasının sterilizasyonu

Ekim işleminin yapılacağı kabinin bulunduğu oda, odadaki ekipmanlar ve laminar kabin antiseptik bir çözelti olan % 1'lik zefiranla veya % 10'luk sodyum hipoklorit (NaOCl) ile silinmiştir. Bu işlemden sonra ekim odasında bulunan laminar kabinin tüm yüzeyleri % 70'lik etanol ile dezenfekte edilmiştir. Ardından ekimde kullanılacak steril metal ve cam malzemeler kabine yerleştirilmiştir. Laminar kabin içerisinde bulunan UV-C lambası kabinin kullanımından 12 saat önce açık bırakılmıştır. Ekim anında kullanılan bistüri, pens gibi metal malzemeler her kullanımda % 96'lık alkole batırılıp bek alevinden geçirilmiştir.

4.2.1.5.4. Ortamların petri, magenta, erlenmayer ve reaktörlere aktarılması

Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilen besin ortamları otoklavdan çıkarılmıştır. Kallus kültürü için hazırlanan agarlı ortamların katılaşmasına izin verilmeyecek şekilde sıcaklığı

düşene kadar bekletilmiş ve böylece ortam katılaştırken meydana gelen buharlaşma ile ortaya çıkacak olan serbest suyun oluşması önlenmiştir. Uygun sıcaklığa gelen ortamlar, çalışmanın aşamasına göre petri, magenta, erlenmayer ve reaktörlere aktarılmıştır.

Eksplant ekimi ve kallus oluşumunu kapsayan çalışmanın ilk aşamalarında 10 cm çapında cam petriler kullanılmıştır. İlerleyen aşamalarda kallusların hacimsel olarak gelişimleri ile birlikte hücreler magentalara transfer edilmiştir. Süspansiyon kültüründe ve biyoreaktörlerde kullanılan ortamlar erlenmayer ve reaktörlere aktarılmalarının ardından ağızları alüminyum folyo ile sarılmıştır.

Sterilizasyonu sağlanan tüm malzemeler hemen ekim odasına alınmıştır. Ortamlar, steril laminar kabin içinde, steril petri, kavanoz, magenta, erlenmayer ve reaktörlere aktarılmışlardır. Bu işlem sırasında ortamların bulunduğu erlenmayerlerin ağız kısımları her açışta bek alevinden geçirilmiştir. Ortamların transfer işlemleri tamamlandıktan sonra aktarıldıkları malzemelerin üzerlerine ortamın adı ve varsa önemli özellikleri kodlanarak yazılmıştır. Petri ve magentalara dökülen besin ortamlarının iyice katılaşması ve olası kontaminasyonların ekim yapılmadan önce görülebilmesi için 24 saat beklenmiştir.

4.2.2. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Araziden toplanıp laboratuvara getirilen bitkiler, aynı gün toprak ve kurumuş kısımlarından temizlenmiştir. Eksplant olarak tek yıllık gövdeler (0.5-1cm), yapraklar (0.5-1 cm), kök üstündeki gövde sürgünleri (0.1- 0.5 cm) ve ince kök parçaları (0.5-1 cm) kullanılmıştır (Şekil 4.1). Sarp bölgelerde ve kireçli topraklarda yetişen bitkinin özellikle kök eksplantlarında yüzey sterilizasyonunun ardından çok yoğun kontaminasyon gözlenmiştir. Bu nedenle en az kontaminasyon oranını yakalayabilmek amacıyla farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonunda uygun konsantrasyonlarda NaOCl, antibiyotik antifungal karışımlar, bitki koruyucu karışım (plant preservative mixture=PPM) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılarak 3 farklı yöntem çalışılmıştır.



Şekil 4. 1. Eksplant olarak kullanılan ince kök parçaları (a), tek yıllık gövdeler ve yapraklar (b), kök üstündeki gövde sürgünleri (c,d)

4.2.2.1. Tween 20 ile NaOCl kullanımı

İlk denemelerde; öncelikle % 70'lik alkolde 1 dk bekletilen eksplantlar (Şekil 4.1), Tween 20 damlatılan NaOCl'in % 20, 25, 35 ve 40'luk konsantrasyonları kullanılarak besiyerlerine ekilmiştir. Besiyeri olarak farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilen MS, MS3 ve LS ortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

4.2.2.2. Antibiyotik- antifungal karışımları ile PPM kullanımı

A. densiflora sürgün ucu ve köklerinin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ikinci aşama eksplant sterilizasyonu çalışmasında kontaminasyon problemini çözmek için, MS ortamına eklenen antibiyotik ve antifungal karışımları ile PPM (plant preservative mixture) adı verilen bitki koruyucu karışım solüsyonu denenmiştir. Bileşiminde metilkloroizotiazolon, metilizotiazolon, magnezyum klorid, magnezyum nitrat, potasyum sorbat, sodyum benzoat içeren geniş spektrumlu bir biyosit olan PPM; 4 mL/L'den düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında çimlenmeye de zarar vermeden sterilizasyonu sağlayabilmektedir (240, 241).

Çalışmada; belirli konsantrasyonlarda antibiyotik olarak Penisilin G (Sodyum tuzu, 100 MI Units, 1668 U PenG/mg, Sigma P-3032, St. Louis, MO, USA) ile Streptomisin Sülfat

(Biochrom AG 752 IU/mg A-331-27, Berlin, Germany) ve antifungal olarak Amfoterisin B (50 mg, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA) kullanılmıştır. Kültür ortamına eklenen antibiyotik miktarları sabit tutulup antifungal oranları için ise 2 farklı konsantrasyon değeri kullanılmıştır. 1 L'lik besiyerine 100.000U PenG, 100.000 µg Streptomisin sülfat ile birlikte 500 µg ve 1000 µg Amfoterisin B ilave edilmiştir.

Eksplantlar birkaç kez % 1'lik sodyum hipoklorit içeren çeşme suyunda yıkanıp steril kavanozlarda % 70'lik etanolde 1 dk çalkalanarak bekletilip ve süzölmüşlerdir. Ardından % 25'lik NaOCl solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda tutularak 30 dk steril edilmiş ve ardından 3 kez steril su ile durulandıktan sonra steril kurutma kağıdı üzerinde yaklaşık 0.5 cm'lik küçük parçalara ayrılarak antimikrobiyal içeren ortamlara yerleştirilmiştir.

PPM ise eksplantların yüzey sterilizasyonu için dört farklı konsantrasyonda (% 1, 2, 3, 4) kullanılırken ortama da (MS) % 0.5 oranında ilave edilmiştir.

4.2.2.3. PPM denemesi

1dk % 70'lik alkolde bekletilen kök ve sürgün eksplantları, % 1'lik PPM ile 1 saat çalkalanıp 3 kez 3'er dk distile su ile yıkandı. 0.5-1 cm uzunluğundaki eksplantlardan, % 0.5 oranında (5 mL/L) PPM içeren MS, SH, LS ve B5 ortamlarına 40'ar adet ekilmiştir.

4.2.2.4. H₂O₂ denemesi

% 70'lik alkolde 1 dk tutulan kök ve sürgün eksplantları 15'er dk % 20, % 30 ve % 40'lık H₂O₂ ile çalkalandıktan sonra 3 kez 3'er dk distile su ile yıkanmıştır. Eksplantlar; 250, 500 ve 1000 µl'lik oranlarda antibiyotik antifungal karışımı (1 mL'de 10000 unite penisilin, 10 mg streptomisin and 25 µg amfoterisin B) içeren ve bu karışımdan içermeyen MS ortamlarına 30'ar adet ekilmişlerdir.

4.2.3. *In vitro* kültürlerin oluşturulması

Bu aşama, ortamlara ekilen eksplantlarda gelişen ve parçalanabilir yapıdaki kallusların farklı

ortamlara transfer edilmeleriyle kurulan kallus ve süspansiyon kültürleri ile biyoreaktör sistemlerini kapsamaktadır.

4.2.3.1 Eksplant ekimi

Eksplantlar, sterilizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Çizelge 4.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan MS, B5, LS ve SH ortamlarına ekilmişlerdir. Eksplant olarak kullanılan tek yıllık gövdeler, yapraklar ve ince kök parçaları 0.5-1 cm; kök üstündeki gövde sürgünleri (Şekil 4.1.c, d) ise 0.1- 0.5 cm uzunluğundaki parçalar halinde trimlenmelerinin ardından her petriye 5 -10 adet eksplant ekilmişlerdir. Ekim yapılırken eksplantların birbirine çok yakın olmamasına, besiyerine batırılmamasına ve dengeli dağılımlarına dikkat edilmiştir. Ekim işlemi bittikten sonra petrilerin kapakları kapatılarak kenarları parafilmle sarılmıştır. Tüm gelişim süreçleri bitki yetiştirme odasında, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklıkta ve karanlıkta tutularak gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.2. Kallus kültürleri

Eksplant ekimini takip eden ilk 40 gün kallus oluşumu aşaması olarak adlandırılmıştır. Bu aşamadan sonra gelişimlerine devam eden kalluslar her 40 günde bir aynı içeriğe sahip taze ortamlara aktarılarak alt kültürleri yapılmıştır. Bu şekilde, kallus kültürü çalışmasında kök ve sürgün eksplantlarından oluşan kalluslar 3 alt kültür boyunca izlenmişlerdir. Her alt kültüre aktarım aşamasında aktarılan kallusların ağırlıkları tartılmış ve bir miktar kallus tartılıp analiz yapılabilmesi için derin dondurucuya alınmıştır. Kallusların yaş ağırlıklarına göre gelişiminin izlenmesi için kallus kütle büyüme indeksi (KBİ) hesaplanmıştır (53).

$$\text{Kallus Kütle Büyüme İndeksi (KBİ)} = \frac{\text{Son hücre ağırlığı (g)}}{\text{İlk hücre ağırlığı (g)}}$$

4.2.3.3. Süspansiyon kültürleri

Süspansiyon kültürleri oluşturulurken, öncelikle kallus kültürlerinde çalışılan besin ortamları arasında en iyi kallus elde edilen MS ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlara, yine MS ortamı

kullanarak kurulan kallus kültürlerinde elde edilen iyi dağılabilen beyaz-sarı renkli kalluslar aşulararak (inokülasyonu) kültürler kurulmuştur. Burada her bir 100 mL'lik erlenmayer içerisinde 25 mL sıvı MS ortamı konularak otoklavda steril edilmiş ardından steril kabinde tartılan 2 g kallus ilave edilmiştir. Hazırlanan kültürler, bitki yetiştirme odasında 110 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcılarda, 25°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir (Şekil 4.2). Süspansiyonların alt kültürlerinde ise 100 mL'lik erlenmayerlere 50 mL ortam üzerine 10 mL süspansiyon aktarılmış ve aynı şartlarda çalkalanma işlemine devam edilmiştir.



Şekil 4.2. Süspansiyon kültürlerinin genel görünümü

Süspansiyon kültürlerini zamanında yeni ortama transfer etmek ve sonraki çalışmalarda hedeflenen sekonder metabolit üretimini artırma denemeleri için süspansiyon kültüründe büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Büyüme eğrisi oluşturmak için 45 adet 100 mL'lik erlenmayer hazırlanmıştır. 15 günlük 2. alt kültür süspansiyonlarından ikişer gram hücre alınarak 25 mL'lik MS ortamlarına aktarılmıştır. 30 gün boyunca üçer gün ara ile üçer adet süspansiyon kültürü naylon ve sık gözenekli bir kumaştan (por çapı yaklaşık 3.2-3.3 μm^2), Buchner hunisi yardımıyla süzölmüştür. Hücreler süzöldükten sonra yaş ağırlıkları tartılarak büyüme eğrisi oluşturulmuş, süzöntüden geriye kalan ortamların da hacimleri ölçölmüştür (Çizelge 5.8).

4.2.3.4. Biyoreaktör sistemleri

Çalışmanın asıl hedefi olan büyük çapta şikonin ve türevlerinin üretilmesini sağlamak amacıyla kurulan biyoreaktör çalışmalarında, 500 mL hacimli geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılmıştır. Burada M9 ve M10 ortamları ile çalışılmıştır. Sistemlerin optimize edilmesinde çeşitli faktörlerin irdelenmesiyle farklı deney sistemleri oluşturulmuştur. Her aşamada iyi olan uygulamaların üzerine gidilerek iyi yanıt alınamayan sistemler elenmiştir.

4.2.4. *In vitro* kültürlerde sekonder metabolit üretilmesi ve arttırılması üzerine yapılan çalışmalar

Modifiye edilmiş MS ortamı kullanarak kurulan kallus kültürlerinden elde edilen iyi dağılabilen, beyaz renkli ve parçalanabilir yapıdaki kalluslar, şikonin ve türevleri ile rozmarinik asit üretimini arttırabilmek amaçlı çeşitli denemelerde kullanılmıştır.

Mantar, Metil Jasmonat gibi uyarıcıların, şikonin türevleri gibi rozmarinik asit sentezini de uyardıkları bildirildiğinden (47, 49) fungal uyarıcı uygulaması yapılan süspansiyonlarda rozmarinik asit varlığı araştırılmıştır.

4.2.4.1. Süspansiyon kültürlerinde elisitör denemeleri

Süspansiyon kültürlerinde, hücre büyüme periyotları belirlendikten sonra alt kültürler oluşturulmuş ve çeşitli elisitörlerin (uyarıcıların), hücre büyümesine olan etkileri de incelenerek şikonin ve türevlerinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

4.2.4.1.1. Metil Jasmonat uygulanması

5.4 mL Metil Jasmonat (MJ) etanolla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Uygulamadan önce pH'ı 5.8'e ayarlanarak stok çözelti hazırlanmıştır (242).

Kallus kültürlerinden 2 g ağırlığında hücre alınarak 25 mL sıvı ortam içeren 100 mL'lik 60 adet erlenmayere transfer edilmiştir. Hazırlanan MJ çözeltisi, süspansiyon kültürlerinin 14. gününde 0.45 µm por çapına sahip naylon filtrelerden süzülerek ilave edilmiştir. 25 mL'lik

kültür ortamına; stok çözeltiden 0.5 mL alınarak ilave edildiğinde 50 µM, 1 mL ilave edildiğinde ise 100 µM uyarıcı konsantrasyonu sağlanmıştır.

Kontrol hattı ilk günden 27. güne kadar her 3 günde bir süzüldü, hücreler tartılmış ve kalan sıvı hacim de mezür yardımıyla ölçülmüştür. MJ ilave edilen süspansiyonlar ise 17. günden 27. güne kadar her 3 günde bir aynı saatte süzülerek ayrılmıştır. Hücreler ve sıvı ortam analiz için -20°C’da saklanmıştır. MJ ilave edilen ve kontrol süspansiyon kültürlerinin hücre ağırlıkları ve sıvı ortam hacimleri karşılaştırılmıştır. Daha sonra hücreler liyofilize edilerek kurutuldu ve analizde kullanılmıştır.

4.2.4.1.2. Fungal uyarıcıların uygulanması

A. densiflora süspansiyon kültürlerinde fungal elisitör olarak *Aspergillus niger* ve *Rhizopus stolonifer* kullanıldı (81, 71).

A. niger ve *R. stolonifer* Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Zekai Katırcıoğlu’ndan temin edilmiştir. Petrilerden sıvı ortama alınarak 2 haftada çoğaltılan funguslar süzölmelerinin ardından 90°C’de 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. 0.2 g kurutulmuş *A. niger* ve *R. stolonifer*’den alınıp toz edilmiştir. Distile su ile 20 mL’ye tamamlanarak elisitör olarak kullanılmak üzere 10 g/L konsantrasyonda stok hazırlanmıştır.

MS ortamı kullanarak kurulan ve 21 gün süreyle izlenen süspansiyon kültürlerine, 0., 3., 6., 9., 12. ve 15. günlerde fungus stoklarından 1’er mL alınarak eklenmiştir. Her bir fungus ve kontrolden üç tekrarın bulunduğu kültürler 21. günde süzölmüştür. Süspansiyonlar çok sık dokumalı naylon bez ile buchner hunisiden vakumla süzülerek hücre ve sıvı kısım olarak ayrılmıştır. Hücreler liyofilize edilerek kurutulmuşlardır, sıvı kısımlar ise doğrudan etil asetat ile ekstraksiyona tabi tutulmuş ve İTK analizinde kullanılmıştır. Liyofilize edilen hücreler, şikonin ve türevlerinin kalitatif analizleri amacıyla kloroform ile ekstre edilirken, rozmarinik asit analizi için ise metanolle ekstre edilmiştir (0.1 mg/mL).

Rozmarinik asit analizinde, ince tabaka kromatografisinde standart olarak kullanmak amacıyla *Rosmarinus officinalis* bitkisinin yaprak ekstresi kullanılmıştır. Burada 0.5 g tartılan *R. officinalis*’in üzerine 5 mL metanol eklenerek 15 dk ultrasonik banyoda tutulmuş

ve 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kontrol ve *R. officinalis* ekstrelerinin uygulandığı plak, S3 solvan sisteminde sürüklendikten sonra Naturstoff belirteci (NA) püskürtülerek lekeler belirginleştirilmiştir.

4.2.4.2. Ortam pH'larının değiştirilmesi

Şikonin ve türevlerinin; pH değişimi ile renk değiştirdiği ve pH değişikliğinin hücreler üzerinde stres oluşturarak şikonin türevlerinin üretilmesini uyaracağı düşüncesiyle ortamdaki pH değişikliğinin etkileri incelenmiştir. İkişer adet kallus ve süspansiyon hattı oluşturularak ortamların pH'ları 2, 4, 5, 6, 7, 8 ve 10 olarak ayarlanmıştır. Magentalara ve 25 mL sıvı ortam içeren süspansiyonlara ikişer g hücre ilave edilerek 2 gruba ayrılan çalışmada ilk grup kallus ve süspansiyonlar 14 gün, ikinci grup ise 28 gün inkübe edilmiştir. Renk ve ağırlık değişimleri açısından değerlendirme yapılmıştır.

4.2.4.3. Farklı besin ortamlarının şikonin ve türevlerinin üretimi üzerine olan etkileri

4.2.4.3.1. Altı farklı ortam üzerinde yapılan çalışmalar

Kallus ve süspansiyon kültürlerinde farklı ortam ve uygulamaların şikonin üretimi üzerine olan etkilerini belirleyebilmek amacıyla yapılan çalışmada; hücre hattının oluşturulduğu MS ortamında geliştirilen kalluslar 6 farklı ortama (NAA ve KIN hormonları içeren Murashige Skoog ortamı (MS), hormon içermeyen MS ortamı, NH₄ içermeyen MS ortamı, hormon ve NH₄ içermeyen MS ortamı, M9 ortamı, M10 ortamı) eşit miktarlarda konulmasının ardından ağırlık artışları ile birlikte renk değişimleri izlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu ortamlar belirlenirken şikoninin arttırılmasında rol oynayan ve inhibisyonuna neden olan etmenler (Çizelge 2.5) dikkate alınarak ve literatür çalışmalarından hareketle MS ortamında çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. MS ortamlarının yanısıra şikonin üretimini indükleyici şartlar göz önüne alınarak düzenlenmiş olan M9 (58) ve M10 (59) ortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.5). Bu ortamlarda şikonin biyosentezini indüklediği belirlenen Cu²⁺ iyonları ile IAA ve KIN hormonları kullanılırken, şikonin biyosentezini inhibe edici olan nitrat miktarı azaltılmış ve amonyum kullanımından kaçınılmıştır.

Çizelge 4.5. 6 farklı ortam çalışmasında kullanılan hormon ve amonyum tuzu içerikleri

	MS (1)	MS (2)	MS (3)	MS (4)	M9 (5)	M10 (6)
Hormonlar	NAA + KIN	-	NAA + KIN	-	IAA	KIN
NH₄	+	+	-	-	+	+

Bu çalışmada farklı ortamların etkilerinin yanısıra, büyüme düzenleyici (hormon) ve NH₄ tuzlarının hücre kültürleri üzerine olan etkileri de araştırılmıştır. Kallus kültürlerinde bu ortamlara konulan eşit miktar ve görünümdeki kallusların değişimleri 40 gün süre ile izlenmiş ve her 10 günde bir hücreler tartılarak ayrılmıştır.

Bu uygulama süspansiyon kültürlerine 2. alt kültürde iken uygulanmıştır. Devam eden süspansiyon kültüründen 10 mL alınarak 6 farklı ortama transfer edilmiş ve 110 rpm'de karanlıkta çalkalanmaya bırakılmıştır. Her bir ortamdan 3 süspansiyon hattı hazırlanmıştır. Süspansiyon kültürleri kallus kültürlerinden daha hızlı geliştiği için 21 gün boyunca izlenmiştir. 7., 14. ve 21. günlerde hücre ve ortamlar süzülerek ayrılmıştır. Renk ve ağırlık değişimleri incelenmiştir.

4.2.4.3.1. MS, M9 ve M10 ortamlarının kullanıldığı kallus ve süspansiyon kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar

Bu çalışma, altı farklı ortam üzerinde kurulan kültürlerde ağırlık ve renk değişimi ile naftokinon üretiminin araştırıldığı çalışmanın sonuçları gözönünde bulundurularak kurulmuştur. Burada, kök eksplantlarından gelişen kalluslar ile çalışılmıştır. Şikonin ve türevlerinin üretimi ile renk değişimi bakımından en iyi yanıt alınan ortamlar olan M9 ve M10 ile birlikte kallus gelişiminin incelenmesi amacıyla da MS ortamları kullanılmıştır.

MS ortamında gelişen kök kallus hatlarından alınan beyaz renkli, parçalanabilir yapıdaki 10'ar g kallusun; MS, M9 ve M10 ortamlarına transfer edilmesi ile kurulan kallus kültürleri 50 gün süre ile izlenmiştir. Bu süre içinde 10. günden itibaren 5 gün ara ile örnekler alınmıştır ve analizi gerçekleştirilecek olan bu örnekler K-M9 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,

45, 50; K-M10 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 olarak kodlanmıştır.

Süspansiyon kültürü için içerikleri kallus kültürleri ile aynı olan MS, M9 ve M10 ortamları hazırlanmıştır. MS ortamında gelişen kalluslardan 4'er g alınıp 150 mL'lik cam erlenmayerlere konulan 60'ar mL'lik MS, M9 ve M10 ortamlarına ilave edilmesi ile kurulan süspansiyon kültürleri bitki yetiştirme odasında 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcılarda, 25°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. 20 gün boyunca izlenen kültürlerden 5 gün ara ile hücreler ayrılmıştır. M10 ortamında ise deney 50. güne kadar uzatılmıştır. Örnekler S-M9 15, 20, S-M10 15, 20 ve 50 şeklinde kodlanmıştır.

Kodlama yapılırken, numune kodunun önüne kallus kültür örnekleri için K, süspansiyon kültürleri için ise S konuldu ve ardından hasat edildikleri günler eklenmiştir.

4.2.4.4. Biyoreaktörlerde yapılan çalışmalar

Çalışmada hedeflenen büyük çapta şikonin ve türevlerinin üretilmesini sağlayacak olan biyoreaktör denemelerinde sistemin optimize edilmesi için birbiri ardına farklı deney sistemleri oluşturulmuştur. Her aşamada iyi olan sistem üzerine gidilerek iyi yanıt alınamayan sistemler elenmiştir.

İlk denemede süspansiyon kültürlerinde kullanılan M9 ve M10 ortamları kullanılıp öncelikle reaktörün sürekli mi, kesikli mi olacağına karar verilmek üzere, geçici daldırma sistemine sahip reaktörlerde sistem kurulmuştur. Burada öncelikle, çalkalama ve bekleme zamanları arasındaki ilişkinin şikonin üretimine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1 birim zaman (15 dk) çalışıp 3 birim zaman (45 dk) bekleyen hücreler (15/45-3:1), 3 birim zaman çalışıp 1 birim zaman bekleyen hücreler (45/15-3:1) ve 5 birim zaman çalışıp 1 birim zaman bekleyen hücrelerin (75/15-5:1) değişimleri izlenmiştir. Reaktörlerdeki 430 mL hacimli M9 ve M10 ortamlarına, MS ortamında gelişen beyaz renkli kalluslardan 4'er g transfer edilmiştir. Burada 15/45 (1:3), 45/15 (3:1), 75/15 (5:1) ve sürekli şekilde çalışan sistemlerden üçer tane kullanılarak 12 adet biyoreaktör sistemi oluşturulmuştur.

2. denemede sürekli çalışan sistemler kullanılıp M10 ortamlarına aynı miktarda KIN ve askorbik asit (0.5 mg/L) eklenmiştir. Ayrıca sakaroz miktarlarının değişiminin ve oksin

ilavesinin renklenme üzerine etkisi incelenmiştir. Deneme ikiye bölünüp bir grubun ortamlarına oksin olarak, KIN ve askorbik asit kadar IAA konulmuştur. Askorbik asit ve büyüme düzenleyici (IAA, KIN) oranları sabit tutulup sadece sakaroz oranları değiştirilmiştir. Her grupta ikişer adet 1/1 (50 g), 1/2 (25 g) ve 1/4 (12.5 g) oranlarında sakaroz kullanılarak ortamlar hazırlanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. İkinci biyoreaktör denemesinde hazırlanan ortamların içerikleri

I. GRUP	II. GRUP
KIN + Askorbik asit (0.5mg/L)	KIN + Askorbik asit + IAA (0.5 mg/L)
1) 1/1 = 50 g sakaroz	4) 1/1 = 50 g sakaroz
2) 1/2 = 25 g sakaroz	5) 1/2 = 25 g sakaroz
3) 1/4 = 12.5 g sakaroz	6) 1/4 = 12.5 g sakaroz

3. denemede 10 farklı sistem kullanılarak birçok faktörün etkisi incelendi. 0.5 mg/L KIN içeren 430 mL'lik M10 ortamının kullanıldığı reaktörlerde; çalışma hızı, askorbik asit miktarı, sakaroz miktarında değişikliklerin etkileri izlenmiştir. Bu sistemlerin içerikleri ve kodları aşağıda belirtilmiştir.

- 1) 50 g sakaroz ve 3:1 zamanlı reaktör (3 birim zaman çalışma: 1 birim zaman bekleme)
- 2) 50 g sakaroz ve 5:1 zamanlı reaktör
- 3) 50 g sakaroz ve sürekli reaktör
- 4) 50 g sakaroz, sürekli ve 0.1 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 5) 50 g sakaroz, sürekli ve 0.3 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 6) 50 g sakaroz, sürekli ve 0.5 mg/L IAA içeren reaktör
- 7) 50 g sakaroz, sürekli, 0.5 mg/L IAA ve 0.1 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 8) 50 g sakaroz, sürekli, 0.5 mg/L IAA ve 0.3 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 9) 60 g sakaroz ve sürekli reaktör
- 10) 70 g sakaroz ve sürekli reaktör

4. denemede 0.5 mg/L KIN ile 0.5 mg/L IAA içeren 430 mL'lik M10 ortamı sabit tutulup çalışma hızı, askorbik asit miktarı (0.1-0.05 mg/L) ve sakaroz miktarında değişiklikler yapılarak (50-60 g) bunların etkileri 20 gün süre ile izlenmiştir. Burada da MS ortamında

gelişen kalluslardan 4'er g reaktörlere transfer edilmiştir. Bu sistemlerin içerikleri ve kodları aşağıda belirtilmiştir.

- 1) 60 g sakaroz 3:1 zamanlı reaktör
- 2) 60 g sakaroz 5:1 zamanlı reaktör
- 3) 60 g sakaroz, sürekli ve 0.1 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 4) 60 g sakaroz, sürekli ve 0.05 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 5) 50 g sakaroz, sürekli ve 0.1 mg/L Askorbik asit içeren reaktör
- 6) 50 g sakaroz, sürekli ve 0.05 mg/L Askorbik asit içeren reaktör

5. denemede pH denemesi yapılmıştır, 400 mL hacimli M10 ortamında oksin oranı 0.5 mg/L'den 1 mg/L'ye, kallus oranı da 5 g'dan 20 g'a çıkarıldı. pH: 5.75; 6.5; 7.25; 8.0 ve 8.75 olacak şekilde 5 pH değeri kullanılmıştır. Kurulan sistemlerde, biyoreaktörlere konulan ortamın içeriği (60 g sakaroz, 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L IAA, 0.1 mg/L askorbik asit) ve transfer edilen kallus oranı (% 5 =20 g) sabit tutularak pH değerleri değiştirilmiştir. Ayrıca tüm pH değerlerinden katı ortamlar hazırlanarak magentalara aktarılmıştır. Her bir magentaya 35'er g kallus konularak 30 gün boyunca incelenmiştir.

6. denemede kurulan sistemlerde, biyoreaktörlere 60 g sakaroz, 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L IAA, 0.1 mg/L askorbik asit içeren 400 mL M10 ortamı konulup pH'ları 8.75'e ayarlanmıştır. Burada 8 adet reaktörde ortama eklenen kallus oranları artırılarak 40 g'a çıkarılırken (% 10), iki reaktöre ise 20 g kallus transfer edilerek sistem oluşturulmuştur.

7. denemede 12 reaktörden oluşan bir deney kurulmuştur. Burada 6. denemedeki ortam kullanılıp, üçer adet reaktöre 40, 50, 60 ve 80'er g kallus inoküle edilmiştir. 25 gün süre ile incelenen sistemlerin hücre ve ortamları 20. ve 25. günlerde hasat edilmiştir.

4.2.5. Şikonin ve türevlerinin analizi

Doku kültürü çalışmaları sonucunda üretilen serbest şikonin ve türevlerini teşhis etmek ve hidroliz işlemiyle şikonin oluşumu gözlemleyebilmek amacıyla öncelikle İTK analizi yapılmıştır. İTK'ni takiben spektrofotometrik olarak miktar tayini, ardından da daha net sonuç alabilmek ve örneklerin içeriklerindeki şikonin türevlerinin profillerinin

belirlenebilmesi amacıyla ters faz HPLC (RP-HPLC) analizleri yapılmıştır. *A. densiflora* bitkisinin kök, kabuk ve kök+kabuk kısımları ile *in vitro* olarak elde edilen hücrelerdeki şikonin türevleri analiz edilerek karşılaştırılmıştır.

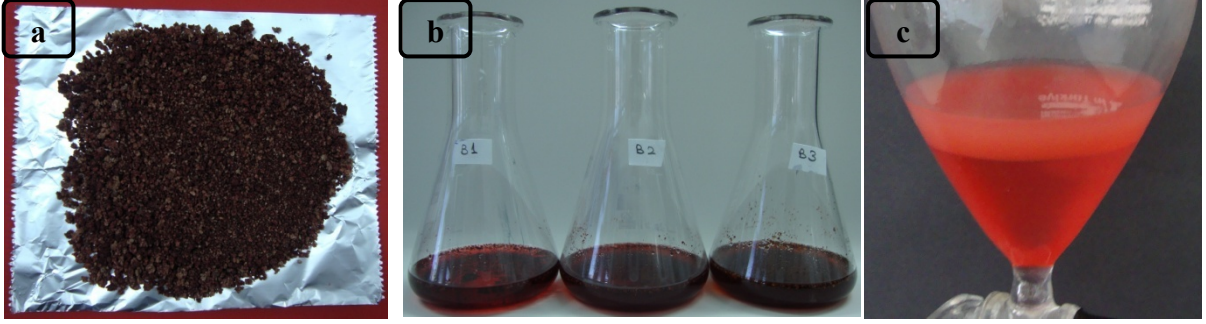
RP-HPLC kromatogramlarında görülen hidroliz işlemi sonucunda elde edilen tek pikin alkannin mi şikonin mi olduğunun belirlenebilmesi amacıyla ise kiral kolon kullanılarak HPLC çalışması yapılmıştır. Kaynak olarak kullanılan bitkinin kök kısımlarında, alkannin-şikonin enantiyomerlerinin hangi oranlarda buldukları belirlenerek, *in vitro* kültürlerden elde edilen hücre ve ortamlarda, bu oranlarda gerçekleşen değişim tespit edilerek karşılaştırılmıştır.

Kallus kültürlerinde M9 ve M10 ortamlarının 10., 15., 20., 25., 30., 35., 40., 45. ve 50. gün örnekleri, süspansiyon kültürlerinde 10., 15. ve 20. gün örnekleri, biyoreaktörlerde ise iyi renklenmenin görüldüğü M10 ortamlarında 20. ve 25. günde geliştirilen hücreler ile hücre dışına salınarak sıvı ortama geçen şikonin ve türevlerinin miktarları analiz edilmiştir.

4.2.5.1. *In vitro* kültürlerden elde edilen hücre ve ortamlar ile *A. densiflora* ekstresinin hazırlanması

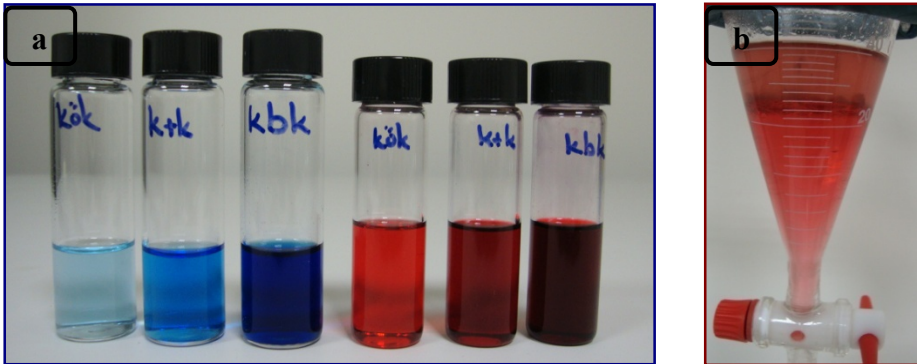
In vitro olarak elde edilen hücrelerin içeriğinde bulunan şikonin ve türevlerinin araştırılması amacıyla alt kültüre alınma esnasında tartılarak hasat edilen kalluslar kullanılmıştır. İçerdikleri maddelerin bozulmasını minimum seviyede tutmak için derin dondurucuda (-20°C) tutulan hücreler daha sonra liyofilizatörde kurutulup analiz aşamasına kadar desikatörde korunmuşlardır. -20°C tutulan *A. densiflora* bitkisinin kökü, kabuk kısmı ile birlikte kökü ve yalnızca kabuk kısımları da analiz amacı ile ayrı ayrı kullanılmıştır.

Kallus kültürlerinden alınan, süspansiyon kültürleri ve biyoreaktör sistemlerinden ise süzülerek ayrılan hücreler liyofilize edildikten sonra 0.4 g tartılıp kloroformla iki kez ekstre edilmiştir (Şekil 4.3.a-b). Süzüntüler birleştirilip balonjojede 10 mL'ye tamamlanmıştır. Sıvı kısımlar ise doğrudan kloroformla ayırma hunisinde ekstraksiyona tabi tutulmuşlardır (Şekil 4.3.c). Bunlardan 2 mL alınarak evapore edilmiştir. *A. densiflora* bitkisinin kökü, kabuk kısmı ile birlikte kökü ve yalnızca kabuk kısımları da aynı şekilde 0.4'er g tartılarak 5 mL kloroform ile iki kez ekstre edilmelerinin ardından 10 mL'ye tamamlanıp, evapore edildikten sonra karşılaştırma amaçlı olarak analiz edilmişlerdir.



Şekil 4.3. Biyorektörlerden süzülerek ayrılan hücrelerin liyofilize edildikten sonraki görünümleri (a) ve ekstraksiyonları (b) ile ortama geçen maddelerin doğrudan ekstraksiyonu (c)

Şikonin türevlerinin hidrolizi için öncelikle aynı şekilde hazırlanan kloroformlu ekstraler kullanılmıştır. Ekstreler, kurumalarının ardından 100 μ L 2-propanol ile çözülmüşlerdir. Daha sonra üzerlerine 3 mL 1N NaOH eklenmiştir (219). 6 saat karanlıkta bekletilen örneklere 1N HCl eklenerek pH'nın 3 olması sağlanmıştır (Şekil 4.4.a) . Hidrolize olarak pembe-kırmızı renk alan ekstrelerin üzerine kloroform eklenmiş ve iki faz oluşmuştur. (Şekil 4.4.b). Ayırma hunisinin üst kısmında renksizlik gözlenene kadar maddelerin kloroforma geçişleri sağlanmıştır. Kloroforma geçen kısımlar da su ile 2 kez yıkanarak kalıntılardan ayrılmıştır. Evapore edilen örneklerden şikonin elde edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Bu örnekler kodlanırken numune kodunun önüne T- konulmuştur (örneğin T-M9 kodlu örnek; M9 ortamında gelişen kallus kültürü hücrelerinin kloroformla ekstraksiyonunu takiben hidroliz edildiğini belirtmektedir. Sonrasında da numunelerin hasat edildiği gün eklenmiştir) (Şekil 5.23).



Şekil 4.4.a. Kloroformu uçurulan bitki kök ekstralarının üzerine 1N NaOH (mavi) ve 1N HCl eklendikten (kırmızı) sonraki görünümleri **b.** Hidrolize edilen ekstraktın kloroforma geçen fazının ayrılması

4.2.5.2. Standart maddelerin hazırlanması

Standart olarak ticari şikonin (Chromadex, CA, USA) ve *Arnebia purpurea* 'dan izole edilen (Yüzbaşıoğlu 2010*) asetilalkannin kullanılmıştır. Standartların çözülmesinde İTK analizlerinde kloroform kullanılırken, HPLC çalışmalarında metanol kullanılmıştır. Her birinden 1'er mg tartılarak üzerine 10 mL çözücü eklendi ve konsantrasyon 0.1 mg/mL= 100 ppm olarak elde edilerek ardından dilüsyonları oluşturulmuştur (Çizelge 4.8).

4.2.5.3. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Kallusların içeriğindeki sekonder metabolitler hakkında bilgi edinebilmek amacıyla ince tabaka kromatografisi (İTK) yapılmıştır. Tatbikler Merck marka silika jel plaklara (Kieselgel 60 F₂₅₄) yapılmıştır. İTK analizinde kullanılan solvan sistemleri S1, S2, S3 ve S4 olarak kodlanmıştır. Bu sistemler:

- S1) Hekzan: Etil asetat: Asetik asit (85:15:0.5)
- S2) Petrol eteri: aseton: klorofom : asetik asit (220:7.2:4.8:1.2) (243)
- S3) Toluen: Etilasetat: Formik asit (5:4:1) (244)
- S4) Toluen: Asetik asit (99:1) (245)

İTK analizlerinde kullanılan iki ayrı solvan sistemi (S1 ve S2) aracılığıyla, numunelerin kloroformlu ekstralarında şikonin ve türevlerinin ayrımı yapılarak gün ışığında net bir şekilde teşhis edilmiştir. S3 solvan sistemi ile ise rozmarinik asit ayrımı gerçekleştirilmiştir.

*İTK ve HPLC çalışmalarında kullanılan asetilalkannin standardı Prof.Dr Ayşe Kuruüzüm Uz'dan temin edilmiştir.

4.2.5.4. Spektrofotometrik çalışmalar

Standart olarak Şikonin (Chromadex, CA, USA) kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. CHCl₃ ile 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.0312 mg/mL'lık konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Kloroformun uçurulmasının ardından kuru ekstre üzerine 4 mL % 2.5' lik KOH ilave edilerek 10 dk çalkalanmışve spektrofotometrede (Beckman Du-600 serisi, ABD) 400-700 nm'de taranarak 620 nmde ölçümler alınmıştır. Bu değerlere göre

şikinin kalibrasyon eğrisi oluşturularak elde edilen denklem hesaplamalarda kullanılmıştır.

0.4 g tartılarak 10 mL'ye tamamlanan numunelerin kloroformlu ekstraktlarından 2 mL'si alınarak oda sıcaklığında uçuruldu ve üzerlerine 4 mL % 2.5 KOH çözeltisi konulmuştur. Koyu mavi renk oluşumu görülen ekstreler 620 nm'de absorbansları ölçülerek şikonin miktarları belirlenmiştir.

4.2.5.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yapılan çalışmada tüm örnekler cihaza verilmeden önce 0.22 µm por çapındaki naylon filtrelerden geçirildi. Aynı şekilde solvanlar da Sartorius marka süzme kitinden 0.45 µm por çapına sahip naylon filtreden geçirildi.

4.2.5.5.1. Ters faz HPLC

Ters faz HPLC kullanılarak gradient yöntemi ile analiz yapılmıştır (Çizelge 4.7). Şikonin ve asetilalkannin standartları ile numune çözeltilerinden hazırlanan uygun dilüsyonlar filtrelerden geçirilmiştir. 2 mL'lik viallere konulan örnekler kolona uygulanmadan önce vortekslenmiştir. 20 µl'lik miktarlarda, hassas olarak her örnek için 3 defa enjeksiyon yapılmıştır (219).

Cihaz	: Waters HPLC System
Kolon	: Synergi 4u Max-RP 80A , 4 µM partikül büyüklüğünde (250 mm x 4.6 mm), Phenomenex, USA
Solvan sistemi	: % 0.025 Trifluorasetik asit içeren su : Asetonitril
Akış hızı	: 1 mL/ dk
Dalga boyu	: UV 520 nm
Kolon basıncı	: 179-181 bar
Kolon sıcaklığı	: 30°C
Numune sıcaklığı	: 5°C
Enjeksiyon hacmi	: 20 µl

Çizelge 4.7. RP-HPLC'de gradient yöntemine göre solvan kullanımı

Zaman	% 0.025 TFA'li Su	Asetonitril
0	40	60
10	27	73
13	25	75
20	20	80
25	0	100
27	40	60
30	40	60

4.2.5.5.2. Normal faz HPLC (Enantiyomerlerin ayrımı)

Karışım halinde bulunan alkannin ve şikonin enantiyomerlerinin oranlarının belirlenmesi amacıyla HPLC kullanılarak normal faz kiral kolon aracılığı ile analiz yapılmıştır. Şikonin ve alkannin standartları ile hidroliz edilmiş numune çözeltilerinden hazırlanan uygun dilüsyonlar filtrelerden geçirilmiş ve 2 mL'lik viallere konulmuştur. Örnekler kolona uygulanmadan önce vortekslenmiştir. 20 µl'lik hacimlerdeki enjeksiyonlar her örnek için 3 defa tekrarlanmıştır (28). Standart maddelerinden hazırlanan seri dilüsyonların (Çizelge 4.9) HPLC kolonuna uygulanması ile elde edilen piklerin alanlarının (y), konsantrasyon değerine (x) karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

Cihaz	: Waters
Kolon	: Chiralcel OD-H (Daicel), 4µM partikül büyüklüğünde (250mm x 4.6 mm)
Solvan sistemi	: Hekzan: 2-propanol (90:10)
Akış hızı	: 0.75 mL/ dk
Dalga boyu	: UV 520 nm
Kolon basıncı	: 179-181 bar
Kolon sıcaklığı	: 25°C
Numune sıcaklığı	: 5°C

4.2.5.7. HPLC sonuçlarının değerlendirilmesi

4.2.5.7.1. Piklerin doğruluğunun belirlenmesi

Cihazlara öncelikle standart maddeler verilmiş ve alıkonma (tutulma) zamanları (Rt-retention time) ile spektrumları belirlenmiştir. Daha sonra cihaza *A. densiflora* ekstraktları verildi ve elde edilen kromatogramlarda standart maddelerin varlığı araştırılmıştır. Örnekler cihazda analiz edilerek, alıkonma zamanları standart maddelere yakın olan pikler belirlenmiştir. Piklerin aranan standart maddeye ait olup olmadığını belirlemek için örneğin spektrumu ile standart maddenin spektrumu karşılaştırılmıştır. Eşleşen spektrumlar, örnekteki pikin standart madde olduğunu doğrulamıştır.

4.2.5.7.2. Ters faz HPLC’de kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

Standart çözeltilerinden hazırlanan uygun seri dilüsyonların (Çizelge 4.8) HPLC kolonuna uygulanması ile şikonin ve asetilalkannin standartları için elde edilen piklerin alanlarının (y), konsantrasyon değerine (x) karşı grafiğe geçirilmesiyle her iki standart maddenin kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

Çizelge 4. 8. Ters faz HPLC’de şikonin, alkannin ve asetilalkannin standartlarının dilüsyon serisi

	Konsantrasyon (µg/mL)
1. Dilüsyon	800
2. Dilüsyon	600
3. Dilüsyon	400
4. Dilüsyon	200
5. Dilüsyon	100
6. Dilüsyon	30
7. Dilüsyon	20
8. Dilüsyon	15
9. Dilüsyon	10
10. Dilüsyon	1

4.2.5.7.3. Normal faz HPLC’de kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

Standart çözeltilerinden hazırlanan uygun seri dilüsyonların (Çizelge 4.9) HPLC kolonuna uygulanması ile şikonin ve alkannin standartları için elde edilen piklerin alanlarının (y), konsantrasyon değerine (x) karşı grafiğe geçirilmesiyle her iki standart maddenin kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

Çizelge 4. 9. Normal faz HPLC’de şikonin ve alkannin standartlarının dilüsyon serisi

	Konsantrasyon (µg/mL)
1. Dilüsyon	800
2. Dilüsyon	600
3. Dilüsyon	400
4. Dilüsyon	200
5. Dilüsyon	100
6. Dilüsyon	30
7. Dilüsyon	20
8. Dilüsyon	15
9. Dilüsyon	10
10. Dilüsyon	1

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

A. densiflora bitkisi kireçli topraklarda yetiştiğinden çalışmanın başlangıcında özellikle kök eksplantlarında yüzey sterilizasyonunun ardından çok yoğun kontaminasyon gözlenmiştir. Asıl olarak şikonin ve türevlerinin bulunduğu kısımlar olan köklerde en az kontaminasyon oranını yakalayabilmek amacıyla farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle eksplantlarda kontaminasyon oranının minimuma düşürülüp kallus oluşturma oranının artırılması yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

5.1. Eksplantların Sterilizasyonu

5.1.1. Tween 20 ile NaOCl Kullanımı

Besiyeri olarak MS1, MS3 ve LS ortamlarının kullanıldığı ilk denemelerde yoğun bir kontaminasyon problemi ile karşılaşmıştır. Toplam 375 eksplantın kullanıldığı ilk ekimin 91'inde kontaminasyon gözlenmiştir. Geriye kalan eksplantların çok az kısmında kallus gelişimi sağlanmıştır. % kontaminasyon oranı NaOCl konsantrasyonu arttıkça düşmesine rağmen bitki doku kültüründe kullanımı için çok yüksek olan % 40 gibi bir konsantrasyonda dahi kontaminasyon gözlenmiştir (Çizelge 5.1). % 35-40'lık NaOCl konsantrasyonlarının eksplantlardaki canlı hücrelere verdiği zarar, eksplantlarda beyazlaşmalar şeklinde görülmüştür.

Çizelge 5.1. Yüzey sterilizasyonunda NaOCl konsantrasyonlarına göre farklı ortamlardaki eksplantlarda görülen kontaminasyonlar (%)

ORTAMLAR	NaOCl (%)			
	20	25	35	40
MS1	37	25	0	0
MS3	54	4.54	5	15.15
LS	100	50	16.66	0

5.1.2. MS Ortamda NaOCl ile Birlikte Antibiyotik-Antifungal Karışımları ve PPM Kullanımının Karşılaştırılması

% 25 NaOCl ile eksplant sterilizasyonunu takiben kültür ortamına eklenen antibiyotik-antifungal karışımları ile eksplant sterilizasyonunda kullanılan ve ortama katılan PPM'in etkileri karşılaştırılmıştır. MS ortamının kullanıldığı çalışmaya ait veriler Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. % 25 NaOCl ile yüzey sterilizasyonundan sonra Penisilin+Streptomisin+Amfoterisin B içeren MS ortamına ekilen eksplantlarda belirlenen % kontaminasyon ve kallus oluşum oranları

Eksplant	%	Amfoterisin B Oranları	
		500 µl	1000 µl
Sürgün	Kallus oluşumu	26.42	24.11
	Kontaminasyon	26.89	25.9
Kök	Kallus oluşumu	2.53	1.14
	Kontaminasyon	93.75	72.73

Çizelge 5.3. Farklı oranlarda PPM ile yüzey sterilizasyonundan sonra % 0.5 PPM içeren MS ortamına ekilen eksplantlarda belirlenen % kontaminasyon ve kallus oluşum oranları

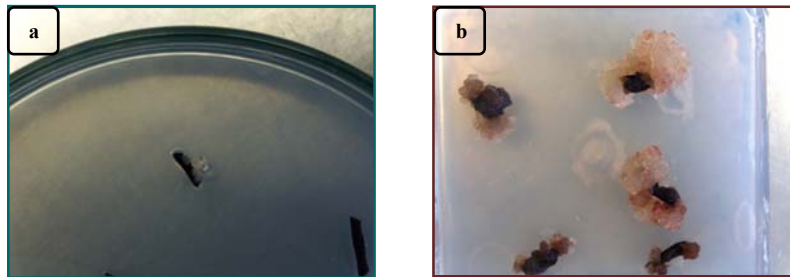
Eksplant	%	PPM Oranları (%)			
		1	2	3	4
Sürgün	Kallus oluşumu	25.2	16.22	25	10.26
	Kontaminasyon	24.54	24.32	7.9	0
Kök	Kallus oluşumu	5.33	6.67	5.56	2.57
	Kontaminasyon	27.3	25.41	22.2	2.51

Antibiyotik-antifungal karışımı uygulamasında; antibiyotik miktarları sabit tutulurken antifungal için ise iki farklı konsantrasyon değeri kullanılmıştır. Penisilin ve Streptomisin içeren MS ortamına, iki farklı konsantrasyonda (500 ve 1000 µl) Amfoterisin B ilave edildiğinde, sürgün eksplantlarının her iki konsantrasyon değerinde de yaklaşık % 25 oranında kontaminasyon ve kallus oluşumu gözlenmiştir. Kök eksplantlarında ise oldukça yüksek oranda kontaminasyon görülürken kallus oluşum oranının da çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.2).

PPM uygulamasında ise; eksplantların yüzey sterilizasyonu için dört farklı konsantrasyonda (% 1, 2, 3, 4) kullanılan PPM, ortamlara (MS) da % 0.5'lik oranda ilave edilmiştir. Kök üzerinde bulunan sürgün eksplantlarının sterilizasyonunda % 1 ve % 3 oranında PPM kullanıldığında en fazla kallus oluşumu gözlenirken, % 4 PPM kullanıldığında kontaminasyon görülmemiştir ancak bu durumda kallus oluşum oranının çok düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 5.3). Kök eksplantlarında ise % 1, 2 ve 3'lük konsantrasyonlarda PPM kullanılması durumunda, kontaminasyon ve kallus oluşum oranlarının birbirine yakın oldukları belirlendiğinden, bundan sonraki çalışmalarda % 1'lik PPM'in sterilizasyonu sağlamak için yeterli olacağı olabileceği değerlendirilmiştir.

5.1.3. Çeşitli Ortamlarda PPM Denemesine Ait Bulgular

%70'lik alkolde 1 dk bekletilen kök ve sürgün eksplantlarının % 1'lik PPM ile 1 saat çalkalanıp, durulanmalarının ardından % 0.5 oranında PPM içeren MS, SH, LS ve B5 ortamlarına ekilmesiyle oluşturulan çalışmada ilk kallus oluşumu B5 ortamında 5. günde kök eksplantında görülmüştür (Şekil 5.1.a). Yine B5 ortamında 21. günde 0,016 g ağırlığında kırmızı renkli kallus oluşumu görülmüştür (Şekil 5.1.b).



Şekil 5.1. B5 ortamında ilk kallus (a) ve renkli kallusun (b) oluşumu

Çizelge 5.4. PPM denemesinde sürgün eksplantlarında görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%)

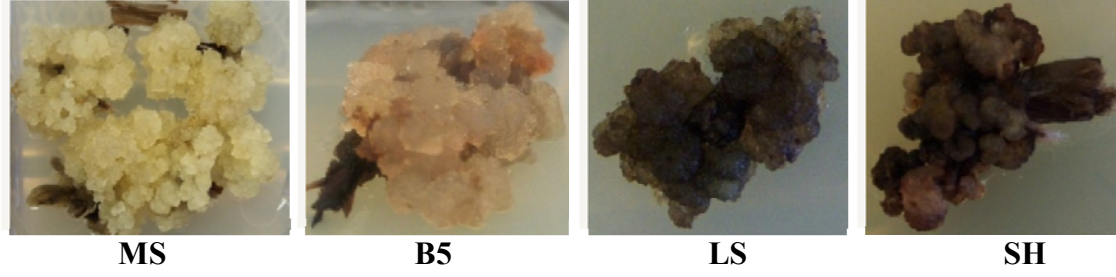
	GÜNLER	ORTAMLAR							
		MS		SH		B5		LS	
		Kallus	Kont.	Kallus	Kont.	Kallus	Kont.	Kallus	Kont.
Kallus Safhası	7. gün	13	0	15	13	18	3	13	2
	14. gün	15	8	15	15	15	20	8	8
	21. gün	3	2	8	32	10	20	3	18
	Toplam	31	10	38	60	43	43	24	26

Çizelge 5.5. PPM denemesinde kök eksplantlarında görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%)

	GÜNLER	ORTAMLAR							
		MS		SH		B5		LS	
		Kallus	Kont.	Kallus	Kont.	Kallus	Kont.	Kallus	Kont.
Kallus Safhası	7. gün	0	0	0	13	9	10	0	2
	14. gün	0	7	15	17	13	10	12	3
	21. gün	3	2	7	28	3	15	3	15
	Toplam	3	9	22	58	25	35	15	20

21 gün sonunda PPM uygulaması sonucunda en iyi kallus oluşum oranı; sürgün eksplantlarında % 43, kök eksplantlarında ise % 25 oranı ile B5 ortamında gözlenmiştir. MS ortamında ise bu oran sürgün için % 31, kök için % 3 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.4-5.5).

Kallus oluşumu sürgün eksplantlarında daha çok 1. ve 2. haftalarda görülürken, kök eksplantlarında ağırlıklı olarak 2. haftada gözlenmiştir. SH ve B5 ortamlarında kallus oluşum oranları kadar kontaminasyon oranlarının (kont.) da yüksek olduğu belirlenmiştir. MS ortamında oluşan kallusların diğer 3 ortama kıyasla daha kaliteli, parçalanabilir ve sürdürülebilir özellikte olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.2).

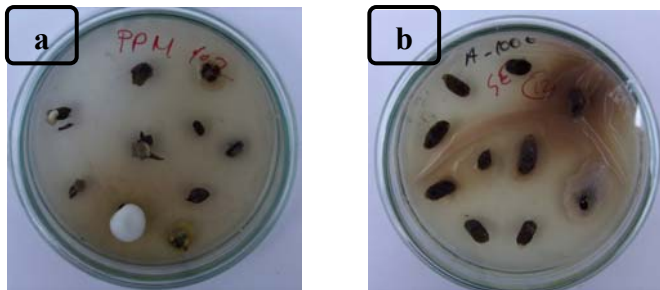


Şekil 5.2. Farklı besin ortamlarında gelişen genç sürgün kallusların görünüşleri

5.1.4. MS Ortamda H₂O₂ ile Birlikte Antibiyotik-Antifungal Karışımı Denemesine Ait Bulgular

Kök ve sürgün eksplantlarının 15'er dk % 20, 30 ve 40'lık H₂O₂ ile muamele edilmelerinin ardından; 250 µl, 500 µl ve 1000 µl lik oranlarda hazır antibiyotik-antifungal karışımı (1 mL'de 10000 unite penisilin, 10 mg streptomisin and 25 µg amfoterisin B) içeren ve bu karışımdan içermeyen MS ortamlarına ekilmelerini kapsayan çalışmada 21 gün sonunda % kallus oluşum ve kontaminasyon oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.6-5.7).

İlk kallus oluşumunun 3. günde B5 ortamına ekilen kök eksplantında görüldüğü çalışmada 7. 14. ve 21. günlerde kallus oluşturan ve kontamine olan eksplantlar sayılmışlardır (Şekil 5.3.b). Kök ve sürgün eksplantlarının her ikisinde de kallus oluşum oranının 7. ve 14. günler arasında en yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm eksplantlarda 7. günden sonra artan kontaminasyon oranının sürgün eksplantlarında 7. ve 14. günler, kök eksplantlarında ise 14. ve 21. günler arasında yoğunlaştığı gözlenmiştir.



Şekil 5.3. PPM (a) ve H₂O₂ ile birlikte antibiyotik-antifungal karışımı (b) kullanılarak yapılan sterilizasyonlarda gözlenen kontaminasyonlar

Çizelge 5.6. H₂O₂ /antibiyotik-antifungal karışımı denemesinde MS ortamına ekilen sürgün eksplantlarında 21 günde görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%) ile kallus kütle büyüme indeksleri (KBİ)

Antibiyotik antifungal oranları	% 20 H ₂ O ₂			% 30 H ₂ O ₂			% 40 H ₂ O ₂		
	Kallus	Kont.	KBİ	Kallus	Kont.	KBİ	Kallus	Kont.	KBİ
0	50	10	2.72	40	30	3.32	80	0	3.68
250 µl	30	50	2.45	100	0	4.19	80	20	2.39
500 µl	40	10	2.22	80	10	3,06	70	0	2.34
1000 µl	90	10	2.28	70	0	3.01	40	10	3.55

Çizelge 5.7. H₂O₂ /antibiyotik-antifungal karışımı denemesinde MS ortamına ekilen kök eksplantlarında 21 günde görülen kallus oluşum ve kontaminasyon oranları (%) ile KBİ değerleri

Antibiyotik antifungal oranları	% 20 H ₂ O ₂			% 30 H ₂ O ₂			% 40 H ₂ O ₂		
	Kallus	Kont.	KBİ	Kallus	Kont.	KBİ	Kallus	Kont.	KBİ
0	0	53	0.98	20	37	1.22	10	30	1.05
250 µl	0	10	0.2	3	53	1.6	7	13	1.02
500 µl	10	38	2.22	10	53	1.42	20	7	0.96
1000 µl	3	83	0.71	7	20	1.1	0	10	0

% 30'luk H₂O₂ konsantrasyonu ile yüzey sterilizasyonu yapılmasının ardından 250 µl antibiyotik- antifungal karışımı içeren MS ortamına ekilen sürgün eksplantlarında % 100'lük kallus oluşumu ve en yüksek kütle büyüme indeksi sağlanmıştır (Çizelge 5.6). Kök eksplantlarında da en yüksek kallus oluşum oranının (% 20), %30'luk H₂O₂ ile sterilizasyon yapılan ve antibiyotik- antifungal karışım içermeyen MS ortamında sağlandığı belirlenmiştir (Çizelge 5.7).



Şekil 5.4. Eksplanttan fide geliştirme aşamaları

Çalışmalar sırasında bitkinin sürgün eksplantlarının bazılarında, kallus oluşumunun yanısıra sürgün gelişimi de gözlenmiştir. MS ortamında oluşan bu yeni aseptik sürgünler köklendirmek amacıyla yüksek oksin içerikli ortama alınmıştır. Fidelerden ikisi 4 mg/L Indol butirik asit (IBA) içeren ortama (1.) alınırken, ikisi 2 mg/L IBA ve 2 mg/L NAA içeren ortama (2.) alınmıştır. Ancak 2. ortamda fidelerin sarardığı ve kallus oluşumunun devam ettiği gözlemlenmiştir. Oluşan fideler, 4mg/L IBA içeren MS ortamına transfer edildi. Ancak bu fideler de geliştirilip toprağa aktarılamamıştır (Şekil 5.4).

5.2. Kallus Kültürlerine Ait Bulgular

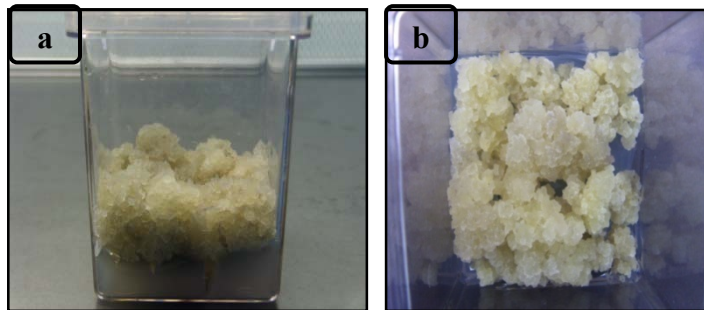
İlk sterilizasyon çalışmalarının ardından tek yıllık gövdeler, yapraklar, sürgün ve kök eksplantlarının doku kültürüne olan cevapları kallus oluşumu açısından incelenmiştir. Burada en iyi cevabı bitkinin sürgün eksplantları verirken yaprak eksplantlarında kallus oluşumuna rastlanmamıştır. Kök eksplantlarında ise sürgün eksplantlarına göre kontaminasyon oranının oldukça yüksek, kallus oluşumunun ise düşük olduğu saptanmıştır.

Çeşitli ortamlarda PPM sterilizasyonunu takiben oluşan kalluslarda kallus oluşum oranları ile kütle büyüme indeksleri incelenmiştir. Burada SH ve B5 ortamlarında kallus oluşum oranları ve kütle büyüme indeksleri yüksek olmasına rağmen, MS ortamında kontaminasyon oranının düşük olmasıyla birlikte burada oluşan kallusların daha kaliteli, parçalanabilir ve sürdürülebilir özellikte olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.2, Şekil 5.5, Çizelge 5.4, 5.5, 5.8).

Çizelge 5.8. PPM denemesinde kullanılan farklı ortamlardaki kallus ve alt kültür kalluslarının kütle büyüme indeksleri

ORTAM	Eksplant Ağırlığı	Kallus Oluşumu	KBİ -1	1. Alt Kültür	KBİ -2	2. Alt Kültür	KBİ -3	3. Alt kültür	KBİ -4
MS kök	0.13 ± 0.07	1.1 ± 0.87	8.46	2.35 ± 0.37	2.14	4.48 ± 0.91	1.91	17.79 ± 3.7	3.97
MS Sürgün	0.26 ± 0.08	1.34 ± 1.0	5.15	1.65 ± 0.64	1.23	7.66 ± 2.18	4.64	23.72 ± 3.2	3.7
B5 Kök	0.02 ± 0.01	0.17 ± 0.2	8.5	0.94 ± 0.97	5.5	1.27 ± 0.98	1.35	1.87 ± 0.45	1.47
B5 Sürgün	0.038 ± 0.05	0.32 ± 0.03	8.42	1.70 ± 0.02	5.31	2.18 ± 0.9	3.11	1.55 ± 0.5	2.28
SH Kök	0.02 ± 0.01	0.063 ± 0.01	3.15	0.45 ± 0.02	7.14	2.66 ± 0.08	5.91	12.35 ± 1.9	4.64
SH Sürgün	0.04 ± 0.01	0.052 ± 0.02	1.3	0.078 ± 0.04	1.5	0.1 ± 0.05	1.28	0.15 ± 0.41	1.5
LS Kök	0.012 ± 0.01	0.032 ± 0.01	2.67	0.33 ± 0.28	10.3	0.29 ± 0.03	0.88	0.62 ± 0.06	2.14
LS Sürgün	0.08 ± 0.05	0.21 ± 0.15	2.63	0.88 ± 0.11	4.2	0.8 ± 0.17	0.91	0.6 ± 0.39	0.75

MS ortamında oluşan kalluslar 40 gün sonra aynı ortamlara alt kültüre alınmıştır. MS ortamında elde edilen beyaz renkli ve parçalanabilir yapıdaki kalluslardan elde edilen hücre hattı devamlılığını sürdürmüştür. Daha sonraki çalışmalarda ise kök eksplantlarından elde edilebilen ve MS ortamında gelişen aynı yapıya sahip olan kalluslar, şikonin ve türevlerini arttırabilmek amaçlı çeşitli denemelerde kullanılmışlardır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. MS ortamında elde edilen parçalanabilir yapıdaki kallusların yandan (a) ve üstten (b) görünüşleri

5.3. Süspansiyon kültürlerine ait bulgular

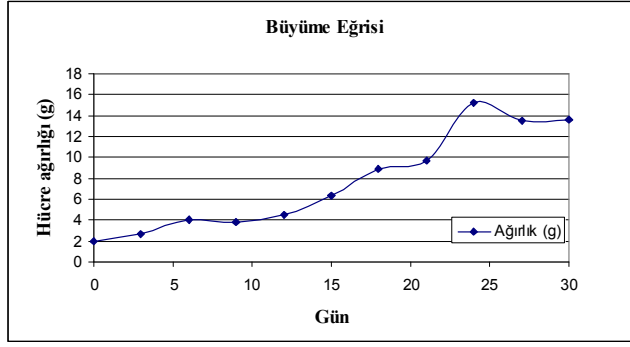
5.3.1. Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme Eğrisinin Oluşturulması

MS ortamında oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 30 gün süre ile ve üçer gün aralıklarla süzülmesiyle sıvı kısımları ve hücreleri ayrılmıştır. Hücrelerin ağırlıklarının ölçülmesiyle büyüme eğrisi oluşturulmuştur (Çizelge 5.9, Şekil 5.6).

Çizelge 5.9. MS ortamında hazırlanan süspansiyon kültüründeki ağırlık artışları

GÜN	Hücre ağırlığı (g)	Sıvı kısım hacmi (mL)
3. gün	2.47 ± 0.21	25.05 ± 1.01
6. gün	4.26 ± 0.08	23.0 ± 1.99
9. gün	4.49 ± 0.01	23.33 ± 0.58
12. gün	4.67 ± 0.37	22.67 ± 1.15
15. gün	6.52 ± 0.62	21.33 ± 0.58
18. gün	9.56 ± 0.02	18.50 ± 0.50
21. gün	10.24 ± 0.52	16.33 ± 1.15
24. gün	15.72 ± 0.25	12.67 ± 0.58
27. gün	13.75±0.71	12.0 ± 1.00
30. gün	13.215±1.82	12.0 ± 2.65

Buradan yola çıkarak süspansiyon kültüründeki hücrelerin 12. ve 24. günler arasında artış gösterdikleri ve 14., 15., 16., 17., 18. ve 19. günlerin, kültürlerin yeni ortamlara transferleri ile uyarıcı ilavelerinin yapılması için en uygun zamanlar oldukları tespit edilmiştir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. *A. densiflora* süspansiyon kültüründe büyüme eğrisi

5.3.2. Süspansiyon Kültürlerinde Elisitör Denemelerine Ait Bulgular

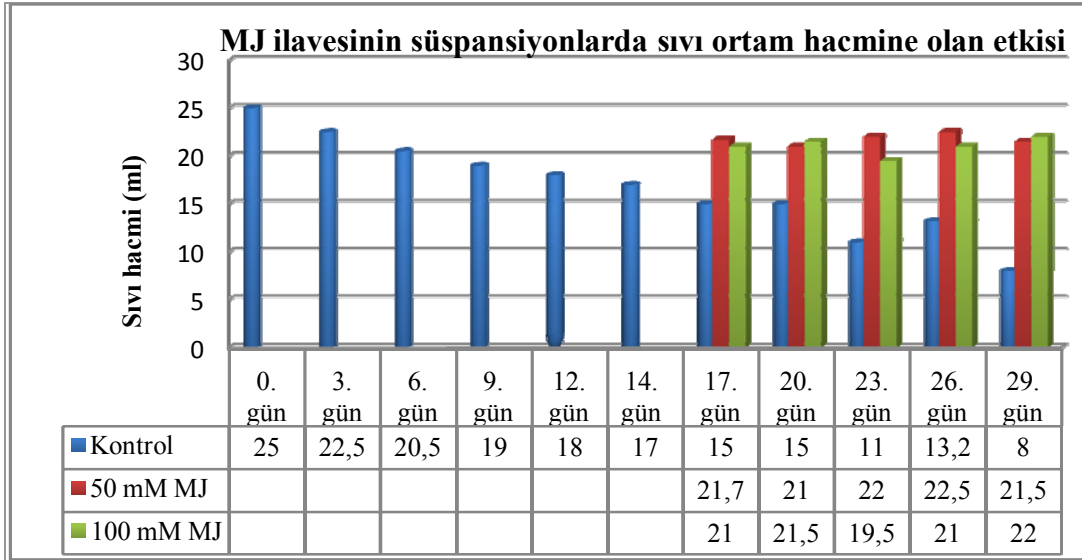
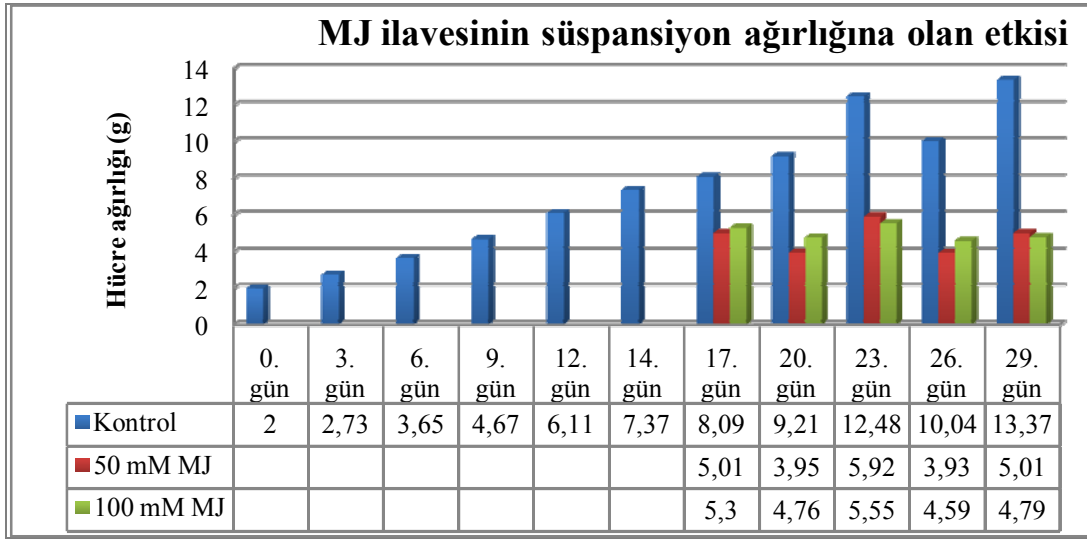
Süspansiyon kültürlerinde çeşitli elisitörlerin hücre büyümesine olan etkileri incelenerek, şikonin ve türevlerinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

5.3.2.1. Metil Jasmonat Uygulanmasına Ait Bulgular

MS ortamında gelişen kallus kültürlerinden alınan 2 g kallusun 25 mL sıvı MS ortamı içeren erlenmayerlere transfer edilmesini takip eden süspansiyon kültürlerine büyüme eğrisi gözönünde tutularak (Şekil 5.6), kültürlerin 14. gününde 50 μ M ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarda MJ eklenmiştir. Kontrol hattı ilk günden 27. güne kadar, MJ ilave edilen süspansiyonlar ise 17. günden 27. güne kadar her 3 günde bir süzölmüş, hücreler tartılmış ve sıvı hacim ölçülmüştür (Şekil 5.7). Kontrol ve MJ ilave edilen süspansiyon kültürlerinin hücre ağırlıkları ve sıvı ortam hacimleri karşılaştırılmıştır (Şekil 5.7, Çizelge 5.10).

Gün	Kontrol	50 μ M MJ
17. Gün	8.09 \pm 0.44	5.01 \pm 0.58
20. Gün	9.21 \pm 0.08	2.59 \pm 1.89
23. Gün	12.48 \pm 0.16	5.92 \pm 0.69
26. Gün	10.04 \pm 0.11	3.93 \pm 0.1
29. Gün	13.37 \pm 0.1	4.79 \pm 0.23

Çizelge 5.10. MJ uygulaması yapılan süspansiyon kültürlerinde ağırlık (g) değişimi

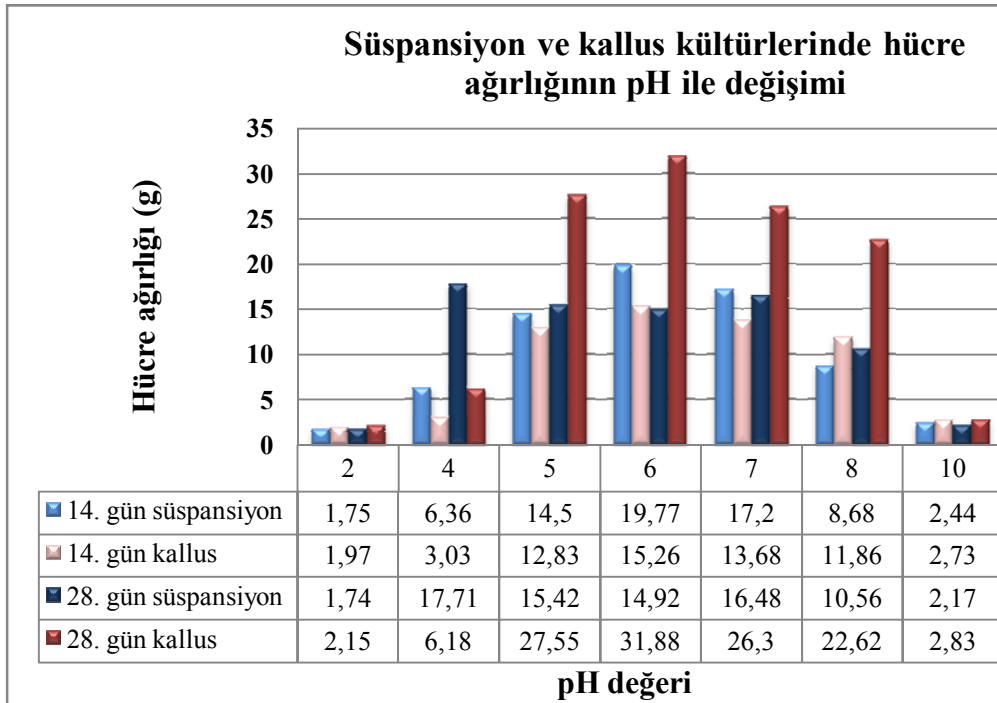


Şekil 5.7. MJ ilave edilmiş süspansiyon kültürlerinde ve kontrollerde hücre ağırlığı (a) ve sıvı ortam hacminin (b) karşılaştırılması

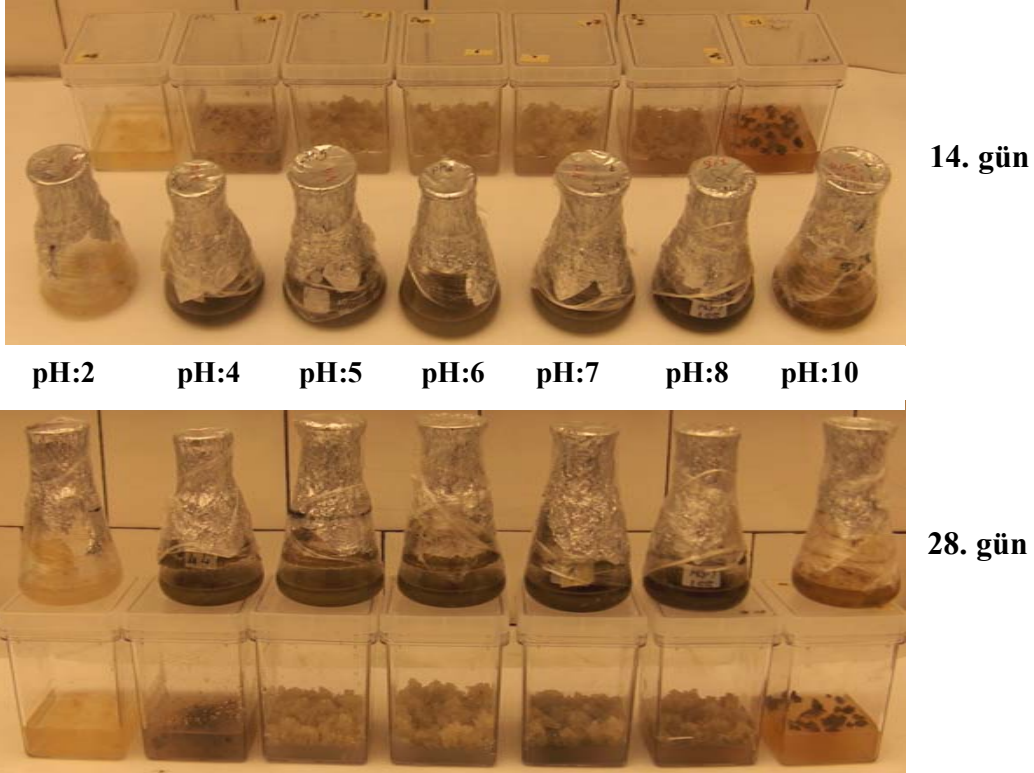
MJ ilave edilen süspansiyon kültürlerinde hücre ağırlığının düştüğü yani MJ'in hücre artışına engel olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.10). Hücre artışı olan süspansiyon kültürlerinde de sıvı hacmin düştüğü, hücre ağırlığı ve sıvı hacmin ters orantılı olarak değiştiği (Şekil 5.7), kırmızı renklenme olmadığı ve hücrelerin karardığı gözlemlenmiştir. Süspansiyon kültürlerinde MJ uygulaması sonucunda şikonin ve türevlerinin üretimi sağlanamamıştır.

5.3.3. Ortam pH'larının Değiştirilmesine Ait Bulgular

pH'nın hücreler üzerinde stres oluşturarak şikonin türevlerinin üretimini uyaracağı düşüncesiyle pH'nın etkilerinin incelendiği çalışmada; iki kallus hattı ve iki de süspansiyon hattı oluşturularak ortamların pH'ları 2, 4, 5, 6, 7, 8 ve 10'a ayarlanmıştır. Magentalara ve 25 mL sıvı ortam içeren süspansiyonlara ikişer g hücre ilave edilerek karanlıkta inkübe edilen kallus ve süspansiyon kültürlerinin yarısı 14. günde, diğer yarısı ise 28. günde hasat edilmiştir (Şekil 5.8). İnkübasyonun sonunda kallus ve süspansiyon kültürlerinde hücre ağırlığındaki artış karşılaştırılmıştır. 14 ve 28 günlük inkübasyonda hem kalluslarda hem de süspansiyon hücrelerinde en fazla pH: 6'da artış tespit edilmiştir. Hücre ağırlıklarındaki en fazla artışın süspansiyonlar için 14 günlük, kalluslar için ise 28 günlük inkübasyonda olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar kallus kültürlerinin süspansiyon kültürlerinden daha yavaş geliştiğini kanıtlarken, pH: 6 ve civarının da hücre gelişmesi için optimum pH olduğunu göstermiştir (Şekil 5.8-5.9). Farklı pH değerlerinde; hücre ağırlıklarındaki değişimlerin yanında farklı renklere hücreler elde edildi ancak kırmızılık gözlenmemiştir (Şekil 5.9).



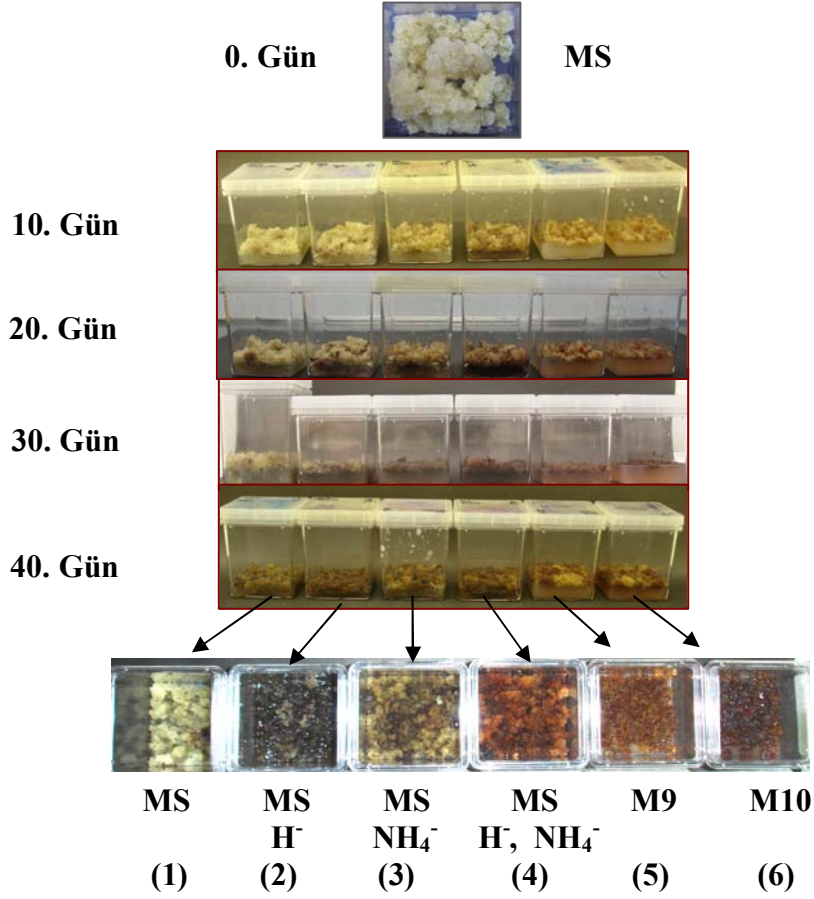
Şekil 5.8. Kallus ve süspansiyon kültürlerinin 14. ve 28. günlerinde değişen pH'nın hücre ağırlık artışına etkisi



Şekil 5.9. 14 ve 28 günlük inkübasyonlarda değişen pH'nın hücre ağırlık artışına olan etkisi

5.3.4. Farklı Besin Ortamlarının Şikonin ve Türevlerinin Üretimine Olan Etkilerine Dair Bulgular

Kallus ve süspansiyon kültürlerinde, şikonin ve türevlerinin üretimini arttırmada rol oynayan etmenler gözönünde bulundurularak hazırlanan farklı ortamlarda ağırlık ve renk değişimi ile birlikte naftokinon üretimi incelenmiştir. 6 farklı ortama [NAA ve KIN hormonları içeren MS ortamı (1), hormon içermeyen MS ortamı (2), NH₄ içermeyen MS ortamı (3), hormon ve NH₄ içermeyen MS ortamı (4), M9 ortamı (5) ve M10 ortamı (6)] konulan eşit miktar ve görünümdeki sürgün kaynaklı kallusların değişimleri, kallus kültürlerinde 40 gün, süspansiyon kültürlerinde ise 21 gün süre ile izlenmiştir (Şekil 5.10-5.11, Çizelge 5.11-5.12).



Şekil 5.10. Altı farklı ortam kullanarak kurulan 40 günlük kallus kültürlerinde hücre gelişimi ve şikonin üretimi

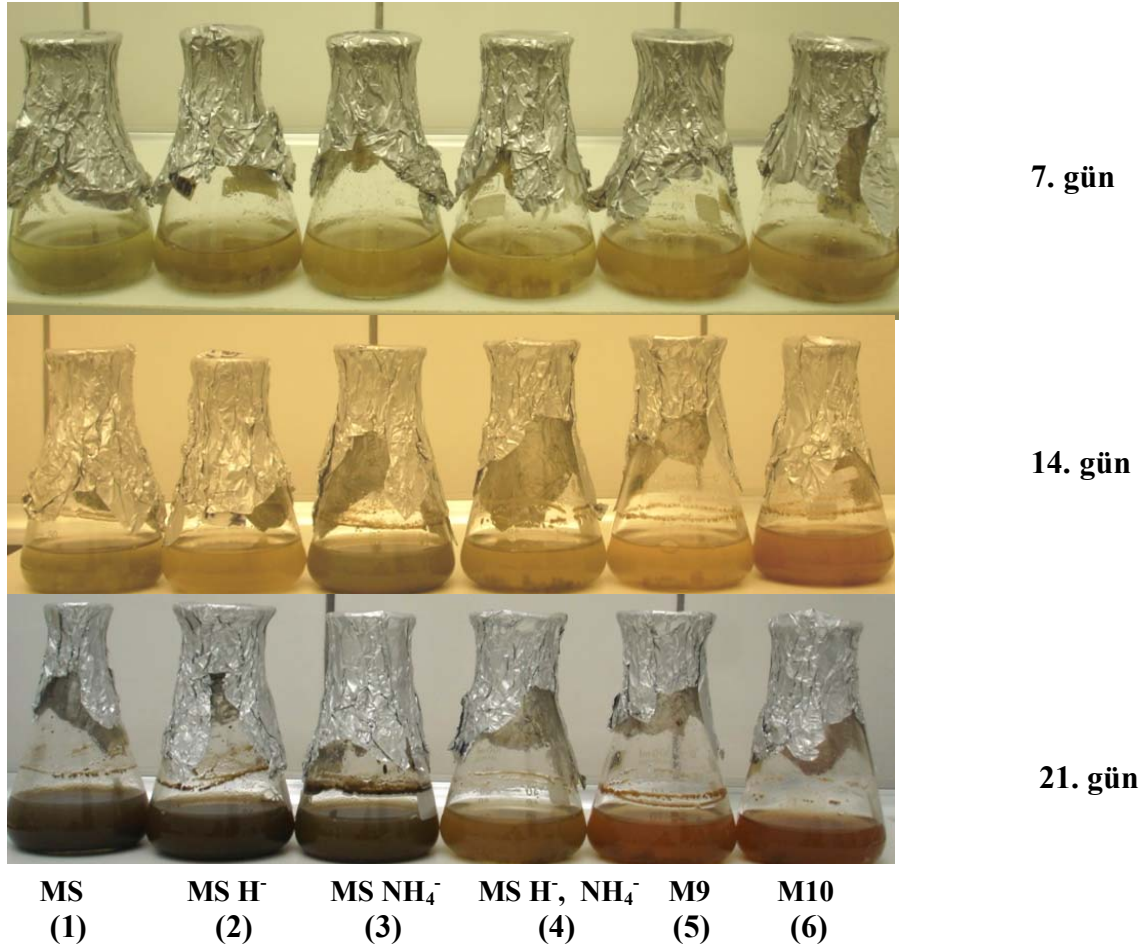
Çizelge 5.11. Altı farklı ortam ile oluşturulan 40 günlük kallus kültürlerinde hücre ağırlık değişimi

ORTAMLAR	10. GÜN		20. GÜN		30. GÜN		40. GÜN	
	YA	KA	YA	KA	YA	KA	YA	KA
MS	10.54	0.48	23.8	0.75	17.8	0.48	18.18	0.41
MS H-	10.93	0.51	29.3	0.88	22.73	0.71	17.83	0.38
MS NH₄⁻	10.45	0.54	19.8	0.55	17.65	0.45	22.78	0.60
MS H⁻ NH₄⁻	13	0.64	27.36	0.84	19.26	0.70	25.26	0.61
M 9	9.09	0.58	16.85	0.85	18.12	0.66	19.23	0.86
M 10	8.95	0.44	12.45	0.59	20.2	0.71	20.74	1.19

YA: Yaş ağırlık, KA: Kuru ağırlık

Kallus kültürlerinde renk değişimine en iyi yanıtı M9 ve M10 ortamlarının verdiği gözlenmiştir (Şekil 5.11). Her on günde bir ayrılan kallus kültürlerinin yaş ve kuru ağırlıkları alınarak renk değişimleri incelenmiştir (Çizelge 5.11). Renk değişimi ilk kez dördüncü günde M10 ortamında kırmızılık oluşmasıyla görülmüştür. Hormon içeren MS ortamı (1.) dışında tüm ortamlarda görülen kırmızı renk oluşumlarının da zamanla koyulaştığı gözlenmiştir. 30. günden itibaren 2. ve 3. ortamlardaki hücrelerde kararma gözlenmiştir.

Süspansiyon kültürleri, kallus kültürlerinden daha hızlı gelişim gösterdiklerinden 21 gün süre ile izlenmiştir. 7., 14. ve 21. günlerde hücre ve ortamlar ayrılarak (Şekil 5.12) ağırlık ve renk değişimleri incelenmiştir. En fazla renk değişimi MS H⁻, NH₄⁻ (4.), M9 (5.) ve M10 (6.) ortamlarında görülürken, hormon içermeyen MS (2.) ve NH₄ içermeyen MS (3.) ortamlarında da 21. günde kararmalar gözlenmiştir (Çizelge 5.12).



Şekil 5.11. Altı farklı ortam kullanarak kurulan 21 günlük süspansiyon kültürlerinde hücre gelişimi ve şikonin üretimi

ORTAMLAR	7. GÜN		14. GÜN		21. GÜN	
	YA/mL	KA	YA/mL	KA	YA/mL	KA
MS	3.04/39	0.12	8.39/39	0.30	8.22/39	0.26
MS H-	4.35/37	0.14	2.25/39	0.12	4.05/38	0.13
MS NH ₄ ⁻	3.27/39	0.13	4.56/39	0.17	5.1/38	0.19
MS H ⁻ NH ₄ ⁻	1.54/40	0.064	1.3/40	0.06	1.55/40	0.07
M 9	1.78/40	0.04	2.01/40	0,07	2.06/39	0.09
M 10	2.42/39	0.11	5.08/39	0.48	6.2/33	0.55

Çizelge 5.12. Altı farklı ortam ile kurulan süspansiyon kültürlerinde ağırlık ve renk değişimi

5.3.4. MS, M9 ve M10 Ortamlarında Gelişen Kalluslara Ait Bulgular

Bu çalışmada; altı farklı ortamın kullanıldığı bir önceki çalışmada en iyi yanıtın alındığı ortamlar olan M9 ve M10 ortamları ile birlikte MS ortamları kullanılmıştır. Kallus ve süspansiyon kültürlerinde; kök eksplantlarından gelişen kallusların ağırlık ve renk değişimi ile şikonin ve türevlerinin üretimi araştırılmıştır.

Kallus kültürü, MS ortamında gelişen kök kallus hatlarından alınan beyaz renkli, parçalanabilir yapıdaki kallusların M9 ve M10 ortamları ile birlikte MS ortamlarına transfer edilmesi ile kurulmuştur. Kültürler 50 gün süre ile izlenmiştir. Bu süre içinde 10. günden itibaren 5 gün ara ile örnekler alınmıştır. İlk renklenme 5. günde M10 ortamında görülürken en iyi renk oluşumu da yine bu ortamda 20. günde gözlenmiştir. 20. günde tüm magentayı kaplayan kırmızı renkli kalluslar 50. günden sonra kararmaya başlamışlardır (Şekil 5.12). Bu hücrelerin yaş ve kuru ağırlıklarının değişimleri Çizelge 5.13’de ve Şekil 5.13’de görülmektedir.

Hücre gelişiminin MS ortamında 40., M9’da 50., M10 ortamında ise 45. günde maksimuma ulaştığı belirlenmiştir (Çizelge 5.13, Şekil 5.13). MS ortamında gelişen kalluslarda su oranının fazla olduğu, M10 ortamında ise bu oranın en düşük olduğu görülmüştür (Şekil 5.13).



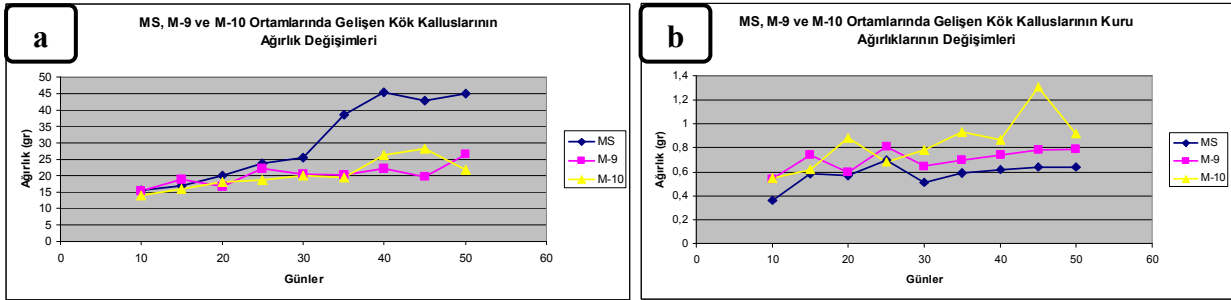
Şekil 5.12. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların görünüşleri



Şekil 5.13. (devam)

Çizelge 5.13. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların ağırlık değişimleri (g)

Günler	MS		M9		M10	
	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık
10. gün	15.61 ± 0.80	0.36 ± 0.06	15.3 ± 0.02	0.54 ± 0.01	14.02 ± 0.12	0.55 ± 0.02
15. gün	16.94 ± 0.69	0.58 ± 0.01	18.89 ± 0.01	0.73 ± 0.01	15.91 ± 0.57	0.62 ± 0.01
20. gün	19.97 ± 1.62	0.57 ± 0.01	16.79 ± 1.15	0.63 ± 0.04	17.95 ± 1.11	0.88 ± 0.04
25. gün	23.75 ± 1.83	0.70 ± 0.01	22.03 ± 0.30	0.84 ± 0.04	18.60 ± 0.35	0.68 ± 0.04
30. gün	25.29 ± 0.20	0.51 ± 0.01	20.45 ± 1.48	0.58 ± 0.09	19.84 ± 2.92	0.78 ± 0.09
35. gün	38.52 ± 0.52	0.59 ± 0.01	20.3 ± 1.09	0.6 ± 0.13	19.34 ± 1.04	0.93 ± 0.01
40. gün	45.37 ± 0.23	0.62 ± 0.01	22.18 ± 1.18	0.71 ± 0.04	26.29 ± 3.63	0.87 ± 0.01
45. gün	42.93 ± 0.03	0.64 ± 0.001	19.66 ± 1.41	0.77 ± 0.01	28.05 ± 0.05	1.31 ± 0.01
50. gün	45.16 ± 0.05	0.64 ± 0.001	26.4 ± 0.01	0.79 ± 0.001	21.85 ± 0.05	0.92 ± 0.01



Şekil 5.14. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallusların yaş ve kuru ağırlıklarının değişimleri

Süspansiyon kültürlerinde MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen hücreler 5 gün ara ile süzülerek 50 gün süre ile izlenmiştir (Çizelge 5.14, Şekil 5.14). M10 ortamında deney 50. güne kadar uzatılmış ve 20. günden sonra ağırlık artışının durduğu belirlenmiştir (Şekil 5.15). Kırmızı renk oluşumu ilk olarak 3. günde M10 ortamında gözlenirken en iyi renk oluşumu da yine bu ortamda 20. günde ve sonrasında gözlenmiştir. 20. günde M9 ortamında da M10 ortamındakine yakın bir kırmızı renk oluşumu görülmüştür (Şekil 5.14).



MS

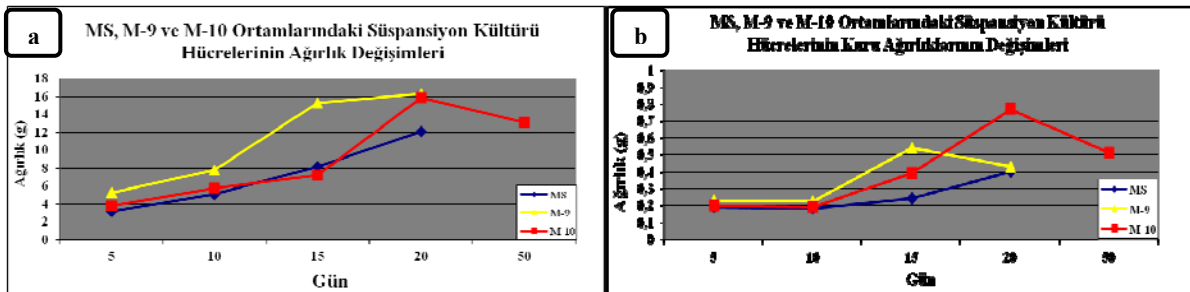
M9

M10

Şekil 5.15. MS, M9 ve M10 ortamlarında oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 20 gün sonundaki görünüşleri

Çizelge 5.14. MS, M9 ve M10 ortamlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin ağırlık değişimleri

GÜNLER	ORTAMLAR					
	MS		M9		M10	
	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık
5. gün	3.19 ± 0.21	0.19 ± 0.01	5.31 ± 0.19	0.24 ± 0.02	3.84 ± 0.28	0.4 ± 0.02
10. gün	5.09 ± 0.09	0.18 ± 0.01	7.84 ± 0.23	0.44 ± 0.03	5.8 ± 0.33	0.43 ± 0.03
15. gün	8.18 ± 0.36	0.24 ± 0.02	15.33 ± 0.37	0.54 ± 0.03	7.23 ± 0.14	0.43 ± 0.02
20. gün	12.07 ± 0.43	0.4 ± 0.03	16.34 ± 0.51	0.39 ± 0.04	15.91 ± 0.52	0.77 ± 0.04
50. gün					13.14 ± 0.09	0.51 ± 0.01



Şekil 5.16. MS, M9 ve M10 ortamlarında 20 günlük süspansiyon kültürlerinde gelişen hücrelerin yaş (a) ve kuru ağırlıklarının (b) değişimi

5.4. Biyoreaktör Çalışmalarına Ait Bulgular

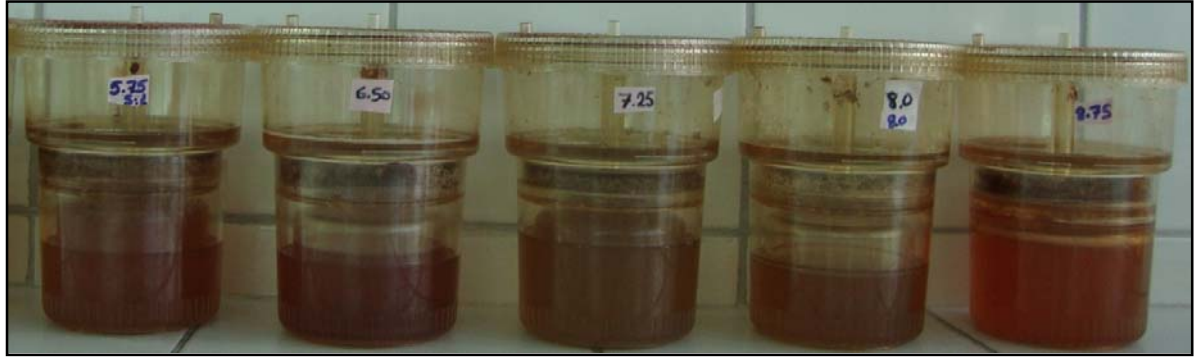
Biyoreaktörler üzerinde yapılan ilk deneme çalışmasında, M9 ve M10 ortamları kullanıldı. Burada sürekli ve kesikli reaktörlerde çalışma (çalkalama) ve bekleme zamanları arasındaki ilişkinin şikonin ve türevlerinin üretimine olan etkileri, sistemlerdeki renklenme üzerinden nitel olarak değerlendirilmiş ve en iyi sonucu sürekli olan M10 ortamları verdiği gözlenmiştir. Ancak bu reaktörlerde de 5. günde kararmalar görülmüş ve ortama askorbik asit eklenmesine karar verilmiştir. Bundan sonraki denemelerde M9 ortamı kullanılmamıştır.

Sürekli çalışan sistemlerin kullanıldığı 2. denemede, çalışılan tüm ortamlara askorbik asit eklenmiştir. Sakaroz miktarlarının değişiminin ve oksin ilavesinin renklenme üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 6. günde sadece 50 g sakaroz içeren ortamlarda (1. ve 4.) hafif pembeleşme görülmüştür. İki sistem arasında ise IAA içeren 4 numaralı ortamda daha iyi renklenme görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak sakaroz oranının arttırılması gerektiği ve oksin ilavesinin renklenmede indükleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Birçok faktörün etkisinin birarada incelendiği 3. denemede; 0.5 mg/L KIN içeren M10 ortamı kullanılarak çalışma hızı, askorbik asit miktarı, sakaroz miktarında değişiklikler yapılarak reaktörlerdeki değişimler izlenmiştir. Sistemlerden 6 tanesinde 3. gün pembe renk oluşumu gözlenmiştir. Bu renk oluşumunda en iyi 7 numaralı ortamın olduğu (50 g sakaroz, sürekli, 0.5 mg/L IAA ve 0.1 mg/L Askorbik asit), bunu sırasıyla 8, 9 ve 6 numaralı ortamların takip ettikleri gözlenmiştir. Bunların ardından gelen 10 ve 3 numaralı ortamlarda aynı düzeyde renk oluşumu görülürken, diğer ortamlarda renklenme görülmemiştir. Bu denemeden, ortamda bulunan askorbik asit miktarının 0.1 mg/L'den fazla olmaması gerektiği, IAA'nın eklenmesinin olumlu yönde etkisinin olduğu ve sakarozun 50 g kullanımı ile daha iyi sonuç alındığı tespit edilmiştir. Bu çıkarımlardan yola çıkılarak yeni bir deneme kurulmuştur.

M10 ortamında çalışma hızı, askorbik asit miktarı (0.05-0.1 mg/L) ve sakaroz miktarında değişikliklerin (50-60 g) yapıldığı 4. denemede oluşturulan 6 farklı sistemde 20 gün süre ile değişimler izlenmiştir. En iyi renklenme 0.1 mg/L askorbik asit ile 60 g/L sakaroz içeren 3 numaralı reaktörde görülürken bunu sırasıyla 5, 4, 6, 2 ve 1 numaralı reaktörlerin takip ettikleri tespit edilmiştir. Ancak yine bu ortamda da hedeflenen, süspansiyonlardaki gibi kırmızı renk oluşumu sağlanamamıştır.

pH denemesinin yapıldığı 5. denemede; oksin oranı 0.5 mg/L'den 1 mg/L'ye, kallus oranı da 5 g'dan 20 g'a çıkarılmıştır. pH'ı 5.75 ve 8.75 olan reaktörlerde 12. saatte kızarma gözlenmiştir. Bu reaktörlerde 3. günde daha yoğun renk oluşumu gözlenirken, pH değerinin 6.50 olduğu reaktörde de renklenme görülmüştür. 17. gün sonunda reaktörlerin görünüşleri ve renk oluşum düzeylerine bakılarak pH'larına göre sıralandığında en iyi pH:8.75'in olduğu bunu pH:5.75'in takip ettiği gözlenmiştir. Ardından sırası ile pH:6.50, 8.0 ve 7.25'in geldiği görülmüştür (Şekil 5.16). Reaktörlerde oluşan hücreler buchner hunisi ve kumaş aracılığı ile süzülerek ağırlıkları alınmıştır. Reaktörlerdeki ağırlık artışları ile renk değişimlerinin paralellik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.15- Şekil 5.16).



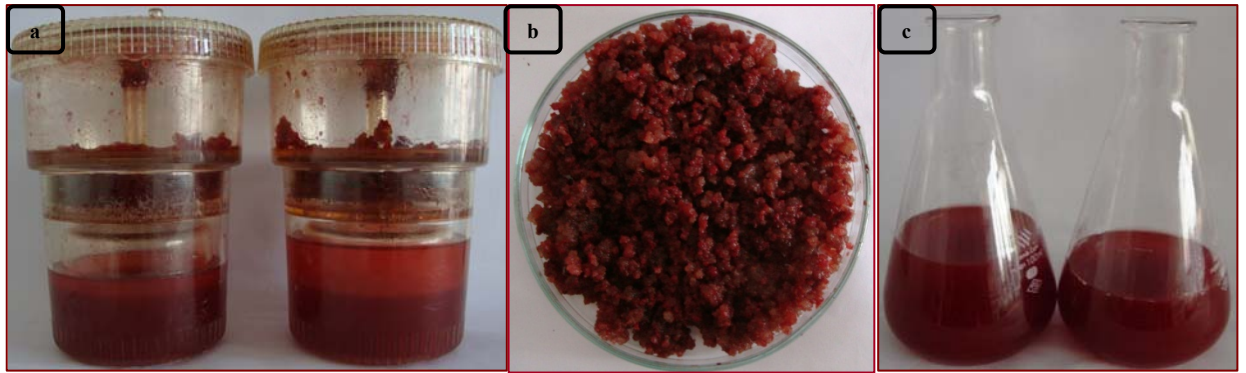
Şekil 5.17. Aynı ortam içeriğine sahip ve farklı pH değerlerindeki biyoreaktörlerin görünüşleri

Çizelge 5.15. Aynı ortam içeriğine sahip ve farklı pH değerlerindeki reaktörlerin 17 gün sonunda ağırlık değişimleri

pH	Ağırlık (g)
5.75	25.31± 4.62
6.50	22.45± 1.63
7.25	15.22± 4.57
8.0	19.59± 0.06
8.75	25.39± 3.78

6. denemede kurulan sistemlerde; 5. denemedeki içeriğe sahip olan ortamların pH'ları 8.75'e ayarlanıp ortama inoküle edilen kallus oranları artırılarak 40 g'a çıkarılmıştır. Bu denemede 5. denemeden daha iyi sonuç alındı ve kallus oranının 40 g'dan daha az kullanılmaması gerektiği görüşüne varılmıştır.

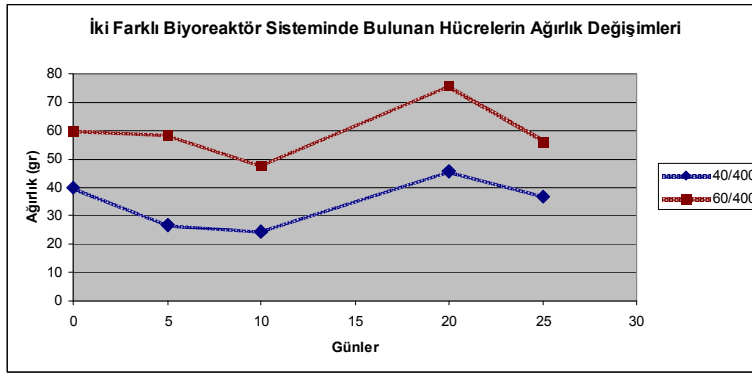
Reaktörlere 40, 50, 60 ve 80 g kallus konularak kurulan 7. deneme sonucunda en iyi renk oluşumunun 60 g (% 15) ve 40 g (% 10) kallus içeren reaktörlerde olduğu görülmüştür. 60 g kallus inoküle edilen reaktörlerde 20. gün sonunda tam olarak hedeflenen bordo-kırmızı renklenme elde edilmiştir (Şekil 5.17). Bu hücreler süzülendiğinde 78.19±0.29 g ağırlığında hücreler elde edilmiştir. Bu deneme tekrarlanmış ve yaklaşık sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 5.16, Şekil 5.17). 26. günden sonra ise reaktörlerde koyu kahverengi renk oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 5.18. % 15 oranında kallus içeren reaktörlerde 20. gün sonunda (a), süzülerek ayrılan hücreler (b) ve ortamlar (c) daki renklenmenin görünümü

Çizelge 5.16. % 10 ve 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerinde ağırlık ve hacim değişimleri

Günler	% 10	% 15
0. gün	40 g/400 mL	60 g/400 mL
5. gün	26.70 g/ 285 mL	58.51 g/254 mL
10. gün	24.40 g/ 230 mL	47.65 g/195 mL
20. gün	45.77 g/174 mL	75.78 g/ 138 mL
25. gün	36.68 g/ 133 mL	56.03 g/ 124 mL



Şekil 5.19. % 10 ve 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerin ağırlık değişimleri

% 10 ve 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerinin, gerek hücre ağırlıklarının ve ortam hacimlerinin değişimlerinin, gerekse hücre ve ortamlardaki renk değişiklikleri bakımından paralellik gösterdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 5.16, Şekil 5.18)

5.5. Kallus, Süspansiyon Kültürü ve Biyoreaktörlerde Üretilen Sekonder Metabolitlerin Araştırılması

Doku kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen numunelerde üretilen serbest şikonin ve türevlerini teşhis etmek, hidroliz işlemi sonucu şikonin oluşumunu gözlemleyebilmek amacıyla öncelikle İTK analizi yapılmıştır. İTK'ni takiben spektrofotometrik olarak miktar tayini, ardından daha net sonuç alabilmek ve şikonin türevlerinin profillerini belirleyebilmek amacı ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizi (HPLC) yapılmıştır.

5.5.1. Kalitatif Analiz (İTK)

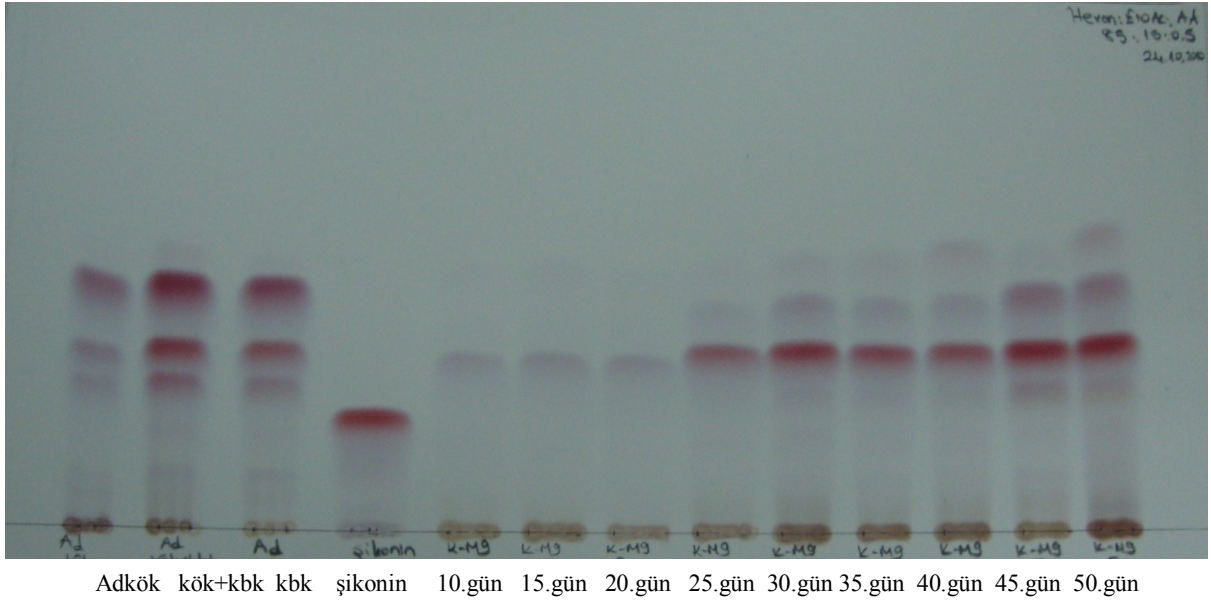
5.5.1.1. Kallus kültürlerinde İTK Analizi

Kök eksplantları kullanılarak M9 ve M10 ortamlarında oluşturulan kalluslardan 10. ve 50. günler arasında 5 gün ara ile ayrılan ve ardından kurutularak ekstre edilen hücrelerin İTK analizleri yapılmıştır. S1 ve S2 solvan sistemlerinin kullanıldığı analizlere ait

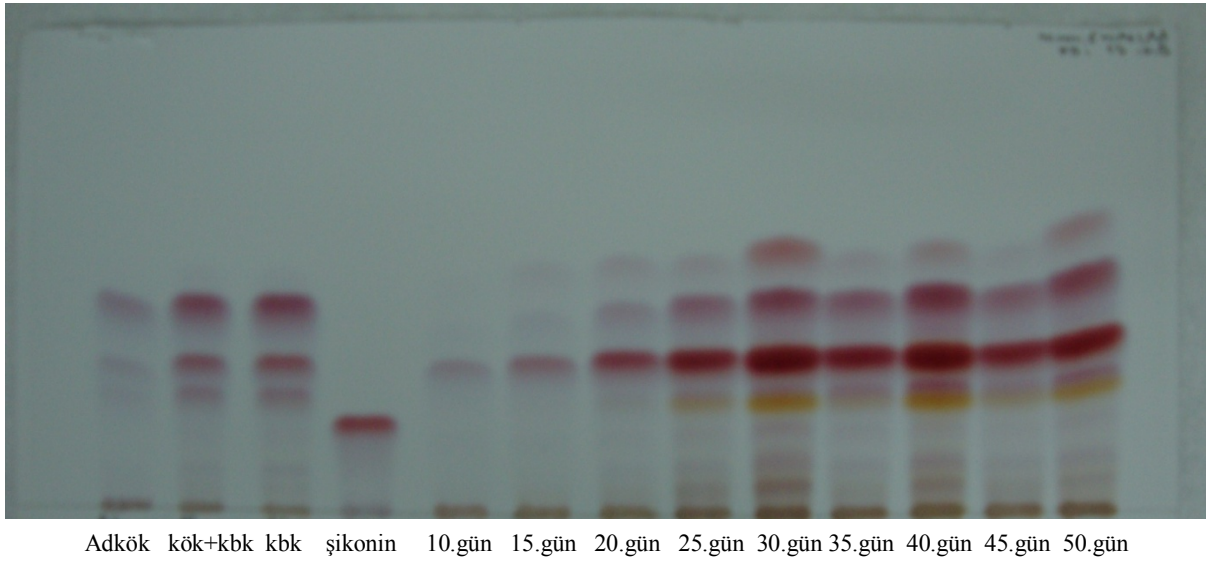
kromatogramlarda şikonin ve türevleri gün ışığında net şekilde görüntülenmiştir (Şekil 5.19-5.20). 10. günden itibaren asetilalkannin tek leke halinde belirlenirken, 15. günden itibaren artan leke sayısının 30.-50. günler arasında yoğunluk kazandığı tespit edilmiştir. Ayrıca referans olarak kullanılan *A. densiflora* kök ekstraktlarıyla karşılaştırıldığında lekelerin daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Bu kromatogramlara bakılarak *in vitro* kültürlerde bitkiden farklı yeni şikonin türevlerinin oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 5.19, 5.20).

Çizelge 5.17. Şikonin, alkannin ve asetilalkanninin S1 solvan sisteminde belirlenen R_f değerleri ve günışığı ile UV_{366} da verdikleri renkler

NAFTAKİNONLAR	R_f değerleri	Gün ışığı	UV_{366}
Şikonin-Alkannin	0.21	Koyu pembe, kırmızı-bordo renk	Koyu kırmızı
Asetilalkannin	0.36	Koyu pembe, kırmızı-bordo renk	Koyu kırmızı



Şekil 5.20. M9 ortamının kallus kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı



Şekil 5.21. M10 ortamının kallus kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

5.5.1.2. Süspansiyon Kültürlerinde İTK Analizi

Süspansiyon kültürlerinde öncelikle sürgün, ilerleyen zamanlarda ise kök eksplantları kullanılarak elisitör uygulamaları ve farklı ortamlar üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elisitör olarak *R. stolonifer* ve *A. niger* fungusları ile MJ kullanılmıştır. MJ uygulaması sonucunda hiçbir renk değişimi gözlenmediğinden İTK analizi yapılmamıştır.

5.5.1.2.1. Fungal Uyarıcı Uygulamasına Ait İTK Analizi

R. stolonifer ve *A. niger*'in kullanıldığı ve 15 günlük uygulama sonucunda süspansiyon kültürlerinde elde edilen hücre ve sıvı ekstralarının S2 solvan sistemi aracılığıyla İTK analizleri yapılmıştır. 6. günden itibaren kontrollerde ve uyarıcı ilave edilmiş kültürlerde gittikçe koyulaşan kırmızı lekeler görülmüştür. 12. ve 15. günlerde lekeler daha da belirginleşmiştir (Şekil 5.21).



Ad 12RK 12RS 15RK 15RS 12AK 12AS 15AK 15AS 12KK 12KS 15KK 15KS

Şekil 5.22. *A. niger* ve *R. stolonifer* eklenen ve kontrol süspansiyonlarının 12. ve 15. günlerdeki ekstralarına ait S2'deki ince tabaka kromatogramı

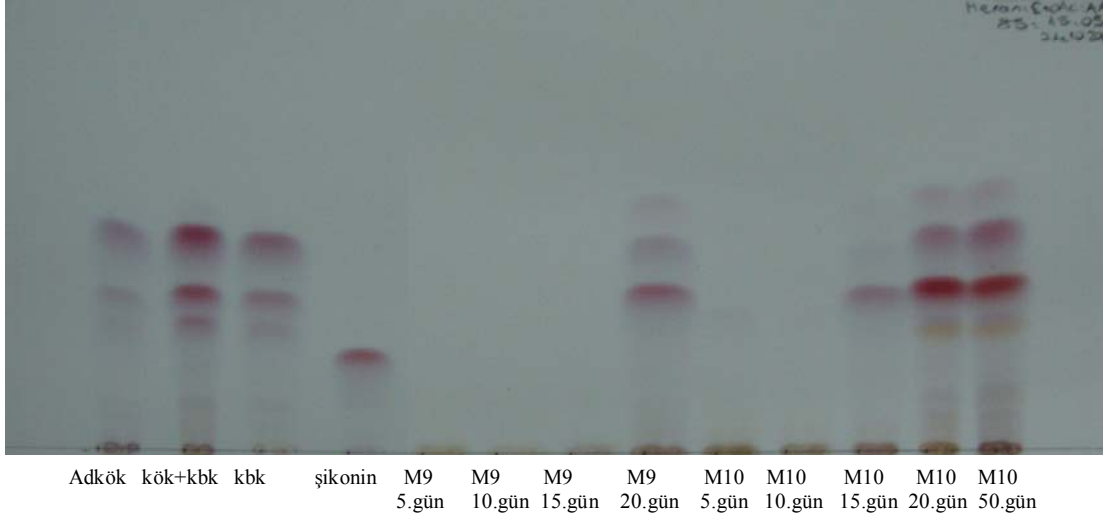
Ad : *A. densiflora* kloroformlu ekstre
RK: *R. stolonifer* eklenen süspansiyonun hücre kısmı
RS : *R. stolonifer* eklenen süspansiyonun sıvı kısmı
AK: *A. niger* eklenen süspansiyonun hücre kısmı
AS : *A. niger* eklenen süspansiyonun sıvı kısmı
KK: Kontrol(fungussuz) süspansiyonun hücre kısmı
KS : Kontrol süspansiyonun sıvı kısmı

5.5.1.2.2. Farklı Ortam Uygulamasına Ait İTK Analizi

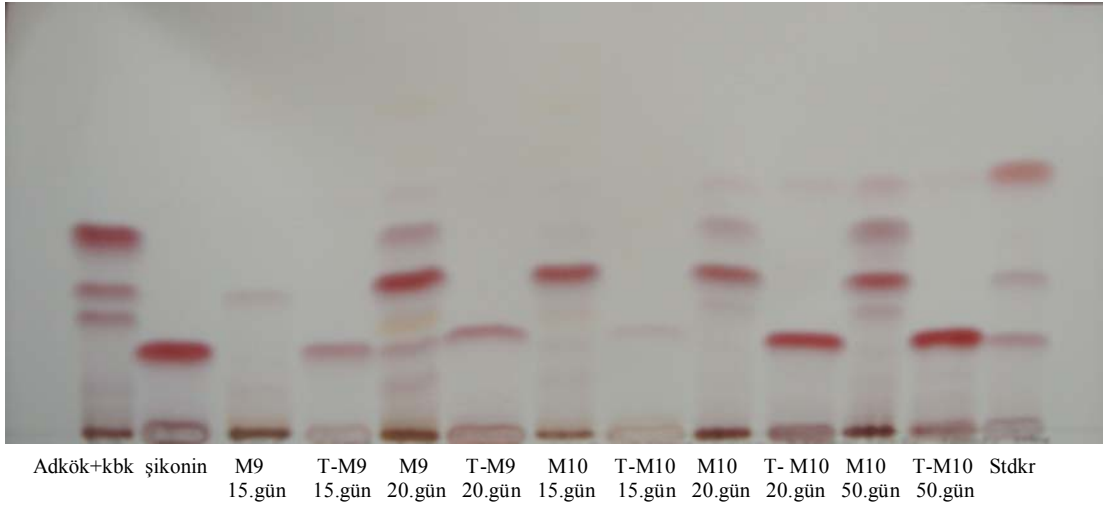
Sürgün eksplantlarının kaynak olarak kullanıldığı ve 6 farklı ortam üzerinde hücre ağırlığı ile renk değişimlerinin 21 gün süre ile incelendiği çalışmadan ayrılan hücreler ekstraksiyona tabi tutularak İTK analizleri gerçekleştirilmiştir. Burada en fazla renklenmenin olduğu MS H⁻, NH₄⁻, M9 ve M10 kodlu ortamlarda geliştirilen ve 7., 14. ve 21. günlerde ayrılan hücreler kullanılmıştır. Mobil faz olarak Toluen:Asetik asit (99:1) (S4) kullanılmıştır. Kromatogramların 254 ve 366 nm'deki görünümünde de, renkli hücrelerden elde edilen ekstraktlarda bitkideki fitokimyasallara benzer lekeler rastlanmıştır.

5.5.1.2.3. M9 ve M10 Ortamlarında Kurulan Süspansiyon Kültürlerinin İTK Analizi

MS ortamında kök eksplantlarından elde edilen hücre hatlarından M9 ve M10 ortamlarına transferi ile kurulan süspansiyon kültürleri 20 gün boyunca izlenerek 5 gün ara ile hücreler ayrılmıştır (M10 ortamında deney 50. güne kadar uzatılmıştır). Bu hücreler kurutularak ekstraksiyonu gerçekleştirilen ve ardından hidrolize edilen hücrelerin İTK analizleri yapılmıştır. S1 solvan sistemlerinin kullanıldığı analizlere ait kromatogramlarda şikonin ve türevleri gün ışığında net şekilde görüntülenmiştir (Şekil 5.22,5.23). Bitkide şikonin ve türevlerinin asıl üretiminin gerçekleştiği organlar olan köklerin kullanıldığı eksplantlarla yapılan aynı deneyin sonucunda elde edilen lekelerin, sürgün eksplantlarına göre çok daha belirgin oldukları görülmüştür..



Şekil 5.23. M9 ve M10 ortamlarının süspansiyon kültürlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

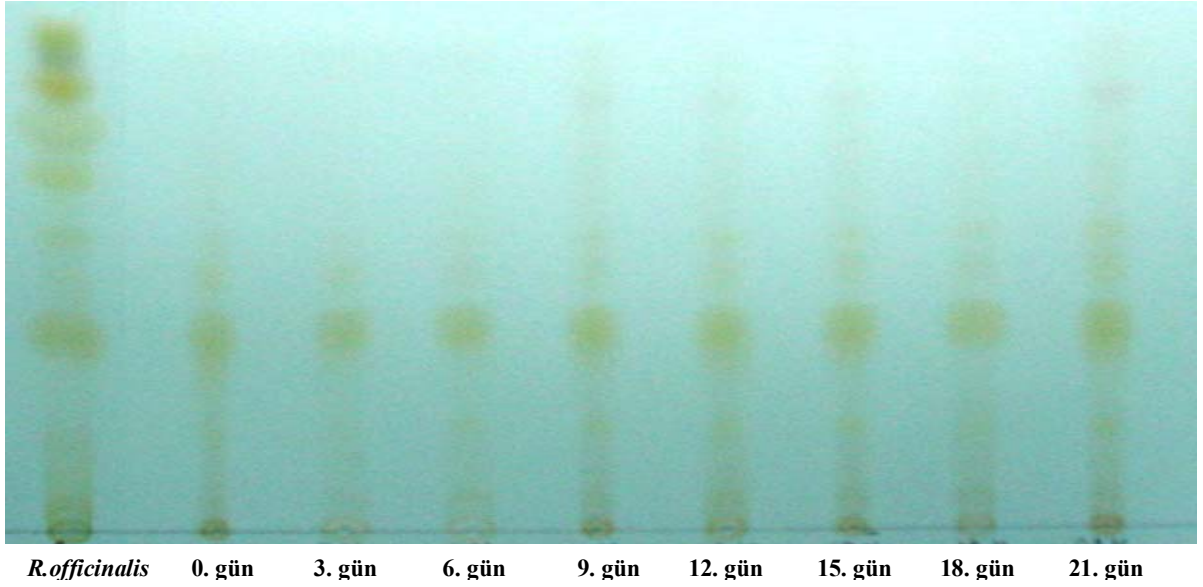


Şekil 5.24. M9 ve M10 ortamlarının süspansiyon kültürlerinde şikonin ve türevleri ile hidrolizatın S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

T- : Kallus kültürlerinin kloroformla ekstraksiyonunu takiben hidroliz edildiğini göstermektedir
(stdkr: şikonin, asetilalkannin ve β -dimetilakrilalkannin)

5.5.1.2.4. Rozmarinik Asitin İTK Analizi

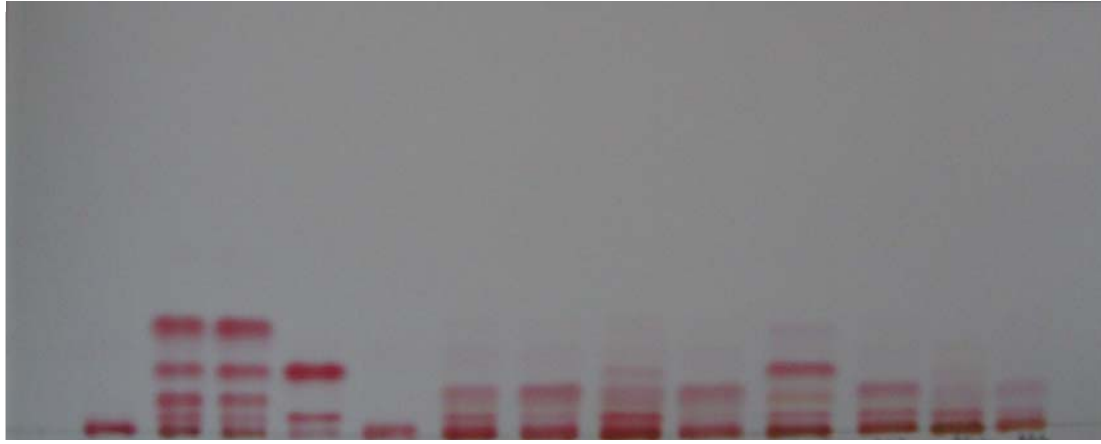
MS ortamı kullanılarak oluşturulan süspansiyon kültürlerinde rozmarinik asit varlığı araştırıldı. 21 günlük uygulama sürecinde kültürlerin hücreler 3'er gün ara ile ayrıldı. Metanollü ekstrelerin S4 solvan sistemi aracılığıyla İTK analizleri yapıldı. Standart olarak kullanılan *R. officinalis* bitki ekstresinde ve elde edilen numunelerde ilk günden itibaren rozmarinik asit varlığı belirlendi (Şekil 5.24).



Şekil 5.25. *A. densiflora* süspansiyon kültürlerine ait hücre ekstralarının S4 sisteminde rozmarinik asit yönünden analizi

5.5.1.3. Biyoreaktörlerde Gelişen Hücre ve Ortamların İTK Analizi

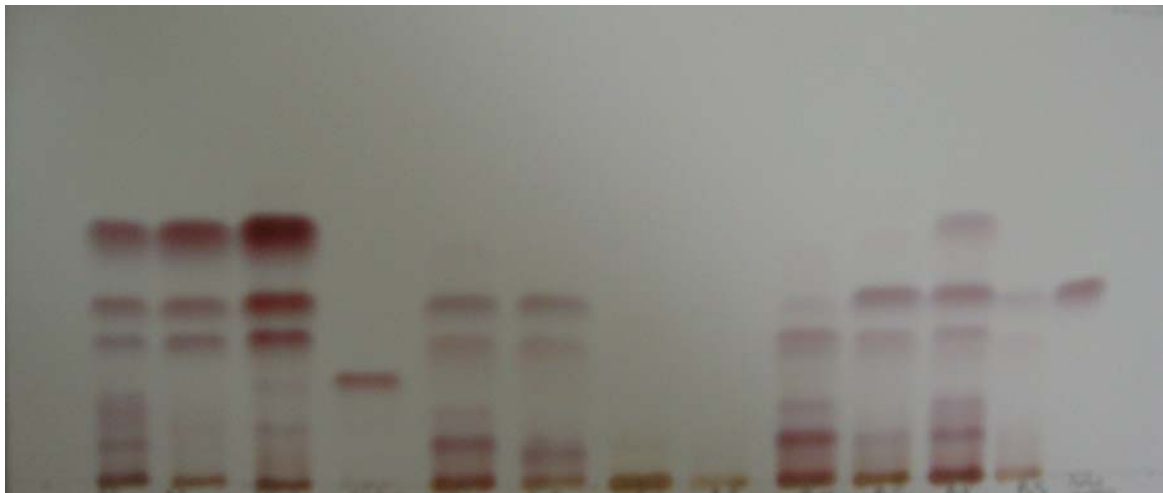
Biyoreaktör denemelerinin İTK analizinde, en iyi içeriğe sahip ortamlara (40 ve 60 g sakaroz, 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L IAA, 0.1 mg/L askorbik asit içeren, pH:8.75 olan 400 mL hacimli M10 ortamı) % 10 ve 15 oranlarında kallus inoküle edilerek, 20 ve 25. günlerde hasat edilen hücreler kullanıldı. Şikonin ve türevleri hücre dışına salınarak sıvı ortama geçtiğinden hücrelerin yanında ortamlarda da yoğun renklenme görüldü ve bu nedenle sıvı kısımlar da analize tabi tutuldu (Şekil 5.25, 5.26). Hidrolize edilen ekstrelerde elde edilen şikonin kromatogramlarda tek leke olarak gözlemlendi (Şekil 5.27).



Adkök kök+kbk kabuk asetilalk. şikonin **BK-3 BS-3 BK-4 BS-4 BK-1 BS-1 BK-2 BS-2**
60 g -20.gün 60 g -25.gün 40 g -20.gün 40 g -25.gün

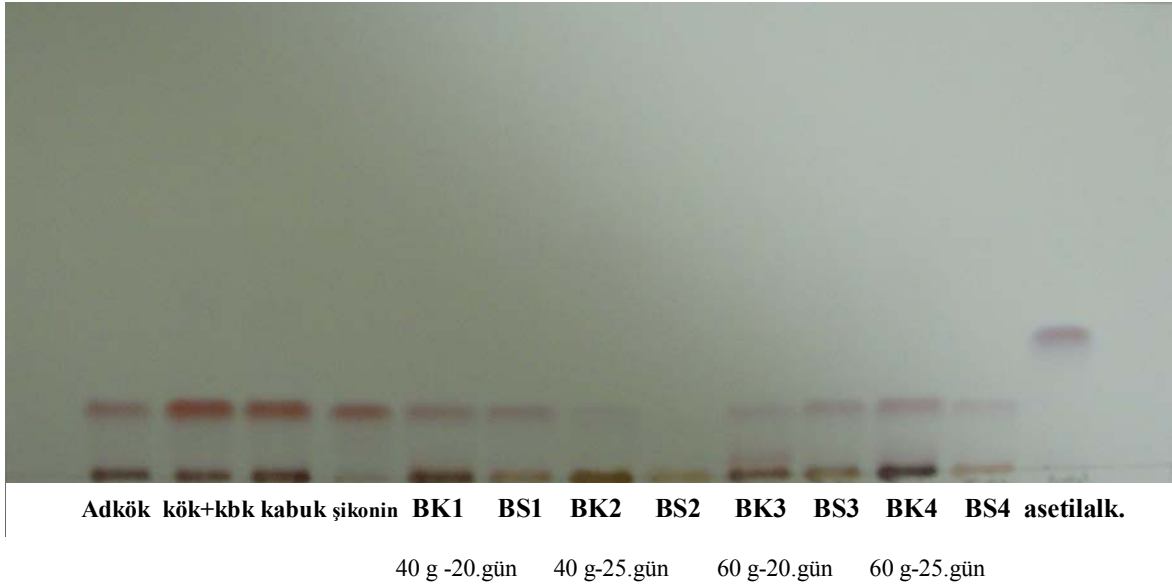
Şekil 5.26. M10 ortamında B1-B4 reaktörlerinde gelişen hücrelerde bulunan ve ortamlara geçen şikonin ve türevlerinin S2 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

- BK-1:** 40 gr kallus ekilen 20 günlük hücrelerin ekstresi
- BK-2:** 40 gr kallus ekilen 25 günlük hücrelerin ekstresi
- BK-3:** 60 gr kallus ekilen 20 günlük hücrelerin ekstresi
- BK-4:** 60 gr kallus ekilen 25 günlük hücrelerin ekstresi
- BS-1:** 40 gr kallus ekilen 20 günlük M10 ortamının ekstresi
- BS-2:** 40 gr kallus ekilen 25 günlük M10 ortamının ekstresi
- BS-3:** 60 gr kallus ekilen 20 günlük M10 ortamının ekstresi
- BS-4:** 60 gr kallus ekilen 25 günlük M10 ortamının ekstresi



Adkök kök+kbk kbk şikonin **BK-1 BS-1 BK-2 BS-2 BK-3 BS-3 BK-4 BS-4 asetilalk.**
40 g -20.gün 40 g -25.gün 60 g -20.gün 60 g -25.gün

Şekil 5.27. M10 ortamında B1-B4 reaktörlerinde gelişen hücrelerde bulunan ve ortamlara geçen şikonin ve türevlerinin S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

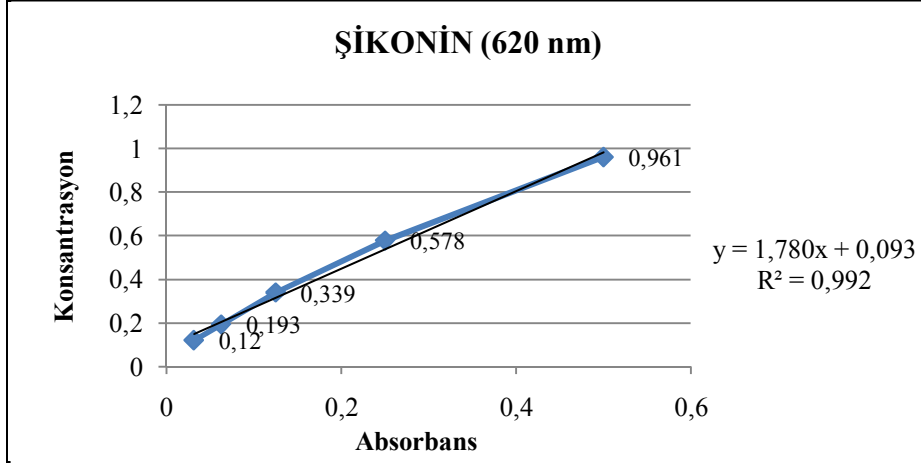


Şekil 5.28. B1-B4 biyoreaktörlerinde gelişen hücrelerde ve ortamlarda bulunan şikonin türevlerinin hidroliz edildikten sonra S1 solvan sisteminde görülen ince tabaka kromatogramı

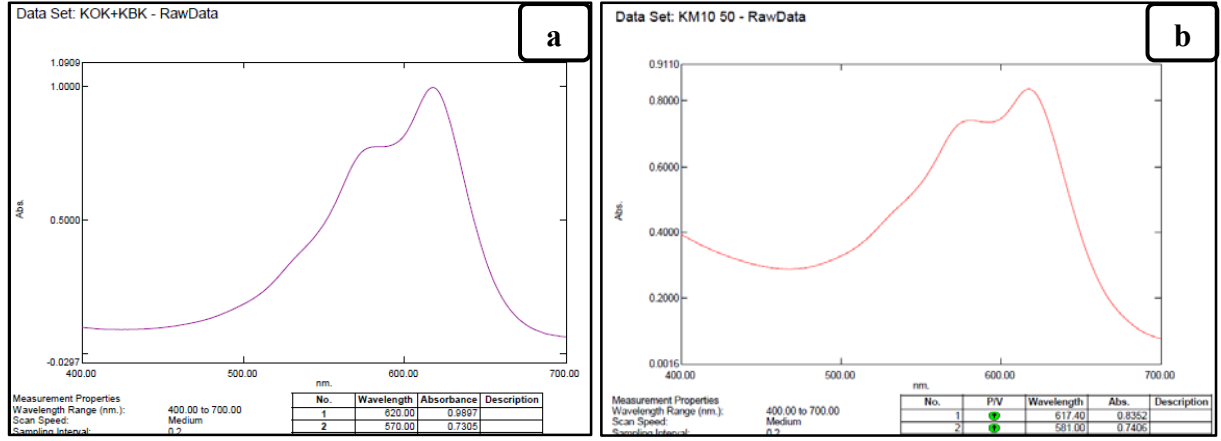
5.5.2. Kantitatif Analiz

5.5.2.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

Şikoninin kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla kloroformla 5 farklı konsantrasyonda (0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.0312 mg/mL) standart çözeltileri hazırlanmıştır. Kloroformu uçurulan ekstre üzerine KOH ilave edilmesinin ardından spektrofotometrede 620 nmde alınan ölçümler sonucunda kalibrasyon eğrisi oluşturularak $y= 1.780x+0.093$ şeklinde doğru denklemi elde edilmiştir (Şekil 5.29). 400-700 nm'de taranan numunelerin içeriğindeki şikonin miktarları bu denklem üzerinden hesaplamalar yapılarak belirlenmiştir (Şekil 5.29, Çizelge 5.18-5.20).



Şekil 5.29. Şikoninin kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.30. Bitkinin kabuk+kök kısmından elde edilen ekstrenin (a) ve M10 ortamında gelişen 50. gün kallus kültürü hücre ekstralarının (KM10 50) (b) UV spektrumları

Çizelge 5.18. Kallus kültürlerinde biyokütle değişim oranları ve üretilen şikonin türevleri ile bitki ekstralarında spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen % ve mg/g miktarları

Numune	Biyokütle değişimi KBİ	Pigment üretimi	
		%	mg/g
K-M9 10	1.53	0.323 ± 0.021	3.232 ± 0.21
K-M9 15	1.889	1.198 ± 0.182	11.981 ± 0.18
K-M9 20	1.679	0.420 ± 0.102	4.201 ± 0.102
K-M9 25	2.203	1.349 ± 0.083	13.494 ± 0.83
K-M9 30	2.045	1.161 ± 0.101	11.605 ± 1.01
K-M9 35	2.03	1.073 ± 0.016	10.735 ± 0.16
K-M9 40	2.218	1.081 ± 0.094	10.810 ± 0.94
K-M9 45	1.966	1.921 ± 0.035	19.210 ± 0.35
K-M9 50	2.64	1.773 ± 0.034	17.732 ± 0.34
K-M10 10	1.402	0.215 ± 0.099	2.147 ± 0.99
K-M10 15	1.591	0.562 ± 0.127	5.616 ± 1.27
K-M10 20	1.795	1.746 ± 0.022	17.462 ± 0.22
K-M10 25	1.86	1.782 ± 0.033	17.824 ± 0.33
K-M10 30	1.984	1.791 ± 0.063	17.905 ± 0.63
K-M10 35	1.934	1.897 ± 0.03	18.972 ± 0.31
K-M10 40	2.629	2.092 ± 0.008	20.917 ± 0.08
K-M10 45	2.805	1.962 ± 0.026	19.625 ± 0.26
K-M10 50	2.185	2.043 ± 0.004	20.432 ± 0.04
Kök		1.404 ± 0.012	14.043 ± 0.123
Kök + kabuk		9.446 ± 0.141	94.461 ± 1.412
Kabuk		17.276 ± 0.494	172.76 ± 4.943

Çizelge 5.19. Süspansiyon kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen miktarları (% , mg/L) ve hücrelerdeki KBİ değerlerinin değişimi

Numune	Biyokütle değişimi	Şikonin/alkannin üretimi	
	KBİ	%	mg/L
S-M9 15	3.833	0.018 ± 0.005	4.753 ± 0.67
S-M9 20	4.085	0.563 ± 0.011	36.615 ± 0.355
S-M10 5	0.96	0.369 ± 0.052	20.631 ± 4.37
S-M10 10	1.45	0.116 ± 0.013	8.289 ± 4.057
S-M10 15	1.808	0.365 ± 0.001	26.179 ± 0.036
S-M10 20	3.978	1.217 ± 0.004	156.145 ± 0.255
S-M10 50	3.285	1.953 ± 0.009	166.003 ± 0.38

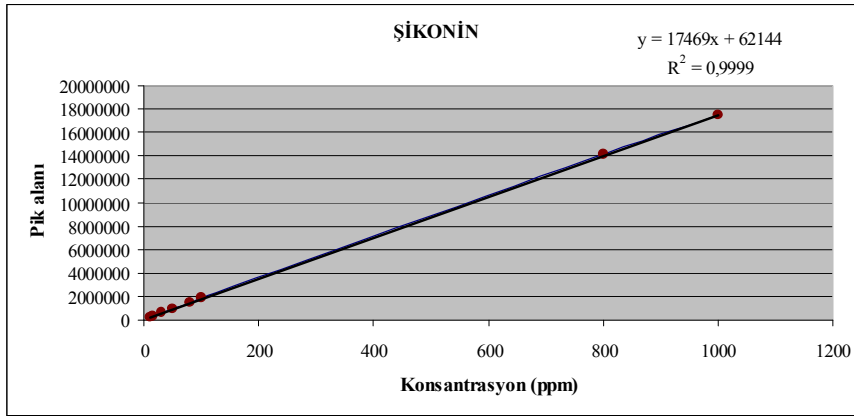
Çizelge 5.20. Biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkanninin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen miktarları (mg/L)

Numune	Biyokütle değişimi	Şikonin/alkannin üretimi	
	KBİ		Toplam
BK-1	1.443	119.65 ± 0.02	131.315
BS-1	-	11.665 ± 0.014	
BK-2	0.917	22.377 ± 0.023	24.844
BS-2	-	2.467 ± 0.008	
BK-3	1.236	84.489 ± 0.116	105.601
BS-3	-	21.113 ± 0.005	
BK-4	0.934	207.71 ± 0.179	213.423
BS-4	-	5.714 ± 0.007	

5.5.2.2. HPLC Analizi

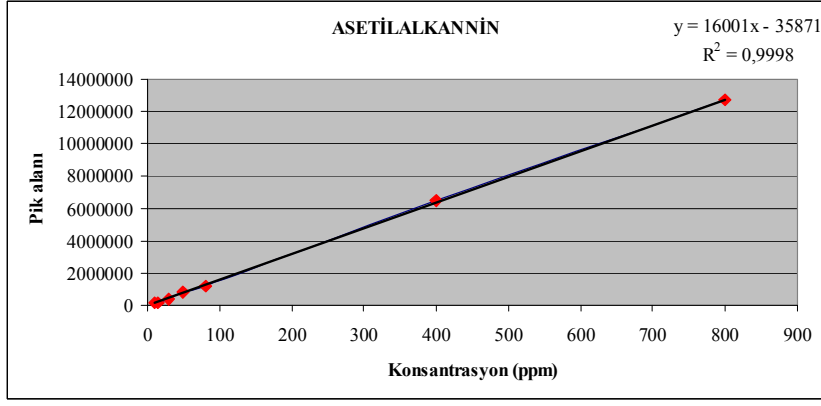
5.5.2.2.1. Ters Faz HPLC ile Şikonin Miktar Tayini

Standart çözeltileri kolona üçer defa enjekte edilerek alıkonma süreleri (bağlı tutuş zamanı) tespit edilmiştir (Şekil 5.30-5.31). Standartların seri dilüsyonlarının (Çizelge 4.8) HPLC kolonuna uygulanması ile elde edilen piklerin alanlarının (y) konsantrasyon değerine (x) karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Şikonin ve asetilalkannin için kalibrasyon eğrileri ve elde edilen doğru denklemleri sırasıyla Şekil 5.30 ve 5.31'deki gibidir.



Şekil 5.31. Ters faz HPLC’de şikonin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

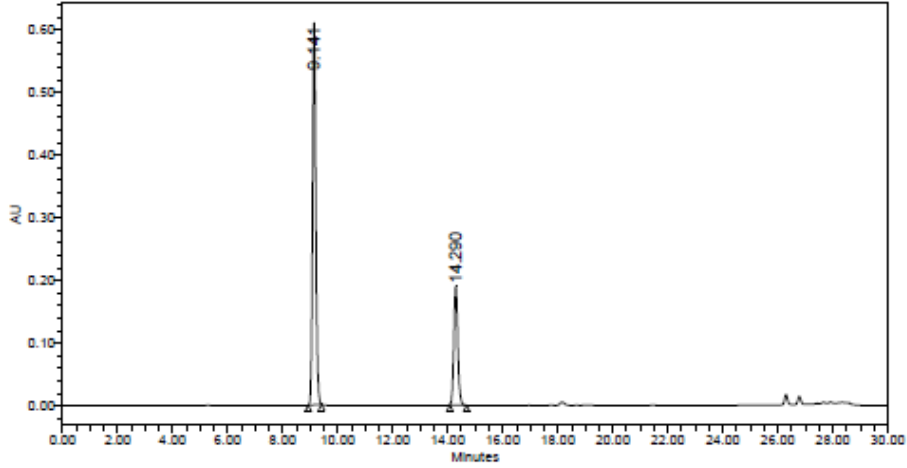
Doğru denklemi
 $y = 17469x + 62144$
 $R^2 = 0.9999$



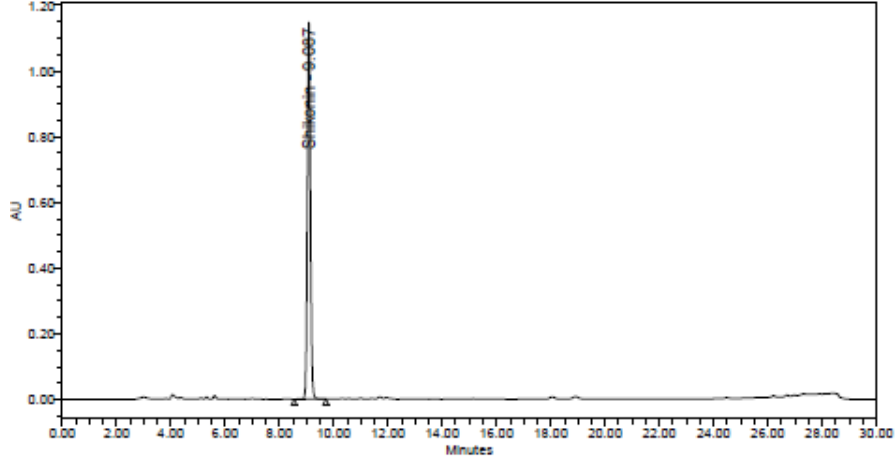
Şekil 5.32. Ters faz HPLC’de asetilalkannin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Doğru denklemi
 $y = 16001x - 35871$
 $R^2 = 0,9998$

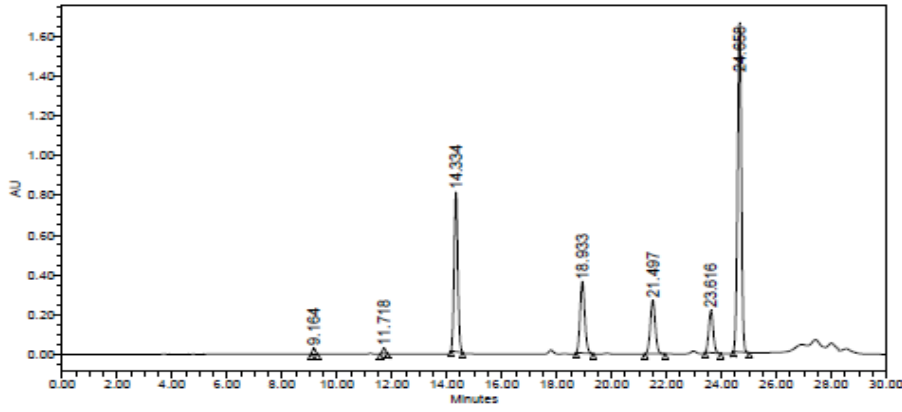
Alıkonma zamanları (R_t); şikonin için 9.01-9.17. dk ve asetilalkannin için 14.2-14.3. dk olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.32).



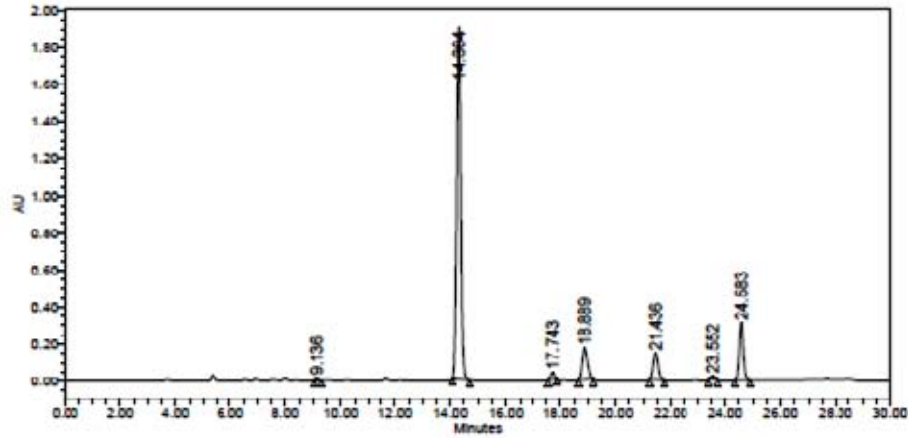
Şekil 5.33. Şikonin ve asetilalkannin standartlarının RP-HPLC’de ayrımı



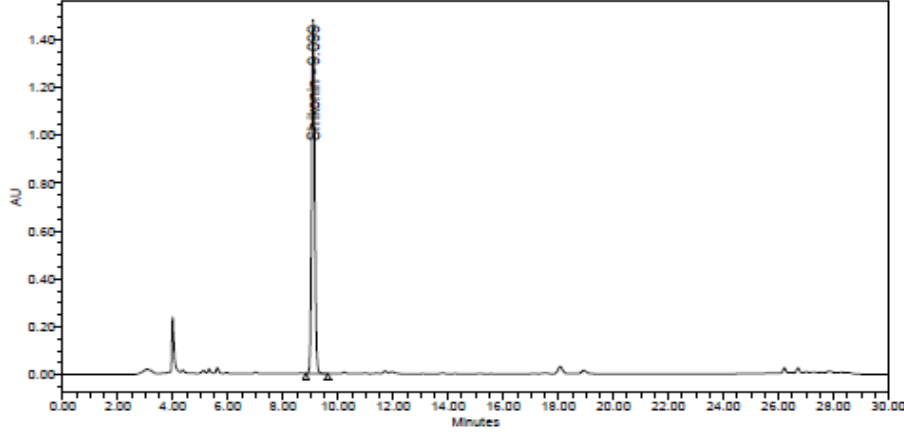
Şekil 5.34. Hidroliz edilen *A. densiflora* kökünün RP-HPLC kromatogramı



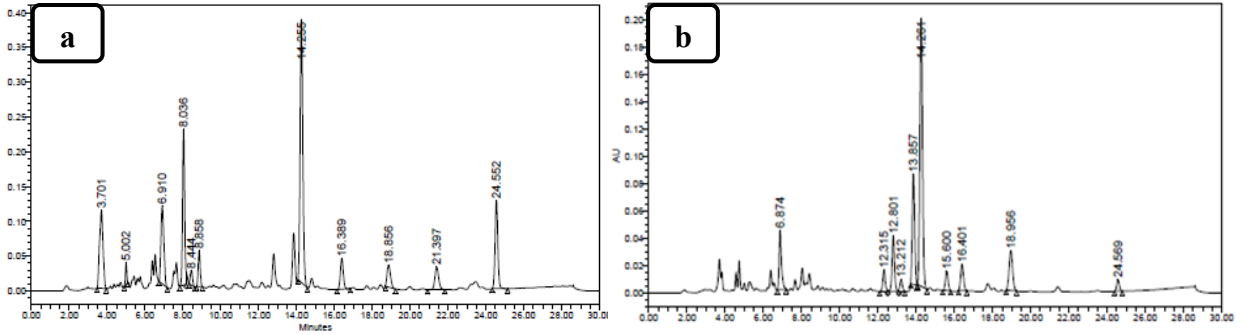
Şekil 5.35. *A. densiflora* kök kabuklarında bulunan şikinin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı



Şekil 5.36. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus kültürü ekstralarında bulunan şikinin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı



Şekil 5.37. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus kültürü ekstralarının hidroliz edildikten sonraki RP-HPLC kromatogramı



Şekil 5.38. BK-4 biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerde (a) ve sıvı ortamda (BS-4)(b) bulunan şikinin ve türevlerine ait RP-HPLC kromatogramı

Bitkide şikinin ve türevlerinin en çok bulunduğu kısımlar olan kök kabuklarından elde edilen kromatogram, *in vitro* kültürlerin kromatogramları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 5.34). *In vitro* olarak elde edilen hücrelerde şikinin türevlerinden en fazla asetilalkannin (asetilşikinin ile aynı retensiyon zamanında olduğu için kullanıldı) bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 5.35, 5.37). Ters faz HPLC ile numunelerde mevcut olan serbest haldeki asetilşikinin/asetilalkannin ve şikinin/alkanninin miktarları belirlenmiştir (Çizelge 5.21-5.23).

Hidroliz işlemi sonucunda şikinin türevlerinin şikinine dönüşümlerinin gerçekleşmesi de HPLC kromatogramlarında görülen tek pik ile belirlenmiştir (Şekil 5.33, 5.36).

Çizelge 5.21. Bitki kök ile kabuklarında bulunan ve kallus kültürlerinde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/g)

Numune	Asetilalkannin		Serbest Şikonin		Toplam Şikonin	
	%	mg/g	%	mg/g	%	mg/g
K-M9 10	0.002±0.0001	0.016±0.001	-	-	-	-
K-M9 15	0.011±0.0001	0.111±0.001	-	-	0.009±0.0001	0.094±0.001
K-M9 20	0.002±0.0001	0.016±0.001	-	-	0.002±0.0001	0.024±0.0001
K-M9 25	0.0272±0.0001	0.274±0.001	-	-	0.246±0.0003	2.461±0.003
K-M9 30	0.043±0.0001	0.434±0.001	-	-	0.144±0.0001	1.442±0.001
K-M9 35	0.024±0.0001	0.243±0.001	-	-	0.092±0.0002	0.916±0.0023
K-M9 40	0.037±0.0001	0.374±0.001	-	-	0.117±0.0004	1.171±0.0038
K-M9 45	0.299±0.0005	2.991±0.005	0.0002±0.0002	0.002±0.002	0.424±0.0022	4.240±0.022
K-M9 50	0.235±0.1200	2.346±1.20	0.0055±0.0006	0.055±0.006	0.232±0.0001	2.325±0.0001
K-M10 10	0.002±0.0001	0.018±0.001	-	-	0.002±0.0001	0.017±0.0006
K-M10 15	0.004±0.0001	0.041±0.001	-	-	0.03±0.0001	0.296±0.0004
K-M10 20	0.14±0.0015	1.399±0.015	-	-	0.34±0.0013	3.397±0.013
K-M10 25	0.557±0.0044	5.575±0.044	0.003±0.0004	0.029±0.004	0.696±0.008	6.962±0.0801
K-M10 30	0.777±0.0050	7.770±0.050	0.0023±0.001	0.023±0.011	0.609±0.0001	6.089±0.0002
K-M10 35	0.418±0.0005	4.180±0.005	0.0012±0.0008	0.012±0.008	0.708±0.0001	7.084±0.0002
K-M10 40	1.227±0.0055	12.27±0.055	0.001±0.0001	0.010±0.001	1.65±0.0328	16.459±0.328
K-M10 45	0.459±0.0019	4.591±0.019	0.0001±0.0014	0.001±0.014	0.919±0.0082	9.193 ± 0.082
K-M10 50	0.953 ±0.0025	9.528±0.025	0.0085±0.0001	0.085±0.001	0.917±0.0088	9.169±0.088
Kök	0.030 ± 0.0001	0.301±0.001	-	-	0.636±0.0004	6.358±0.004
Kök+kabuk	3.249± 0.0001	32.494±0.001	0.0093±0.0019	0.093±0.019	5.03±0.0042	50.31±0.042
Kabuk	4.707 ±0.0452	47.074±0.452	0.2394±0.0001	2.394±0.001	13.78±0.098	137.84±0.982

Çizelge 5.22. Süspansiyon kültürlerinde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/L)

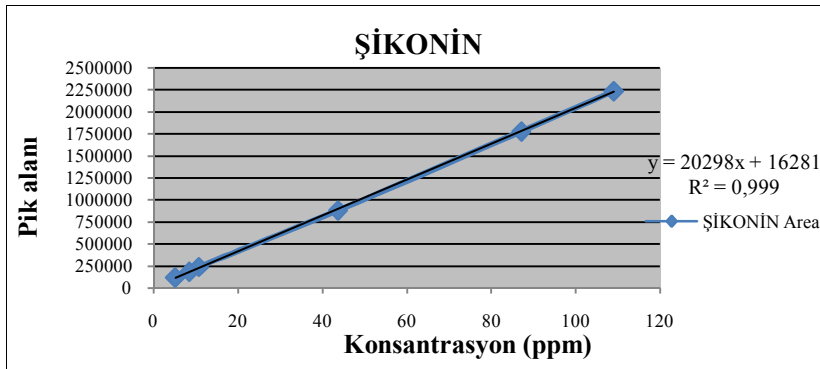
Numune	Asetilalkannin		Serbest Şikonin		Toplam Şikonin	
	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
S-M9 15	0.0032 ±0.0001	0.286 ±0.0004	-	-	0.0418 ± 0.002	5.596 ± 0.004
S-M9 20	0.0550 ±0.0001	3.577 ±0.0048	-	-	0.0861 ± 0.005	7.532 ± 0.012
S-M10 15	0.0010 ±0.0001	0.071 ±0.0006	-	-	0.0014 ±0.0001	0.098 ± 0.001
S-M10 20	0.0261 ±0.0002	3.349 ±0.0227	-	-	0.406 ± 0.0002	52.21 ± 0.324
S-M10 50	0.1321 ±0.0002	11.231 ±0.0148	0.0006±0.0001	0.0534±0.001	0.6425± 0.0032	54.614± 0.067

Çizelge 5.23. Biyoreaktörlerde üretilen serbest şikonin ve asetilalkannin ile toplam şikoninin RP-HPLC ile belirlenen miktarları (% , mg/L)

Numune	Asetilalkannin		Serbest Şikonin		Toplam Şikonin	
	%	mg/L	%	mg/L	mg/L	Toplam
BK-1	0.1918 ±0.0005	49.062 ±0.128	0.0062 ±0.001	1.581 ± 0.363	60.171 ± 0.0001	64.922
BS-1	0.0006 ±0.0001	0.052 ±0.0001	-	-	4.7516 ± 0.0068	
BK-2	0.055 ± 0.001	15.717 ±0.071	-	-	20.741 ± 0.0569	20.944
BS-2	0.014 ± 0.0018	0.801 ±0.019	-	-	0.2031 ± 0.0041	
BK-3	0.0703 ± 0.004	24.723 ±0.955	0.005 ±0.0001	2.451 ± 1.002	32.649 ± 0.0004	32.733
BS-3	0.015 ± 0.001	1.021 ±0.081	-	-	2.084 ± 0.0205	
BK-4	0.0928 ±0.1298	59.475±0.0001	0.012 ±0.0001	3.868±0.0001	110.99 ± 0.0001	111.402
BS-4	0.0302 ±0.0001	1.873 ± 0.004	-	-	0.4109 ± 0.0029	

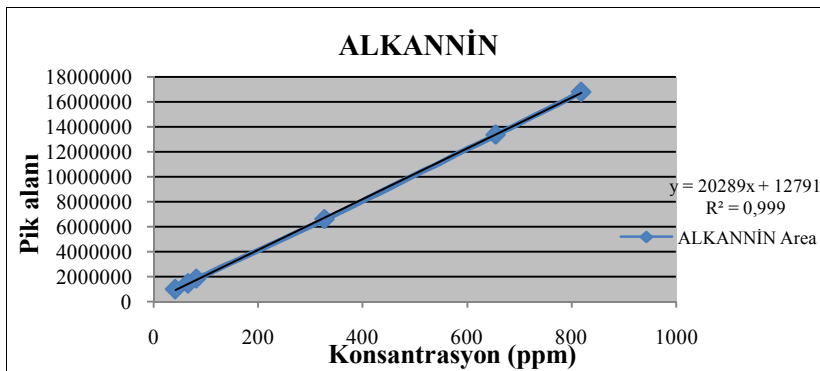
5.5.2.2.2. Alkannin ve Şikonin Enantiyomerlerinin HPLC ile Ayrımı

HPLC’de kiral kolon aracılığıyla bitki kök ve kabuk kısımlarında bulunan ve kallus, süspansiyon kültürleri ile biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkanninin miktarları tespit edilerek karşılaştırılmıştır (Çizelge 5.24-5.26). HPLC ile normal faz kiral kolon kullanılarak enantiyomerlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Şikonin ve alkannin için kalibrasyon eğrileri ve elde edilen denklemler sırasıyla Şekil 5.38 ve 5.39’daki gibidir.



Şekil 5.39. Normal faz kiral kolonda şikonin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

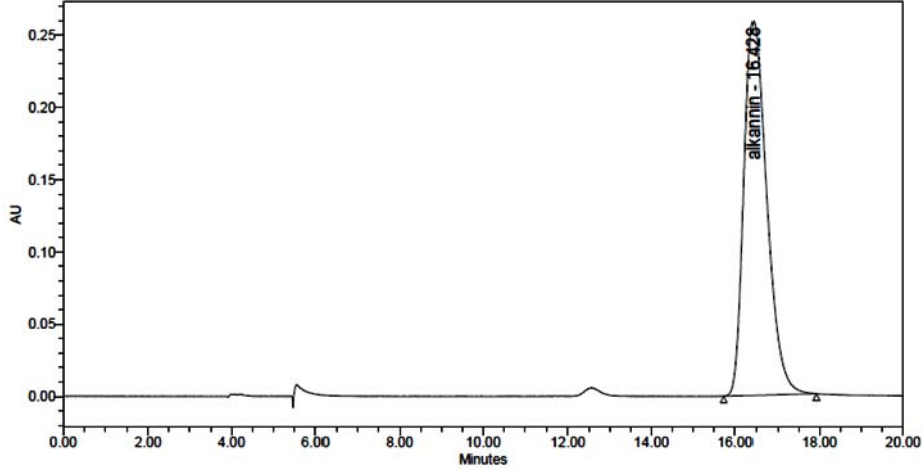
Doğru denklemi
 $y = 20298x + 16281$
 $R^2 = 0.9999$



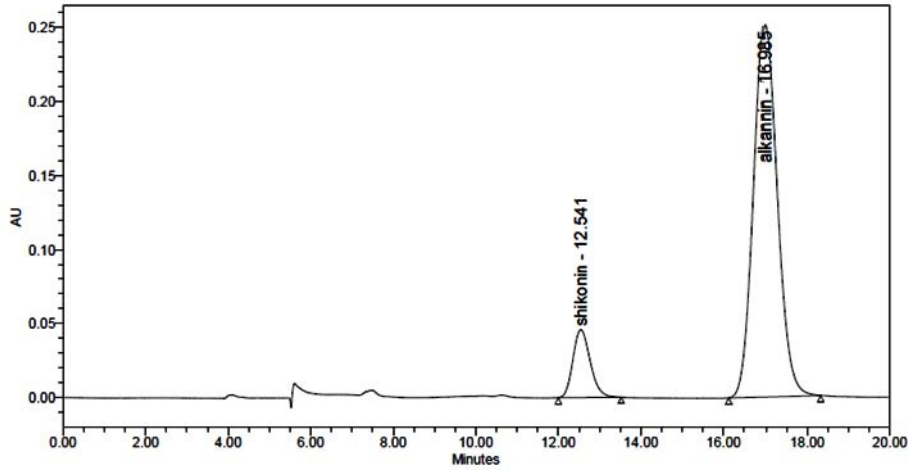
Şekil 5.40. Normal faz kiral kolonda alkannin için elde edilen kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi

Doğru denklemi
 $y = 23640x - 76378$
 $R^2 = 0.9999$

Standart çözeltileri kolona üçer defa enjekte edilerek alıkonma süreleri tespit edilmiştir (Şekil 5.40, 5.41). Alıkonma zamanları (R_t); şikonin için 12.54. dk ve alkannin için ise 16.43. dk olarak tespit edilmiştir.

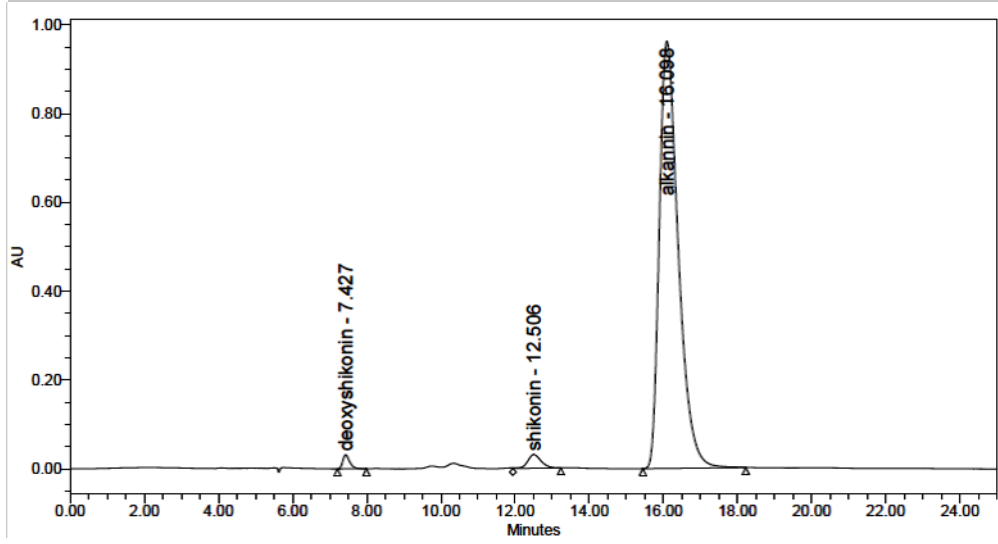


Şekil 5.41. 400 µg/mL konsantrasyondaki alkannin standardının normal faz HPLC kromatogramı

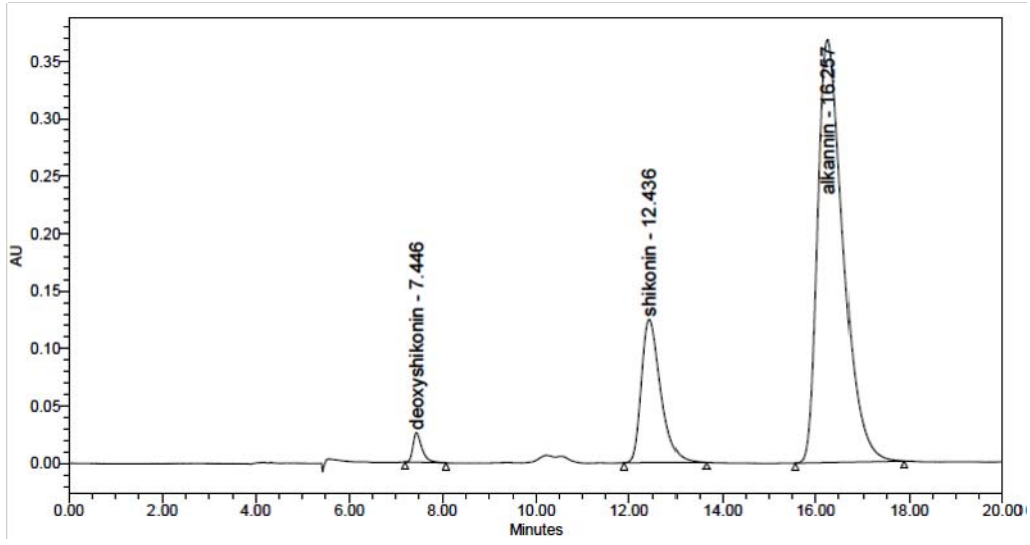


Şekil 5.42. Şikonin standardının (Chromadex, CA. USA) normal faz HPLC’de ayrımı

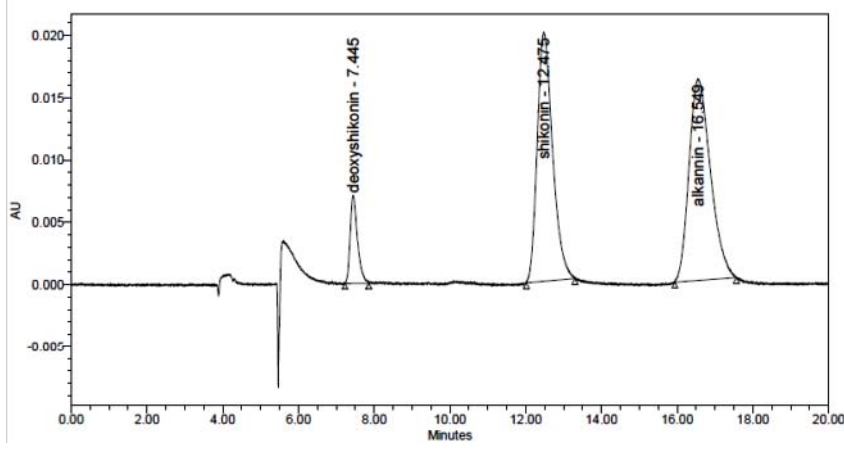
In vitro olarak elde edilen hücrelerin ve *A. densiflora* kök ve kök kabuklarının ekstratlarına hidroliz uygulaması sonrasında meydana gelen alkannin/şikonin karışımının, HPLC analizi ile şikonin ve alkannine ayrıldığı belirlenmiştir. Bu uygulama sonrasında aynı zamanda deokşikonin de kromatogramlarda gözlenmiştir (Şekil 5.42-5.50).



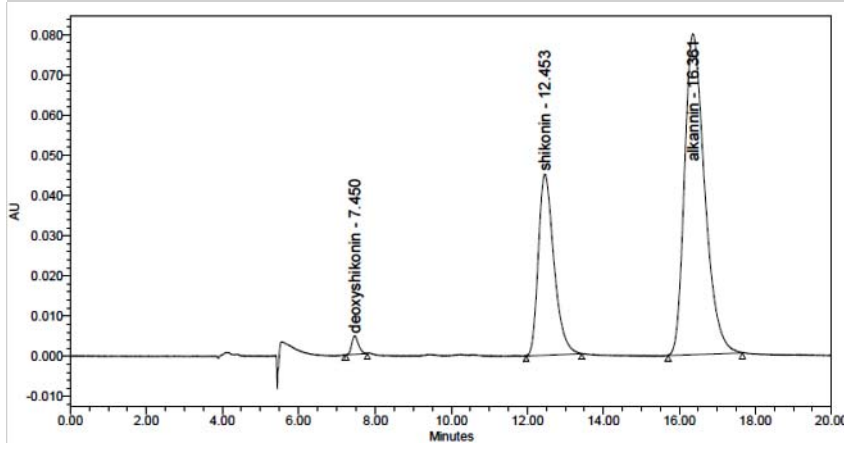
Şekil 5.43. Hidroliz edilen *A. densiflora* kök kabuklarına ait normal faz HPLC kromatogramı



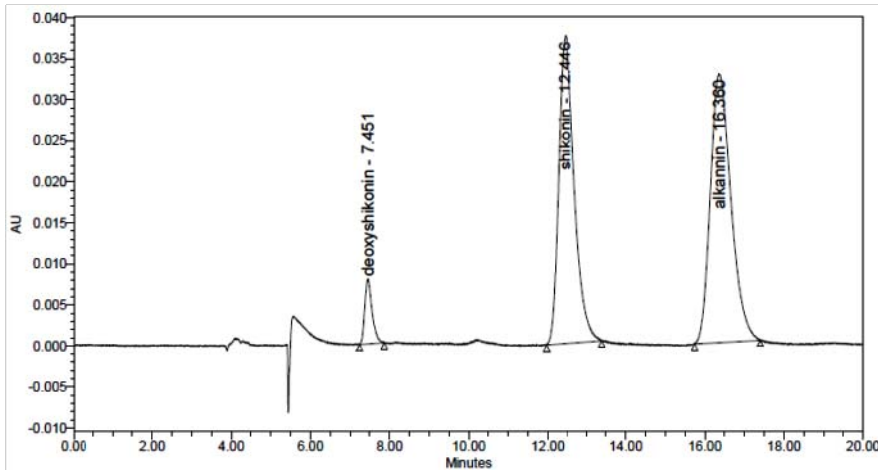
Şekil 5.44. M10 ortamında 40. günde gelişen kallus ekstralarının hidroliz edildikten sonraki normal faz HPLC kromatogramı



Şekil 5.45. M9 ortamında 40. günde gelişen kallus ekstrilerine ait normal faz HPLC kromatogramı

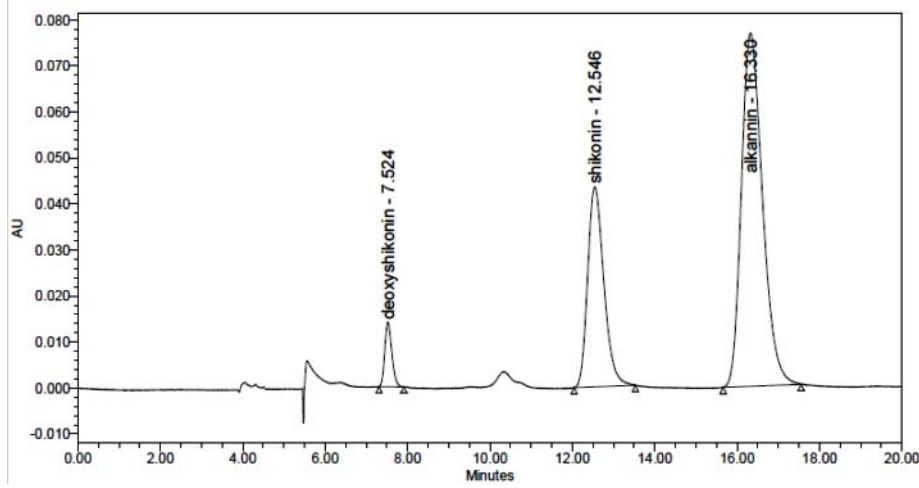


Şekil 5.46. M9 ortamında 45. günde gelişen kallus ekstrilerine ait normal faz HPLC kromatogramı

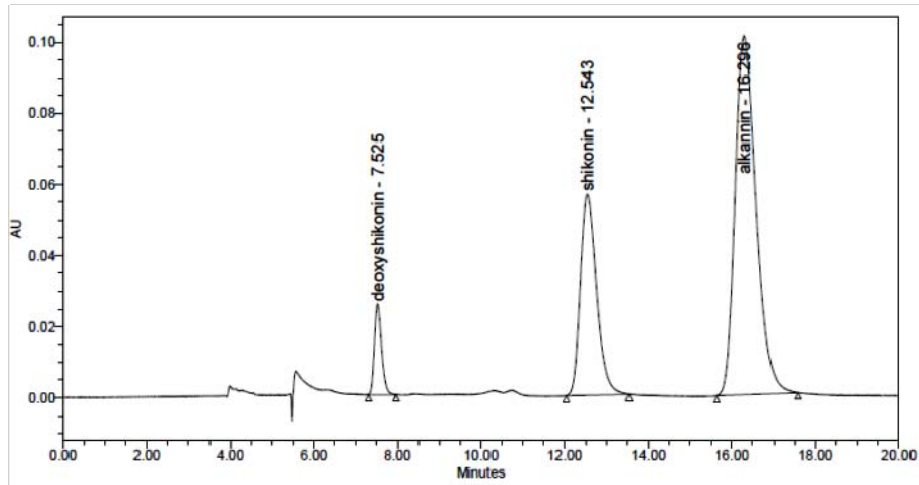


Şekil 5.47. M9 ortamında 50. günde gelişen kallus kültürü ekstrilerinde ait normal faz HPLC kromatogramı

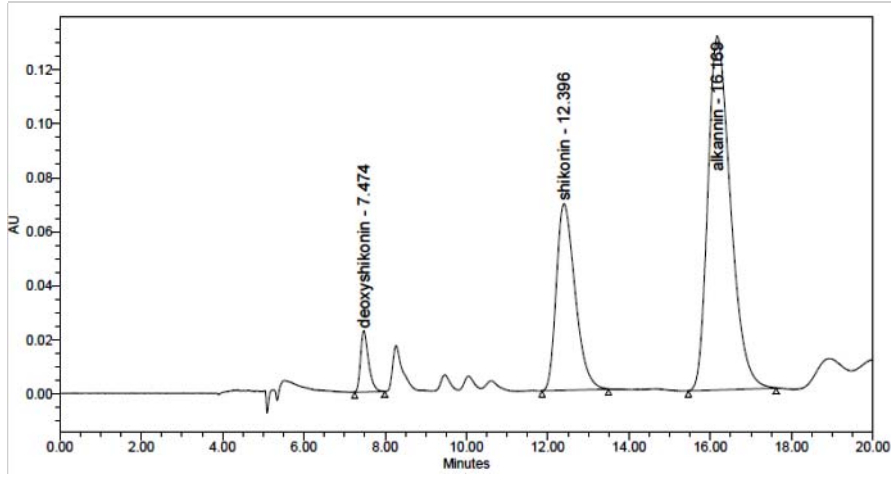
M9 ortamından 40. ve 50. günlerde alınan kallus ekstralarında; serbest halde bulunan şikonin miktarı alkannine oranla fazla iken, 45. günde alkannin oranı şikoninden fazla olarak belirlenmiştir (Şekil 5.44-5.46).



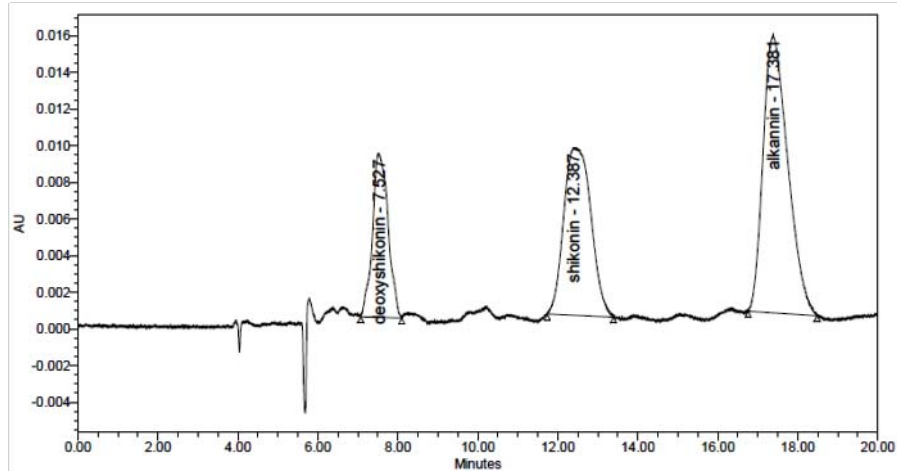
Şekil 5.48. Süspansiyon kültürlerinde M10 ortamında 20. günde gelişen hücrelerin ekstralarına ait normal faz HPLC kromatogramı



Şekil 5.49. Süspansiyon kültürlerinde M10 ortamında 50. günde gelişen hücrelerin ekstralarına ait normal faz HPLC kromatogramı



Şekil 5.50. BK-4 biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerin ekstrelerine ait normal faz HPLC kromatogramı

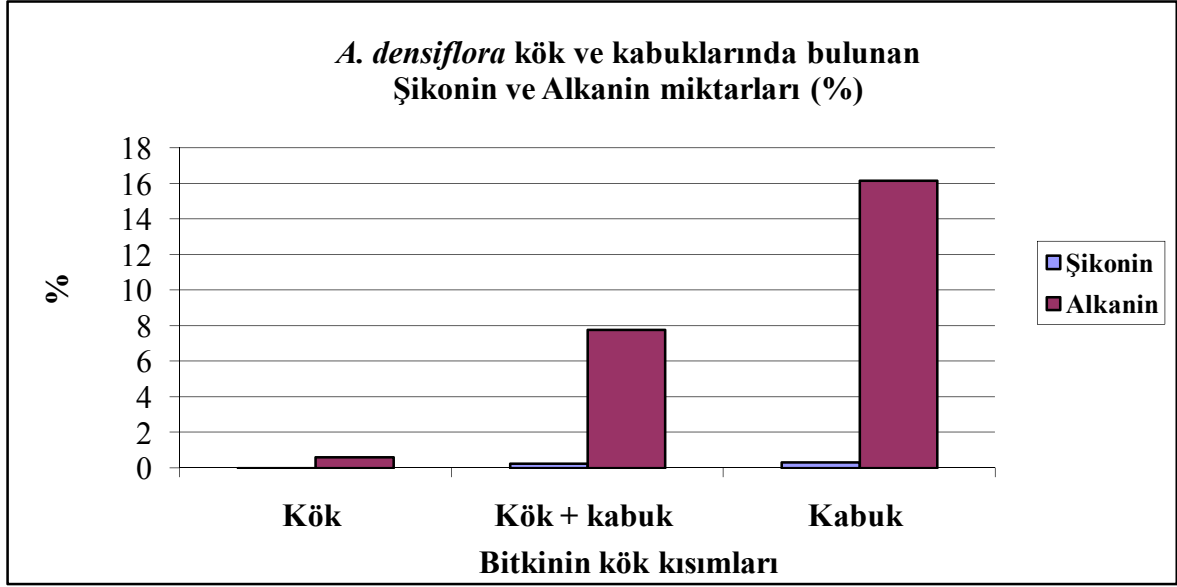


Şekil 5.51. BS-4 biyoreaktör sistemine ait normal faz HPLC kromatogramı

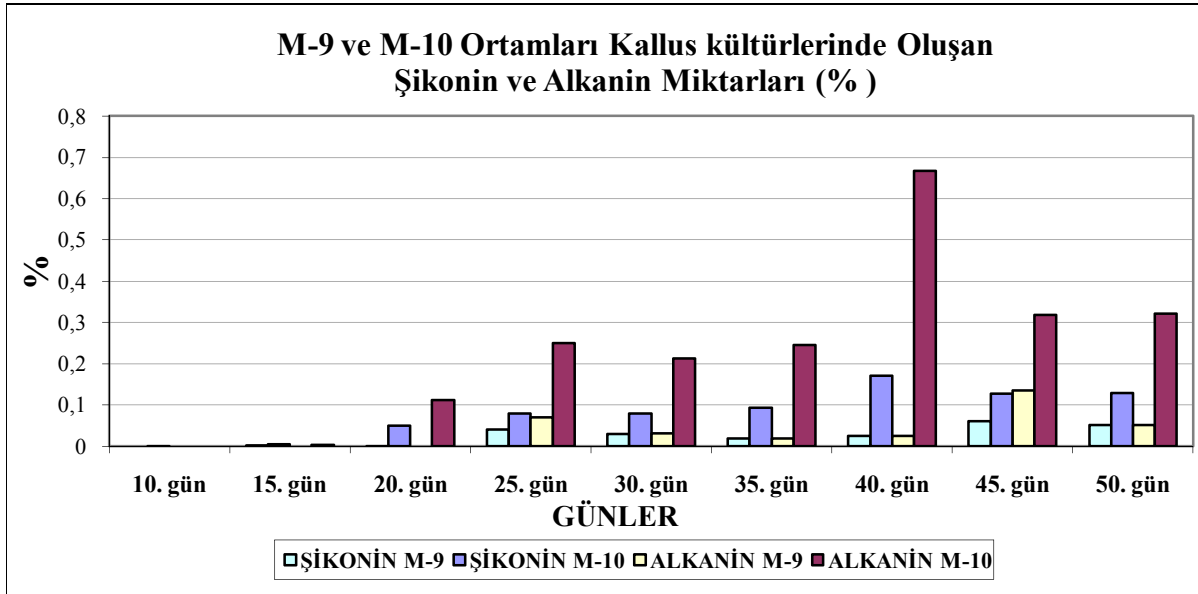
Biyoreaktör sistemlerinde en iyi naftokinon oluşumu 60 gr kallus inoküle edilen 25 günlük M10 ortamında gelişen BK-4 biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerde belirlenmiştir (Şekil 5.50). Aynı durumun, hücrelerin gelişme ortamları için söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. BS-4 ekstrelerinde BS-3'ten daha az miktarda alkannin ve şikonin belirlenmiştir (Şekil 5.50, 5.54, Çizelge 5.26).

Çizelge 5.24. Bitki kök ile kabuklarında bulunan ve kallus kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin normal faz HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (%)

Numune	Şikonin	Alkannin	Şikonin: Alkannin oranı
K-M9 10	-	-	-
K-M9 15	0.0019 ± 0.00002	-	-
K-M9 20	0.0003 ± 0.00007	-	-
K-M9 25	0.0407 ± 0.00015	0.0699 ± 0.00021	36.77 : 63.23
K-M9 30	0.0294 ± 0.00006	0.0316 ± 0.00041	48.14 : 54.86
K-M9 35	0.0186 ± 0.00005	0.0194 ± 0.00008	48.97 : 51.03
K-M9 40	0.0258 ± 0.00004	0.0246 ± 0.00024	51.25 : 48.75
K-M9 45	0.0609 ± 0.00005	0.1354 ± 0.00017	31.04 : 68.96
K-M9 50	0.0514 ± 0.00002	0.0519 ± 0.00024	49.73 : 50.27
K-M10 10	0.0002 ± 0.00010	-	
K-M10 15	0.0050 ± 0.00005	0.0027 ± 0.00003	65.03 : 34.97
K-M10 20	0.0496 ± 0.00005	0.1122 ± 0.00059	30.63 : 69.37
K-M10 25	0.0791 ± 0.00032	0.2499 ± 0.00118	24.04 : 75.96
K-M10 30	0.0799 ± 0.00034	0.2120 ± 0.00042	27.37 : 72.63
K-M10 35	0.0929 ± 0.00054	0.2455 ± 0.00107	27.45 : 72.55
K-M10 40	0.1709 ± 0.00084	0.6667 ± 0.00164	20.40 : 79.60
K-M10 45	0.1270 ± 0.00016	0.3183 ± 0.00173	28.52 : 71.48
K-M10 50	0.1285 ± 0.00087	0.3205 ± 0.00063	28.62 : 71.38
Kök	0.0096 ± 0.00001	0.6232 ± 0.00001	1.51 : 98.49
Kök + kabuk	0.2474 ± 0.01403	7.7706 ± 0.57189	3.09 : 96.91
Kabuk	0.3457 ± 0.00055	16.156 ± 0.12979	2.10 : 97.90



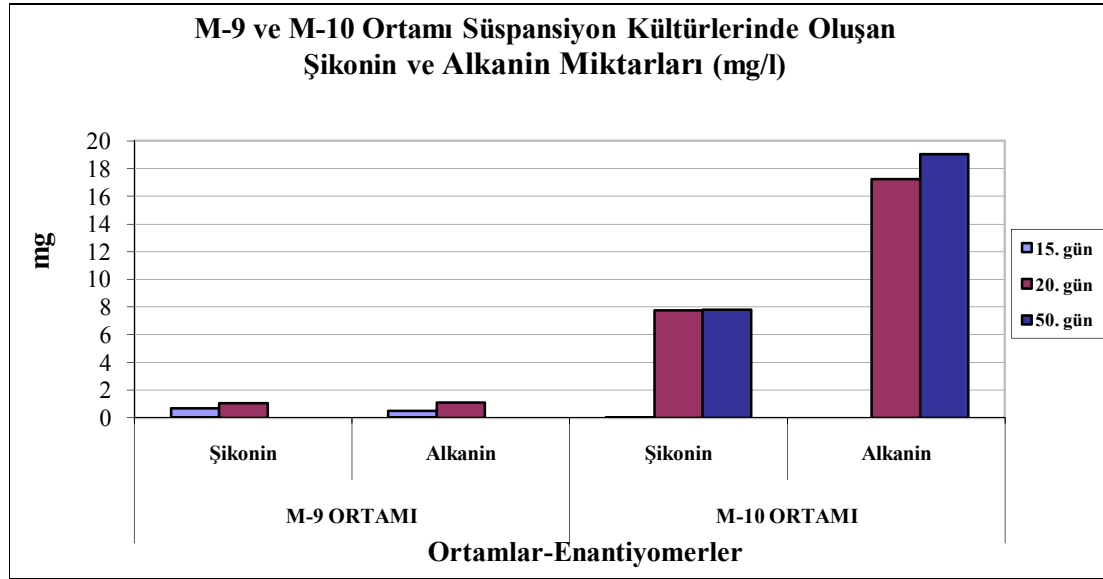
Şekil 5.52. *A. densiflora* kök, kabukları ile birlikte kök ve sadece kabuk kısımlarında bulunan şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (%)



Şekil 5.53. M9 ve M10 ortamlarında gelişen kallus kültürlerinde oluşan % şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarındaki değişimler

Çizelge 5.25. Süspansiyon kültürlerinde üretilen şikonin ve alkanninin normal faz HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (% , mg/L)

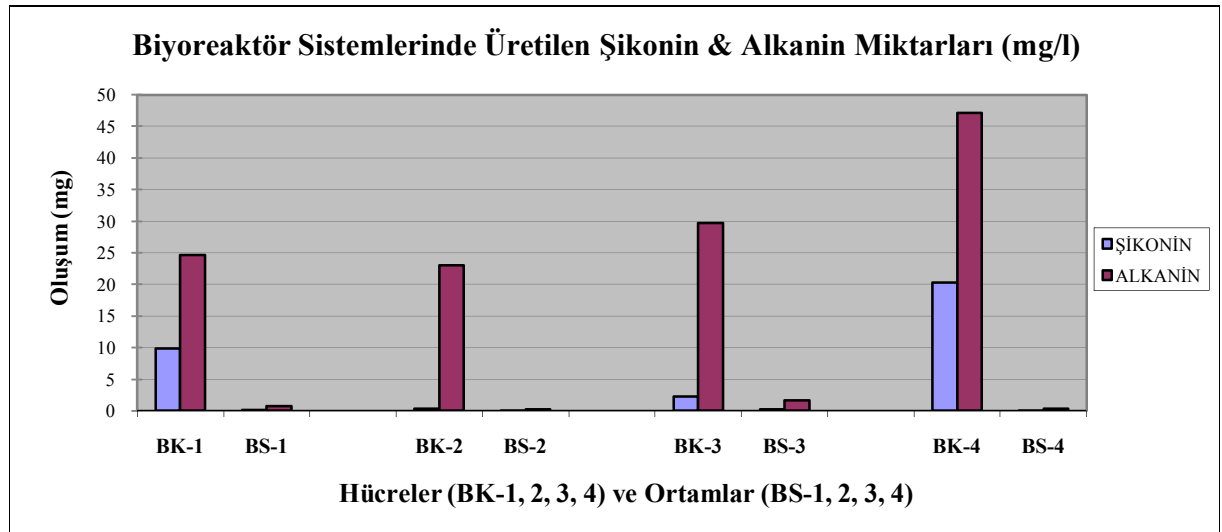
Numune	ŞİKONİN		ALKANNİN	
	%	mg/L	%	mg/L
S-M9 15	0.0073 ± 0.0002	0.658 ± 0.015	0.0055 ± 0.0003	0.498 ± 0.031
S-M9 20	0.0165 ± 0.0007	1.072 ± 0.046	0.0169 ± 0.0001	1.098 ± 0.001
S-M10 15	0.0003± 0.0001	0.023 ± 0.001	ND	ND
S-M10 20	0.0604 ± 0.0010	7.746 ± 0.135	0.1342 ± 0.0034	17.226 ± 0.436
S-M10 50	0.0919 ± 0.0034	7.814 ± 0.285	0.2238 ± 0.0146	19.022 ± 1.242



Şekil 5.54. M9 ve M10 ortamlarında gelişen süspansiyon kültürlerinde oluşan şikonin/alkanninin HPLC’de belirlenen miktarları (mg/L)

Çizelge 5.26. Biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları (mg/L)

Numune	ŞİKONİN		ALKANNİN	
		Toplam		Toplam
BK-1	9.8167 ± 0.5401	9.906	24.668 ± 1.292	25.3965
BS-1	0.0895 ± 0.0001		0.7285 ± 0.343	
BK-2	0.3325 ± 0.0002	0.342	23.0583 ± 0.493	23.2224
BS-2	0.0098 ± 0.0001		0.1641 ± 0.077	
BK-3	2.2049 ± 0.0206	2.373	29.7248 ± 0.035	31.3140
BS-3	0.1683 ± 0.0001		1.5892 ± 0.749	
BK-4	20.258 ± 0.0001	20.299	47.1827 ± 0.010	47.4820
BS-4	0.0408 ± 0.0001		0.2994 ± 0.141	



Şekil 5.55. Biyoreaktör sistemlerinde oluşan % şikonin/alkanninin HPLC’de kiral kolon ile belirlenen miktarları

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Boraginaceae familyasındaki bitkilerin, naftokinon yapısındaki alkannin ve şikonin türevi biyoaktif metabolitlerinden dolayı tıbbi amaçla ve boyar madde olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Şikonin ve enantiyomeri olan alkannin türevi doğal naftokinonlar, başta yara iyileştirici olmak üzere antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, radikal süpürücü ve antitrombotik aktiviteye sahiptir. Şikonin ve türevleri, tıbbi preparatların bileşiminde yara iyileştirici özellikleri ile yer aldıkları gibi kırmızı renklerinden dolayı boyar madde olarak gıda, dokumacılık ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadırlar (4, 25).

Halk arasında kullanımları M.Ö.'lere dayanan Boraginaceae familyası bitkilerinin üzerinde en çok çalışılan türleri *L. erythrorhizon* ve *A. euchroma*'dır. Ana bileşenleri şikonin türevleri olan *L. erythrorhizon* üzerinde ilk kez 20. yüzyılın sonlarında doku kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hem tıbbi açıdan öneminin bulunması hem de doğal boyar madde olması nedeniyle yoğun şekilde talep edilen şikonin, doku kültürü ile endüstriyel boyutta üretilen ilk sekonder metabolittir. Mitsui Petrokimya Şirketi'nde *L. erythrorhizon* bitkisinden hareketle doku kültürü ile şikoninin ticari üretimi gerçekleştirilerek bu konuda birçok patent alınmıştır (246, 247). Bu metot ile *L. erythrorhizon* hücre kültürlerinde iki aşamalı reaktörlerde 23 günlük periyotta hücre ağırlığının % 23'ü kadar ve her hafta hücrelerden 60 mg/g oranında şikonin elde edilebilmiştir. Şikonin, *L. erythrorhizon* köklerinde % 2-3'lük oranda bulunabilmekte ve bu oranla 5-7 yılda ticari üretimde kullanılabilir miktar sağlanabilmektedir (65). Şikoninin elde edilmesinde, kaynak olarak uzun gelişme periyodu bulunan bitkinin yerine hücre kültürü tekniğinin kullanılmasıyla 830 kat hızlı üretim sağlanabilmiştir (63, 248). Bu metodun üstün başarısı, diğer birçok Boraginaceae türünün kültüre edilen hücreleri ile alkannin, şikonin üretimi için yapılan araştırmaları teşvik etmiş ve sonuçta farklı düzeylerde başarılar elde edilmiştir (70, 66). Şikoninin, 1974 yılında başlayan doku kültürü ile üretim çalışmaları daha da hız kazanmış ve halen artarak devam etmektedir. Alkannin ve şikoninin biyosentezini kontrol eden faktörlere ilaveten, kültür ortamındaki değişimler ile desteklenen araştırmalar yapılmaktadır. Boraginaceae familyasına ait türlerin çoğunda doku kültürü çalışmaları yapılarak şikonin ve türevlerinin üretimlerini indükleyici ve inhibe edici fiziksel, kimyasal, biyotik ve abiyotik etmenler ortaya konulmuştur.

Doku kültürü çalışmalarının amacı; doğal olarak yetişen bitkilerin habitatlarından çok fazla miktarlarda toplanmasıyla doğal dengelerinin bozulmasının ve nesillerinin tükenme tehlikesinin önüne geçmenin yanında mevsim şartlarına bağlı kalmadan düzenli bir üretim gerçekleştirebilmektir. Bitkilerin doğal yaşamlarını engellemeden tıbbi ve endüstriyel amaçlı olarak kullanılmalarını sağlayan Bitki Biyoteknolojisi yöntemleri ile çok az bitkisel materyal kullanılarak endüstriyel boyutlarda üretimler sağlanabilmektedir (52, 53). Tarlada yetiştirilen bitkiler için üretim; hava değişiklikleri, zararlılar, hastalıklar ve besin durumuna ek olarak diğer biyotik ve abiyotik faktörlerin de etkisi ile birlikte düşünüldüğünde, geleneksel büyütme ve işleme sistemlerine karşılık, sekonder metabolitlerin *in vitro* yöntemlerle üretimi ekonomik açıdan sağlam bir alternatif yoldur (65).

Bölgesel endemik bir bitki olan *A. densiflora*'dan Bitki Biyoteknolojisi yöntemleri kullanılarak şikonin ve türevlerinin üretimi ile ilgili Türkiye'de ve dünyada yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Geleneksel tedavilerin, doğal gıda ve katkı maddelerinin önem kazandığı günümüzde, *A. densiflora*'dan şikonin etken maddesinin tespiti ve biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi konusunda bir ilk olan bu çalışmanın ülke ekonomisi açısından önem taşıyacağı düşünülmektedir.

6.1. Eksplantlardan Kallus Oluşumu ve Sterilizasyonu ile İlgili Tartışma

Doku kültürü çalışmalarının başlangıcını eksplantlardan kallus gelişimi oluşturduğundan, en iyi kallusu veren ortam araştırması yapılmıştır. Bitkide üretilmek istenen maddeler kök kısımlarında bulunduğu için eksplant olarak özellikle kökler üzerinde durulmuştur. Başlangıçta çeşitli ortamlarla yaptığımız çalışmalarda çok fazla kontaminasyon ile karşılaşmıştır. Toprak üstü kısımlarının çok tüylü yapısından dolayı kontaminasyon problemi daha fazla olmuştur. Bu yüzden bir seri ortam ve sterilizasyon çalışması yapmak gerekmiştir. Sterilizasyon çalışmaları, farklı zamanlarda ve farklı tekniklerle birbirini takip eden 3 aşama olarak uygulanmıştır.

Birinci aşamada % 20, 25, 35 ve 40'lık konsantrasyonlarda NaOCl ile yüzey sterilizasyonu uygulanmasının ardından MS, MS3 ve LS ortamlarına ekilen kök, sürgün ve yaprak eksplantlarında, yüksek oranda kontaminasyon ve çok düşük oranda kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu aşamadan sonra kallus gelişimine iyi yanıt vermediğinden yapraklar

eksplant olarak kullanılmamıştır.

Daha sonraki aşamalarda, antibiyotik-antifungal karışımları, H₂O₂ ve PPM kullanılmıştır. PPM'in hem bakteriosit hem de fungusit olarak geniş spektrumlu kullanım alanının bulunmasının yanında (249), sıcaklığa dayanıklılığı ve antibiyotiklerden daha ucuz olması rutin kullanımlarda tercih edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca PPM otoklavlanabilmekte ve antibiyotikler gibi ortama daha sonradan eklenmemektedir.

İkinci aşamada % 25 NaOCl ile yapılan eksplant sterilizasyonunu takiben kültür ortamına eklenen antibiyotik-antifungal karışımları ile eksplant sterilizasyonunda kullanılan ve ortama katılan PPM'in etkileri karşılaştırılmıştır. Antibiyotik-antifungal karışımı uygulamasında sürgün eksplantlarında % 25 civarında kontaminasyon (% 25.9-26.9) ve kallus oluşumu (24.11-26.84) gözlenirken, kök eksplantlarında oldukça yüksek oranda (% 72.73-93.75) kontaminasyon ve çok düşük oranda (% 1.14-2.53) kallus oluşumu tespit edilmiştir. Sürgün eksplantlarının sterilizasyonunda, % 1'lik konsantrasyonda PPM kullanılmasıyla gerek kallus oluşumu gerekse kontaminasyon oranları bakımından (sırasıyla % 25.2; 24.54) antibiyotik-antifungal karışımı ile yakın değerler elde edilirken, kök eksplantları için ise % 1, 2 ve 3'lük konsantrasyonlardaki PPM değerlerinin, kontaminasyon (sırasıyla % 27.3; 25.41; 22.2) ve kallus oluşum oranlarının (sırasıyla % 5.33; 6.67; 5.56) birbirine yakın olduğu gözlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda % 1'lik PPM kullanımının yeterli olabileceği kanısına varılmıştır. Yüksek konsantrasyonda (% 4) PPM kullanımı ile kontaminasyon oranı düşmüş (% 2.51) ancak bu durumda kallus oluşum oranı da (% 2.57) çok düşmüştür. Bu sebeple devam eden çalışmalarda kullanımından kaçınılmıştır.

Üçüncü aşama sterilizasyon çalışmalarında ise bir grupta H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantlar antibiyotik-antifungal karışımı içeren MS ortamlarına ekilmişlerdir. Diğer grupta ise % 1'lik PPM ile sterilize edilen eksplantlar % 0.5 oranında PPM içeren MS, SH, LS ve B5 ortamlarına ekilmişlerdir. 21 gün sonunda H₂O₂ ile birlikte antibiyotik-antifungal karışımının kullanıldığı çalışmada, PPM kullanılanlara göre daha az fungus oluşumu gözlenmiştir. PPM kullanılanlarda fungus kontaminasyonu çok görülürken, H₂O₂ uygulananlardaki kontaminasyonların çoğunu bakterilerin oluşturduğu, fungus oranının ise yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.3.a-b).

Eksplant sterilizasyonunda PPM ve H₂O₂ kullanımları karşılaştırıldığında, % 30 oranında H₂O₂ ile steril edilen ve antibiyotik karışımı içermeyen ya da 250 µl antibiyotik karışımı içeren MS ortamına ekilen kök ve sürgün eksplantlarında, gerek kallus oluşumunun daha yüksek oranda olması (sırasıyla kökte % 20 ve 3; sürgünde % 40 ve 100) gerekse kontaminasyon oranının daha düşük olması (sırasıyla kökte % 37 ve 53; sürgünde % 30 ve 0) bakımından PPM denemesine tercih edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. % 30'luk konsantrasyonda H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonu yapılan sürgün eksplantlarında % 100 oranında kallus oluşumu elde edilirken en yüksek oranda kütle büyüme indeksi (KBİ) değeri (4.19) de sağlanabilmiştir. Kök eksplantlarında da yine % 30'luk konsantrasyonda H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonunun ardından antibiyotik karışımı içermeyen MS ortamında en yüksek oranda (% 20) kallus oluşumu sağlanmıştır. Bitkide şikoninin asıl kaynağı olan köklerin eksplant olarak kullanılması esas olduğundan, kontaminasyonun engellenmesinde antibiyotik karışımı kullanılmadan, yalnızca % 30'luk konsantrasyonda H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonunun yeterli ve ideal olduğu belirlenmiştir.

6.2. Kallus Üretimi ile İlgili Tartışma

Kallus kültürlerinde öncelikle hücre gelişimi ve ardından da şikonin ve türevlerinin arttırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle kallus kültürlerinde yeterince hücre artışı sağlamak amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır. Bitkinin farklı kısımlarından alınan eksplantların doku kültürüne olan cevapları; kallus oluşumu ile alt kültürlerdeki kallus kütle artış oranları göz önüne alınarak hesaplanan kütle büyüme indeksi değerleri ile incelenmiştir.

Birinci sterilizasyon çalışmalarının devamı niteliğinde, eksplantların doku kültürüne olan cevapları; denenen tek yıllık gövdeler, yapraklar, sürgün ve kök eksplantları kallus oluşumu açısından irdelenmiştir. Burada çalışılan ortamlarda en iyi cevabı bitkinin sürgün eksplantlarının verdiği belirlenmiştir. Yaprak eksplantlarında sterilizasyonun etkisiyle kontaminasyon görülmemekle birlikte, kallus oluşumuna da rastlanmamıştır. Kök eksplantlarında sürgün eksplantlarına göre kontaminasyon oranının oldukça yüksek, kallus oluşumunun ise düşük olduğu saptanmıştır. Eksplantlardan iyi bir kallus gelişimi ise ancak üçüncü ayda gerçekleşmiştir.

PPM ile sterilizasyona tabi tutulduktan sonra MS, B5, SH ve LS ortamlarına ekilen kök ve

sürgün eksplantlarının KBİ değerlerinin MS, B5 ve SH ortamlarında yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.8). MS ortamında gerek kallus oluşumu gerekse 3 alt kültür boyunca hücre ağırlıklarının diğer üç ortama göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. MS ortamına ekilen 0.13 g ağırlığındaki kök eksplantından 3. alt kültür sonunda 17.79 g ağırlığında kallus elde edilirken, bunu takip eden B5 ortamında 0.02 g ağırlığındaki eksplanttan 1.87 g ağırlığında kallus elde edilmiştir. Sürgün eksplantlarında ise 3. alt kültür sonunda MS ve B5 ortamlarında sırasıyla 23.72 ve 12.35 g kallus üretilebilmiştir. Hem kök hem de sürgün eksplantlarında; MS ve B5 ortamlarında KBİ-1 değerlerinin yüksek oldukları belirlenirken, SH ve LS ortamlarında KBİ-2 değerlerinin diğer KBİ değerlerinden daha yüksek oldukları belirlenmiştir. Bu durum da MS ve B5 ortamlarında kallus oluşum hızının daha yüksek olduğunu yani bu ortamların doku kültürüne daha hızlı cevap verdiklerini göstermiştir.

Şikonin üretimi üzerine gerçekleştirilen ilk başarılı doku kültürü çalışmasında Tabata vd. (1974), *L. erythrorhizon* bitkisinden hareketle LS ortamında yaptıkları çalışmalarında oksin ve ışığın şikonin biyosentezindeki etkisini incelemişlerdir (14). Pigment üretiminin, IAA içeren ve karanlıkta tutulan hücre kültürlerinde arttığını, buna karşılık 2,4-D ve mavi ışığın etkisiyle azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca burada, kültür sürecinin sadece başlangıç aşamasında beyaz ışık ile aydınlatılmış ortamda şikonin üretiminin tamamen engellendiği gözlenmiştir. Başarılı pigment şekillenmesi için, tüm doku kültürünün karanlıkta yürütülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, daha sonra pek çok araştırma tarafından da desteklenmiştir (49). Papageorgiou vd. (1999); ışığın, biyosentez rotasındaki anahtar enzimleri olumsuz yönde etkilediğini tespit etmişlerdir (25). Gaisser ve Heide (1996), PHB geraniltransferaz aktivitesinin mavi ışık tarafından baskılandığını belirtmişlerdir (30). Lange vd. (1998) ise beyaz ışığın, şikonin oluşumunu engellerken HMGR gen ifadesini de güçlü bir şekilde baskıladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da inkübasyonun tüm aşamalarında kültürler karanlıkta tutulmuşlardır (44).

Bu tez çalışmasında, kallus geliştirmek amacıyla daha önce Boraginaceae familyası üyelerinin kullanıldığı çalışmalarda tercih edilen ortamlar olan ve birbirinden farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler içeren MS, SH, B5 ve LS ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlarda gelişen kallus üretimi 40 gün boyunca gözlenmiştir. Hesaplanan KBİ değerleri ve kallusların görünüşleri incelenerek ortamlar arasında karşılaştırma yapılmıştır. SH ve B5 ortamlarında kallus oluşum oranları ve KBİ değerleri

yüksek olmasına rağmen, MS ortamındaki kallusların daha kaliteli ve sürdürülebilir özellikte oldukları gözlenmiştir (Çizelge 5.8). SH ve LS ortamında gelişen kallusların koyu renkli, B5 ortamında gelişen kallusların ise daha açık renkli olmasına rağmen alt kültüre alınmaları ile koyulaştıkları gözlenmiştir (Şekil 5.2). MS ortamında gelişen sürgün ve kök kalluslarının beyaz-sarı renkli, kolay dağılılabilen parçalanabilir yapıda oldukları gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda MS ortamında gelişen bu kalluslar; hücre hatları oluşturulmasının ardından şikonin ve türevlerini arttırabilmek amaçlı çeşitli denemelerde kullanılmıştır (Şekil 5.5). Hücre hatlarını oluşturan bu kalluslarda nadiren kırmızı, mor renklenmeler gözlenmiş ancak bu renklenmeler alt kültüre alınmalarının ardından kaybolmuşlardır.

Çalışmada şikoninin üretimini uyarmak amacıyla kallus ve süspansiyon kültürlerinde daha önce yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak 6 farklı ortam kullanılmıştır. Bu ortamlardan ilki hem ilerleyen çalışmalarda kallusların oluşturulduğu hem de kontrol olarak kullanılan ortam olan MS'dir. İkinci ortamda büyüme düzenleyici, üçüncü ortamda ise amonyum kullanılmamıştır. Dördüncü ortamda ise hem büyüme düzenleyici hem de amonyum kullanılmamıştır. Beşinci ortam M9, altıncı ortam ise M10 ortamıdır. Bu denemelerde en iyi yanıt M9 ve M10 ortamlarının verdiği belirlenmiştir (Şekil 5.10, 5.11; Çizelge 5.11, 5.12).

Daha sonra en iyi yanıt alınan M9 ve M10 ortamları ile kök kaynaklı kalluslardan şikonin ve türevlerinin üretiminde tekrar çalışılmıştır. Bu ortamlarda kurulan kallus kültürlerinde kütle büyüme indeksleri ve pigment üretimleri incelenmiştir. 50 gün süre ile oluşturulan kültürlerde 10. ve 50. günler arasında 5'er gün aralıklarla belirlenen KBİ değerlerinin, M9 ortamında 1.53 ile 2.64 arasında değişirken, M10 ortamında 1.402-2.805 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 5.18). En iyi renklenmenin olduğu günler M9 ortamında 45., M10 ortamında ise 40. gün olup bu günlerdeki KBİ değerleri sırasıyla 1.966 ve 2.629'dur (Şekil 5.13, Çizelge 5.13, Çizelge 5.18). Kallus kültürlerinde en iyi renklenmenin görüldüğü M10 ortamlarının hücre biyokütlesinin arttırılmasında da M9 ortamına göre de daha avantajlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.13, Çizelge 5.18). Ortamlardaki yaş ağırlık/kuru ağırlık oranı (g/g) karşılaştırıldığında ise M9 ortamında bu oran 25.53-35.25 arasında değişirken, M10 ortamında bu değer 21.41-30.22 arasında değiştiği, MS ortamında ise 33.95-73.17 olduğu belirlenmiştir. Buradan MS ortamının içeriğinin büyük oranda sudan oluştuğu ayrıca bu oranlar ile de M10 ortamlarının M9 ortamına göre de daha avantajlı olduğu sonucuna varılabilmektedir.

6.3. Süspansiyon Kültürü ve Sekonder Metabolit Arttırımı ile İlgili Tartışma

Süspansiyon kültürü çalışmalarına, kallus kültürlerinde en iyi yanıt alınan MS ortamı ile başlanmış, beyaz renkli kalluslar elde edilmiş, büyüme eğrisi oluşturulmuş ve sonraki aşamalarda da kullanımına devam edilmiştir. Süspansiyon kültürünün 30 gün boyunca incelenmesi ve her 3 günde bir hücre ağırlıklarının ölçülmesi ile oluşturulan büyüme eğrisinde, 12. ve 24. günler arasında ağırlık artışı gözlenirken 14.-19. günlerin elisitör uygulaması için uygun zamanlar olduğu belirlenmiştir. Sekonder metabolit üretimi amacıyla çeşitli elisitör uygulamaları yapılmış, ardından farklı ortamlar denenmiştir.

Brigham vd. (1999), şikonin üretimini pozitif ve negatif yönde etkileyen pek çok faktörün bulunduğunu belirtmişlerdir (Çizelge 2.4). Çalışmalarında biyotik ve abiyotik faktörlerin *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinde epidermal hücrelerdeki pigment üretimini arttırdığını kaydetmişlerdir. Ortama bakır sülfat gibi abiyotik ve fungal elisitörler gibi biyotik faktörlerin eklenmesiyle pigment üretiminin indüklenerek total pigment miktarının arttığını belirlemişler ve *Rhizoctonia solani*'de bu yolla şikonin türevlerinin üretiminin 30 kat arttırıldığını belirtmişlerdir (6). Bu tez çalışmasında daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan şikonin üretimini indükleyici şartlar göz önünde bulundurularak çeşitli elisitör çalışmaları yapılmıştır.

Mühlenweg vd. (1998), *L. erythrorhizon* süspansiyon kültürlerinde LS ortamına metil jasmonat (MJ) ilavesi ile şikoninin biyosentezinde düzenleyici bir enzim olan Geranildifosfat: 4-hidroksibenzoat 3-geraniltransferaz enziminin aktivitesinin 200 kattan daha fazla arttırılabileceğini belirtmişlerdir (45). Ding vd. (2004) ise MJ'n şikonin oluşumu sırasında PAL ve PHB-geraniltransferaz faaliyetlerini arttırarak etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (250). Bu çalışmalar dikkate alınarak bu çalışmada MS ortamında MJ uygulaması gerçekleştirilmiş ancak istenen sonuç alınamamış ve pigment oluşumu gözlenememiştir.

Fu ve Lu (1999), *Arnebia euchroma* ile kurulan süspansiyon kültürlerinde *in situ* ekstraksiyon ile birlikte *Rhizopus oryzae* ve *Aspergillus niger*'den hazırlanmış fungal elisitörler uygulanması yaparak 245.68 mg/L konsantrasyonda şikonin elde etmişlerdir. Bu değer, kontrol kültürdeki miktarın 6.15 katı olduğu belirtilmiştir (81).

Bu çalışmada, bu veriler göz önünde bulundurularak süspansiyon kültürlerine *Rhizopus stolonifer* ve *A.niger* eklenerek şikonin türevlerinin üretimi bakımından araştırılmıştır. Şikonin türevi olabilecek bir leke İTK analizi ile belirlenmiş ancak istenilen renklenme gözlenmemiştir (Şekil 5.21).

Malik vd. (2011), *A. euchroma* ile kurdukları hücre süspansiyon kültürlerinde ışık, sıcaklık, sakaroz ve pH gibi faktörlerin şikonin türevlerinin üretimine olan etkilerini incelemişlerdir. MS ortamında süspansiyon kültürleri oluşturularak iki aşamalı kültür ile çalışmışlardır. Aydınlıkta ve karanlıkta tutulan kültürler karşılaştırıldığında, 14. gün sonunda aydınlıkta şikonin türevlerinin üretimi 0.06 µg/g iken karanlık inkübasyonda bu değer 540.02 µg/g'a ulaşmıştır. Sıcaklığın şikonin türevlerinin üretimine olan etkisi 20, 25 ve 30°C ortamda geliştirilen kültürlerde incelenmiştir. 20°C'de bulunan kültürlerde üretim yavaş olup 14. günde 429.15 µg/g'a ulaşılırken, 12. günde 25°C'de 586.17 µg/g'lık şikonin türevi elde edilebilmiştir. 30°C'de ise 12. günde ancak 50.8 µg/g'lık şikonin üretimi sağlanabilmiştir. Karbon kaynağı olarak kullanılan sakarozun etkileri ise kültürlerde % 0, 3, 6, 9 ve 12'lik oranlarda kullanılmaları ile değerlendirilmiştir. % 6'lık sakaroz içeriğinin şikonin üretiminde en iyi değeri verdiği görülmüştür (656.14 µg/g). Şikonin türevlerinin üretimine pH'nın etkisi kültürlerin 5 ile 9.5 arasında 0.75 aralıklarla değişen pH değerlerinde hazırlanıp inkübe edilmeleriyle incelenmiştir. Burada en iyi pigment üretimi pH=8.75-9.5'de görülürken en iyi hücre biyokütlesinin pH=5.75'de olduğu belirlenmiştir. 25°C sıcaklık, % 6 sakaroz içeriği ve alkali pH değerlerine sahip ve karanlıkta inkübe edilen kültürlerde iyi sonuçlar alındığını belirlemişlerdir (84).

Tez çalışması kapsamında da çeşitli pH değerlerinde (2, 4, 5, 6, 7, 8 ve 10) MS ortamlarında hazırlanan kallus ve süspansiyon kültürleri 28 gün boyunca 25°C'de karanlıkta inkübe edilerek izlenmiştir. Sonuç olarak farklı renk ve ağırlıklarda hücreler elde edilmiş ancak kırmızı renklenme gözlenmemiştir (Şekil 5.8, 5.9).

Bu çalışmada kullanılan sakaroz oranı; MS ve M9 ortamlarında % 3 iken, M10 ortamında % 5'tir. Süspansiyon kültürlerinde inokulum miktarları da farklılıklar göstermiştir. Büyüme eğrisi oluşturulurken 25 mL'lik MS ortamına 2 g kallus inoküle edilirken (80 mg/mL=% 8), ileriki aşamalarda şikonin üretimi amacıyla kurulan kültürlerde 60 mL'lik MS, M9 ve M10 ortamlarına 4'er g kallus transfer edilmesi yeterli olmuştur (66.67 mg/mL).

Fujita vd. (1981), *L. erythrorhizon* ile oluşturuldukları süspansiyon kültürlerinde White ortamı ile birlikte geliştirdikleri M9 ortamını kullanmışlardır. Şikonin ve türevlerinin üretiminde nitrat, fosfat, demir, sülfat ve sakaroz miktarının çok etkili olduğunu belirtmişler ve bu doğrultuda M9 ortamının içeriğinin oluşturmuşlardır (58). Şikonin ve türevlerinin miktarının, M9 ortamında kuru hücrelerin yaklaşık % 12'sini oluştururken White ortamında bu oranın % 2'de kaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca hücre gelişiminin LS ortamında M9 ortamından daha fazla olduğunu, bu durumun da M9 ortamında major bileşenleri oluşturan fosfat, nitrojen ve potasyumun azalmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. M9 ortamı daha sonraki çalışmalarda da kullanılmıştır (16, 49, 92, 89).

Yamamoto vd. (2002), *L. erythrorhizon* bitkisini kullanarak M9 ortamında oluşturdukları süspansiyon kültürlerinde kuru ağırlığın % 10'u kadar şikonin türevleri üretmişlerdir. Şikonin üretiminin; 2,4-D ve NH_4^+ tarafından inhibe edilirken Cu^{2+} tarafından uyarıldığını belirtmişlerdir (49). Touno vd (2000), KIN'in şikonin üretiminde indükleyici rol oynadığını tespit etmişlerdir (18). Bu çalışmada da 2,4-D'nin kullanıldığı SH ve LS ortamlarında renklenme görülmezken içeriğinde KIN ve IAA bulunduran MS ve B5 ortamlarında renklenme gözlenmiştir. Ancak bu renklenmeler transfer edildikleri ortamlarda varlıklarını sürdürmemişlerdir. Yine şikonin üretme amaçlı olarak kullanılan M9 ve M10 ortamlarında sırasıyla IAA ve KIN bulunmaktadır. Bu çalışmada da M10 ortamı kullanarak oluşturulan BK-4 reaktörlerinde hücre kuru ağırlığının % 2.093'ü kadar şikonin ve alkannin üretilmiştir.

Ge vd. (2006), *Arnebia euchroma* kullanarak ile oluşturdukları iki aşamalı kültürlerde hücreleri 20 gün süre ile LS ortamında tutmuşlar ardından şikonin sentezini arttırmak amacıyla M10 ortama transfer etmişlerdir (93).

Bu çalışmada da MS ortamında elde edilen kalluslar en iyi yanıt alınan ortamlar olan M9 ve M10 ortamlarında kurulan süspansiyon kültürlerine transfer edilmişlerdir. Kültürlerdeki kütle büyüme indeksleri ve pigment üretimleri incelenmiştir. 50 gün süre ile oluşturulan kültürlerde 5., 10., 15., 20. ve 50. günlerde belirlenen KBİ değerlerinin, M9 ortamında 3.83 ile 4.09 arasında değişirken, M10 ortamında 1.45-3.98 aralığında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 5.19). En iyi renklenmenin olduğu günler M9 ortamında 20., M10 ortamında ise 50. gün olup bu günlerdeki KBİ değerleri sırasıyla 4.09 ve 3.29'dur (Şekil 5.14, Çizelge 5.14, Çizelge 5.19). Ortamlardaki yaş ağırlık/kuru ağırlık oranları (g/g) karşılaştırıldığında,

M9 ortamında bu oran 17.82-41.9 arasında değişirken, M10 ortamında bu değer 9.6-25.76 arasında değiştiği, MS ortamında ise 16.79-34.08 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.14).

6.4. Biyoreaktörler ile İlgili Tartışma

Syklowska-Baranek vd. (2008), *Lithospermum canescens*'in 2 adet saçak kök hattında şikonin üretiminde LS ve M9 ortamlarının etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında 3 L hacimli reaktörlerde oluşturulan kültürlerde 4. hafta sonunda M9 ortamında maksimum 6.17 mg/L asetilşikonin ve izobütirilşikonin üretimi gerçekleştirmişlerdir (92).

Fujita (1988), *L. erythrorhizon* bitkisinde protoplast seçimi ile şikonin üretim potansiyeli yüksek olan hücre hatları oluşturmuştur. Bu çalışmada 2 farklı iki aşamalı kültür oluşturulmuş, ilkinde LS ve White ortamları kullanılırken ikincisinde kendi geliştirdikleri hücre gelişim ortamı olan MG-5'i ve M9 ortamları kullanılmıştır. Burada LS ve MG-5 ortamları hücre gelişimi için ilk aşamada, White ve M9 ortamları ise şikonin üretme amacıyla 2. aşamada kullanılmıştır. 23 günlük kültür periyodunun sonunda MG-5 ve M9 ortamlarının kullanıldığı kültürlerde LS ve White ortamlarındakinden 12.66 kat daha fazla üretim gerçekleştirilmiştir (251).

Bu tez çalışmasında da iki aşamalı kültürler kullanılmış, MS ortamında geliştirilen kalluslar M10 ortamına transfer edilmiş ve bu hücrelerden şikonin ve türevlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir.

Malik vd. (2011) süspansiyon kültürlerinde çalışmışlar ve şikonin türevlerinin *in vitro* üretimi için optimize ettikleri şartların biyoreaktörlerde büyük ölçekli üretimlerde de kullanılabilceğini belirtmişlerdir (84). Tez kapsamında da, bu çalışma göz önünde bulundurularak 5.75 - 9.50 arasında değişen 5 farklı pH kullanılmış ve 8.75 pH değerinde optimum gelişme sağlanmıştır. Bunun dışında sistemlere inoküle edilen hücre miktarlarında da değişimler yapılmıştır (0.1-0.2 g/mL).

Gupta vd. (2013) Hindistan'da yetişen bir *Arnebia* türünde süspansiyon kültürleri ve karıştırmalı tank ve air lift biyoreaktörler ile şikonin üretimini arttırmaya çalışmışlardır. Büyüme düzenleyiciler, ışık, pH, ortam bileşenleri gibi pek çok faktörün şikonin üretimine

olan etkisini incelemişlerdir. 3.75, 5.75, 7.75 ve 9.75 değerlerinde 4 farklı pH değeri kullanmışlardır. Büyüme ortamında asidik, pigment üretim ortamında ise alkali pH'ın avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. En uygun pH değerlerinin MS ortamında 5.75, M9 ortamında 9.75 olduğu belirlenmiştir. M9 ortamının bileşimindeki tuzların şikonin üretimine etkisi incelendiğinde; en fazla $\text{Ca}(\text{NO}_3)_3$ 'ün etkisinin bulunduğu Na_2SO_4 tuzlarının yokluğunda ise üretimi çok fazla etkilemediği tespit edilmiştir (252).

Bu tez çalışmasında biyoreaktör denemeleri, MS ortamında gelişen kök kallus hatlarından alınan kallusların, M9 ve M10 ortamlarına transfer edilmesi ile kurulmuştur. Nitel olarak iyi yanıt alınamayan M9 ortamı ilk deneme sonrasında kullanılmazken, M10 ortamında pek çok modifikasyon yapılmış ve birçok deneme yapılarak optimum şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. En iyi içeriğe sahip ortamlara (40 ve 60 g sakaroz, 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L IAA, 0.1 mg/L askorbik asit içeren, pH:8.75 olan 400 mL hacimli M10 ortamı) % 10 ve 15 oranlarında kallus inoküle edilmesiyle maksimum düzeyde renklenme gözlenmiştir. 25 gün süre ile izlenen sistemlerde en iyi renk oluşumunun 20. ve 25. günlerde olduğu görülmüştür. Şikonin ve türevleri, hücre dışına salınarak sıvı ortama geçtiklerinden ortamlarda da yoğun renklenmeler gözlenmiştir. Bu nedenle 20. ve 25. günlerde hücreler ve gelişme ortamları süzülme suretiyle birbirlerinden ayrılarak ekstraksiyona tabi tutulmalarının ardından analiz edilmiştir (Şekil 5.17, Çizelge 5.16).

% 10 ve % 15 oranında kallus içeren biyoreaktör sistemlerinin, gerek hücre ağırlıklarının ve ortam hacimlerinin değişimlerinin, gerekse hücre ve ortamlardaki renk değişiklikleri bakımından paralellik gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 5.18, Çizelge 5.16, 5.20). %10 oranında kallus inoküle edilen biyoreaktör sistemlerinde 20. ve 25. günlerde belirlenen KBİ değerleri 1.443 ve 0.197 olup, % 15 oranında kallus inoküle edilen biyoreaktör sistemlerinde ise sırasıyla 1.236 ve 0.934'dür (Çizelge 5.20). Her iki sistemde de 20. günlerde KBİ değerinin 25. günden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ortamlarda gelişen hücrelerin yaş ağırlık/kuru ağırlık oranları ise BK-1'de 11.18, BK-2'de 7.95, BK-3'de 9.77 ve BK-4'de 10.87'dir.

6.5. *In vitro* Üretilen Sekonder Metabolit Miktarları ile İlgili Tartışma

6.5.1. Kalluslarda Üretilen Sekonder Metabolitler

A. densiflora'da kök eksplantları kullanılarak oluşturulan kallus kültürlerinde, 10. ve 50. günler arasında 5 günde bir alınan hücreler ekstre edildi ve sekonder metabolit varlığı önce İTK ile kalitatif olarak gözlenmiştir. İki farklı solvan sisteminin kullanıldığı analizlerde, plaklarda şikonin ve türevleri gün ışığında net olarak görüntülenmiştir (Şekil 5.19-5.20).

M9 ortamında gelişen ve hasat edilen hücrelerin ekstrelerine ait S1 solvan sistemindeki kromatogramlarda; 10., 15. ve 20. gün numunelerinde tek leke gözlenirken 25. günden sonra leke sayısı arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.19). S1 solvan sisteminde yürütülen M10 ortamından ayrılan hücrelerin ekstrelerine ait kromatogramlarda ise, 10. günde tek leke olarak gözlenen şikonin ve türevlerinin sayılarının 15. günden itibaren arttıkları, 25.-50. günler arasında çok yoğun oldukları gözlenmiştir (Şekil 5.20). Hücrelerden elde edilen ekstrelerdeki leke sayısının, *A. densiflora* kök kısımları ekstrelerindeki kadarından sayıca daha fazla olduğu belirlenmiştir. Hidrolize edilen ekstrelerde şikonin tek leke olarak belirlenmiştir (Şekil 5.27).

Kantitatif analizlerde öncelikle spektrofotometrede şikonin/alkannin ardından RP-HPLC ile serbest asetilalkannin ve şikonin miktarları ile toplam şikonin miktarları tespit edilmiştir. Örneklerin hidroliz edilmelerinin ardından kiral kolon kullanılarak yapılan HPLC analizleri ile ise alkannin ve şikonin ayrımı gerçekleştirilerek miktarları belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, *in vitro* olarak yapılan tüm çalışmalarda M10 ortamının, sekonder metabolit üretimine M9 ortamından daha iyi yanıt verdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.11-5.14, 5.18-5.19, 5.21, 5.22, 5.24, 5.25; Şekil 5.10-5.15, 5.19, 5.20, 5.22, 5.23).

Kallus kültürlerinde şikonin üretimi M9 ortamında ilk olarak 15. günde belirlenirken M10 ortamında 10. günde tespit edilmiştir. Kallus kültürlerinde naftokinon üretimi M10 ortamında 10. günde başlayıp, 20. günde belirgin olarak yükselmiş, 40. günde ise en yüksek seviyeye ulaşmıştır. M9 ortamında ise 15. günde başlayıp, 25. günde kaydadeğer bir yükselme göstermiş, 45. günde ise en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Şikonin ve türevlerinin miktarları, M9 ve M10 ortamının her ikisinde de en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra az

oranda düşme belirlenmiştir (Çizelge 5.18, 5.24, Şekil 5.52).

Kallus kültürlerinde, en yüksek şikonin türevi üretimi, M10 ortamında geliştirilen ve 40. gün kallus kültürlerine ait ekstrelerde belirlenmiştir. Bu değer, spektrofotometrede % 2.092 olduğu, 45. günde 1.96'ya düştüğü, 50. günde ise 2.04'e çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 5.18).

Bozan ve arkadaşlarının *A. densiflora* köklerinde yaptıkları HPLC çalışmasında (1997); β,β -dimetilakrilalkannin, terakrilalkannin, izovalerilalkannin ve α -metil-n-bütillalkannin naftokinonları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasın kapsamında da, asetilalkannin (14.33 dk) belirlenmiştir (237) (Şekil 5.32).

RP-HPLC analizleri doğrultusunda, kallus kültürlerinde üretilen ve bitkide bulunan şikonin türevleri karşılaştırıldığında; *in vitro* kültürlerin ekstrelerinde en fazla miktarda bulunan şikonin türevinin asetil türevi olduğu belirlenirken (Şekil 5.35), *A. densiflora* kök kabuklarında ise asetilalkannin ikinci sırada yer almıştır (Şekil 5.34). M10 ortamında 40. günde gelişen kallus kültürü ekstrelerinin (K-M10 40) HPLC kromatogramında asetilalkanninin diğer şikonin türevlerine oranla çok daha fazla bulunduğu (% 1.227) tespit edilmiştir (Şekil 5.35, Çizelge 5.21). Bu ekstrede bulunan toplam şikonin miktarının ise % 1.646 (16.459 mg/L) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.21).

Ikeda vd. (1991)'ın çalışmalarında ticari şikoninlerde ve çeşitli Boraginaceae bitkilerinde; alkannin ve şikonin enantiyomerlerinin karışım halinde çeşitli oranlarda buldukları belirtilmiştir. Bu araştırmada, çalışılan 3 ticari şikonin standardında şikonin:alkannin oranlarının 62:38 (Wako Pure), 72.9:27.1 (Ichimaru Pharcos), 16.6:83.4 (Funakoshi Pharmaceuticals) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Burada üçüncü şikonin standardında, şikoninden çok alkannin bulunduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde ticari alkannin standardında (Funakoshi Pharmaceuticals) da şikonin:alkannin oranı 93.1:6.9 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ticari şikonin standardının (Chromadex, CA. USA) kiral kolon kullanılarak yapılan HPLC analizinde şikonin:alkannin oranının 11.79:88.21 olduğu belirlenmiştir (28).

Yine bu çalışmada farklı bölgelerden toplanan bitki köklerinde ve bir kallusta şikonin:alkannin oranı incelenmiştir. Burada Japonya ve Çin'de yetişen 5 adet bitkide

şikonin:alkannin oranınının değişkenlik gösterdiği ancak 4 tanesinde şikonin oranının alkanninden fazla olduğunu belirlemişlerdir. Çin'den toplanan *Arnebia euchroma* bitkisinde ise şikonin:alkannin oranınının 2.6:97.4 olduğu, Yunanistan ve Türkiye orijinli *Alkanna tinctoria* örneklerinde ise bu oranın sırasıyla 3.1:96.9 ve 1.0:99.0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.12). Bu tez çalışmasında da, *A. densiflora* köklerinde şikonin:alkannin oranınının 1.51:98.49 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.24).

A. densiflora kök kabuklarında köklerine kıyasla çok daha fazla şikonin/alkannin türevi bulunmaktadır. Bitkinin kök kabuklarında bulunan alkannin (% 16.156) miktarı şikonine (% 0.346) göre fazla olup, bu oran 46.73'dür (Çizelge 5.24, Şekil 5.51). Belirlenen alkannin ve şikoninin toplam miktarı, Yeşilada vd. (1996) tarafından yapılan çalışmadaki değer (% 16.83) ile yakınlık göstermektedir. Ancak bu çalışmada *A. densiflora* olduğunu düşündükleri bitkinin kök kabuklarındaki şikonin miktarının alkannine göre yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Bizim bulgularımıza göre ise bitkide alkannin miktarının şikonine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ikeda vd (1991), çalışmalarında hem ters faz hem de normal faz HPLC kullanmışlardır. Hidroliz ettikleri ticari şikonin örneğinin RP-HPLC'de izomerleri ayrılmamış ve aynı alıkonma zamanında (5.54. dk) görülmüş, normal faz kiral kolonda ise ayrılan izomerlerden şikonin 14.44., alkannin ise 20.54. dk'da tespit edilmiştir (28). Yeşilada ve arkadaşlarının çalışmalarında (1996) ise ters faz HPLC'de 4.69.-5.12. dkda tek pik olarak görülen madde Chiracel-OD kiral kolon kullanılmasıyla ayrılmış ve şikonin 22.4-24.5. dk'da alkannin ise 28-30.8. dk'da gözlenmiştir (12).

Bu çalışma kapsamında, hidrolize edilen numunelerdeki şikonin RP-HPLC'de 9.01-9.16. dk'da belirlenmiş, normal faz ile izomerlerin ayrılmasında ise Ikeda ve arkadaşlarının yöntemi (1991) kullanılıp, şikonin 12.3-12.5., alkannin ise 16.1-16.9. dk'da tespit edilmiştir. Bu analiz ile bitkinin kabukları ile birlikte alınan köklerinin ekstrelerinde sırasıyla % 0.2474 ve 7.7706 olan % şikonin ve alkannin miktarlarının, kabuk kısımlarındaki değerlerinin % 0.3457 ve 16.156 oldukları belirlenmiştir. Kalluslarda ise en yüksek şikonin ve alkannin içeriğinin % 0.1709 ve 0.6667 ile K-M10 40 örneklerinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.24). Bitkinin köklerinde bulunan şikonin ve asetil şikonin miktarları % 0.64 ve 0.030; kök+kabuklarda % 5.03 ve 3.249; kabuklarda ise % 13.78 ve 4.71 olarak bulundu.

6.5.2. Süspansiyon Kültürlerinde Üretilen Sekonder Metabolitler

Fungal uyarıcıların (*R. stolonifer* ve *A. niger*) şikonin biyosentez yolağında bulunan rozmarinik asitin sentezini de uyardıkları bildirildiğinden fungal uyarıcı uygulanan süspansiyonlarda şikonin ve türevlerinin yanında rozmarinik asitin varlığı da araştırıldı. İTK analizleri sonucunda; kontrol süspansiyonlarında, elisitör uygulananlara göre daha fazla rozmarinik asit ve şikonin türevi oluşumu tespit edildi (Şekil 5.24).

M9 ve M10 ortamlarının kullanıldığı süspansiyon kültürlerinde gelişen hücrelerde bulunan şikonin ve türevlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan İTK analizlerinde, gün ışığında 15. günden itibaren şikonin varlığı gözlenirken ayrıca S-M9 20, S-M10 20 ve S-M10 50'de asetilalkannin ve β,β -dimetilakrilalkannin belirlenmiştir (Şekil 5.23).

Süspansiyon kültürlerinde; M9 ortamında 10. günde şikonin ve türevlerinin varlığı saptanmazken M10 ortamında belirlenmiştir. Pigment üretiminde her iki ortamda da 20. günde iyi seviyeye ulaşılmış, M10 ortamında 20. günden sonra çok az düzeyde yükselme belirlenmiştir (Çizelge 5.19).

Süspansiyon kültürü numunelerinin kantitatif analizleri neticesinde (spektrofotometrik, RP-HPLC ve normal faz HPLC) şikonin ve türevlerinin oluşumunun en fazla 50. günde olduğu görülmüştür. M10 ortamında oluşturulan süspansiyon kültürlerinde 50 günde gelişen hücrelerin ekstralarında spektrofotometrede 166.00 mg/L şikonin belirlenmiştir (Çizelge 5.19). Bu numunenin RP-HPLC analizi sonucunda belirlenen toplam şikonin miktarının 54.61 mg/L olduğu ve bunun 11.23 mg/L'sini asetilalkanninin, 0.053 mg/L'sini ise serbest şikoninin oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.22). Kiral kolonla yapılan HPLC analizleri sonucunda ise 50. günde üretilen şikonin ve alkannin miktarlarının ise sırasıyla 7.814 mg/L ve 19.022 mg/L oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 5.25). Süspansiyon kültürlerinde S-M9 15 ve S-M10 15 ekstraları dışında alkannin oranının şikoninden yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.25, Şekil 5.53).

Süspansiyon kültürlerinde 20. günde ise spektrofotometrede 156.14 mg/L şikonin belirlenmiştir (Çizelge 5.19). Bu numunede bulunan toplam şikonin miktarının 52.21 mg/L olduğu RP-HPLC ile belirlenmiştir (Çizelge 5.22). Kiral kolonla yapılan HPLC analizleri

sonucunda ise 20. günde 17.226 mg/L alkannin ve 7.746 mg/L şikonin üretildiği belirlenmiştir (Çizelge 5.25, Şekil 5.53).

6.5.3. Biyoreaktörlerde Üretilen Sekonder Metabolitler

Kurulan biyoreaktör sistemlerinde ekstraselüler ve intraselüler kısımlarda üretilen şikonin türevlerinin ve miktarlarının farklılıklar gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 5.23, Şekil 5.38, 5.56). % 15 oranında kallus inoküle edilen M10 ortamında 25 gün süre ile gelişen biyoreaktör sistemlerindeki hücrelerde (BK-4) ve sıvı ortamda (BS-4) bulunan şikonin ve türevlerine ait HPLC kromatogramında pik sayılarında ve yüksekliklerinde farklılıklar bulunduğu ancak her ikisinde de şikonin türevlerinden en fazla asetil türevinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.38).

Biyoreaktörlere ait numunelerin kantitatif analizleri neticesinde (spektrofotometrik, RP-HPLC ve normal faz HPLC) en yüksek şikonin ve türevlerinin BK-4 örneğinde bulunduğu görülmüştür. Bu değer spektrofotometrede 207.71 mg/L olup, bu sistemin ortamına geçen BS-4 örneğinde ise 5.714 mg/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.20). BK-4 numunesinin, RP-HPLC analizi sonucunda asetilalkannin miktarı 59.475 mg/L, toplam şikonin miktarı ise 110.99 mg/L olarak bulunmuştur (Çizelge 5.23). Bu numunenin şikonin ve alkannin miktarlarının ise sırasıyla 20.258 mg/L ve 47.183 olduğu HPLC’de kiral kolon ile tespit edilmiştir (Çizelge 5.26). Ayrıca numunede en çok bulunan şikonin türevinin asetil türevi olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.42).

40 g kallus içeren biyoreaktörlerde hem intraselüler hem de ekstraselular olarak üretilen şikonin ve alkannin miktarlarının, 20. günde 25. gün değerlerinden daha yüksek oldukları belirlenmiştir. 60 g kallus içeren sistemlerde; 20. günde ayrılan hücrelerdeki naftokinon içeriği 25. günde ayrılanlardan düşük bulunurken, ortama salınan sıvılarda tersi bir durum söz konusu olmuştur.

Sim ve Chang (1993), SH ortamında *L. erythrorhizon* saçak kök kültürlerinde n-hekzadekan ile yapılan *in situ* ekstraksiyonla 3 kat fazla şikonin üretimini sağladıktan sonra bunları iki fazlı biyoreaktöre transfer etmişler ve sonuçta günlük düzenli olarak 10.6 mg/L şikonin üretmişlerdir. Bu çalışma ile 54 gün sonunda 15.6 g/L kuru hücre kütlesi sağlanırken

572.6 mg/L şikonin üretiminin gerçekleştiği spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir (87).

A. euchroma, periyodik olarak daldırma sistemli air lift biyoreaktörlerde kültüre alınmış, daldırmalı (süspansiyon) ve daldırmasız (immobilize) kültürler karşılaştırılmıştır. Periyodik daldırma sistemli air lift biyoreaktörler, süspansiyon kültürleri ile karşılaştırıldığında; hücre büyümesi, şikonin içeriği, şikonin üretimi ve hücre agregasyonunun geliştirilmesi bakımından daha avantajlı oldukları belirtilmiştir. Bu sistemlerde optimum şartlarda (daldırmalı periyodun daldırmasız periyoda olan oranı 10 dk/15 saat) elde edilen şikonin içeriğinin % 4.6 ve hücre kuru ağırlığının ise 16.8 g/L olduğu ve bu değerlerin de süspansiyon kültürlerinden % 26 oranında daha yüksek oldukları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (93).

Bu çalışma ile de, kısa zamanda şikonin üretilmesinde, reaktör sistemlerinin süspansiyon kültürlerine tercih edilebileceği belirlenmiştir. En yüksek şikonin üretimlerinin gerçekleştiği kültürler incelendiğinde, süspansiyon kültürlerinde 50 gün sonunda 166.0 mg/L şikonin üretilirken; biyoreaktörlerde 25. günde 213.42 mg/L şikonin üretildiği spektrofotometrik ölçümler sonucunda tespit edildi. BK-4 numunelerinde; 12.875 g/L olan hücre kuru ağırlığının şikonin içeriği % 1.25 olarak belirlenmiştir.

Gupta vd. (2013) Hindistan'da yetişen bir *Arnebia* türünde süspansiyon kültürleri ve biyoreaktörler ile şikonin üretimini arttırmaya çalışmışlardır. Burada gelişme ortamı olarak MS, pigment üretim ortamı olarak M9 ortamını kullanmışlardır. Süspansiyon kültürü ile karıştırılmalı tank ve air lift biyoreaktörlerin kullanıldığı çalışmada 12 gün sonunda 2 L hacimli sistemlerde sırasıyla 9.7, 21.15 ve 25.5 µg/mL şikonin üretiminin gerçekleştirildiği spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (252).

Hu vd. (2006), HPLC-DAD ile gradient yöntemle Çin'in farklı alanlarından toplanan ve Zicao olarak bilinen türler olan *A. euchroma*, *A. guttata*, *L. erythrorhizon* ve 6 *Onosma* türünde çalışmışlardır. Üzerinde en çok çalışılan türler olan *A. euchroma* ve *L. erythrorhizon*'da diğer 7 türe oranla daha fazla şikonin türevi bulunmuştur. İki türde de 8 şikonin türevinden en fazla asetilşikonin bulunduğu belirlenmiştir (218). *A. euchroma* ve *L. erythrorhizon*'da sırasıyla 19.7 ve 7.49 mg/g olan bu değerlerin *A.densiflora*'nın asetilşikonin içeriğinin (47.07 mg/g) çok altında kaldığı görülmektedir.

6.6. Sonuç

Bitkide bulunan ve *in vitro* kültürlerde üretilen içeriklerin bulunduğu çizelgeler incelendiğinde; bitki kök kabuklarının sahip olduğu şikonin miktarlarının kallus kültürlerinde elde edilen % miktarlara göre yüksek olduğu görülebilmektedir (Çizelge 5.21). Tespit edilen bu değerlerin bitki yolu ile üretilmesi için ortalama 5-7 yıl gibi bir zaman geçmesi gerektiği buna karşılık, *in vitro* kültürlerde bu değerlerin 20-40 günlük sürelerde sağlanabildiği düşünüldüğünde doku kültürü tekniği kullanımının ne kadar avantajlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca süspansiyon kültürlerinde ve biyoreaktörlerde üretilen şikonin ve alkannin miktarlarının, bitkinin en fazla naftokinon içeriğine sahip kısımları olan kök kabuklarındaki miktarları ile kıyaslandığında bu yöntemlerin etkinliği daha da göze çarpmaktadır. *In vitro* kültürlerde üretilen şikonin miktarı incelendiğinde en iyi sonucun BK-4 biyoreaktör sistemlerinden alındığı ve miktarının 213.42 mg/L olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler çalışmanın hedeflendiği doğrultuda gerçekleştiğini, biyoreaktörlerde iyi düzeyde üretimin sağlanabildiğini göstermektedir. Çalışmanın bundan sonraki araştırmalar için örnek olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, bölgesel endemik bir tür olan *A. densiflora*'dan, doku kültürü teknikleri kullanılarak şikonin ve türevlerinin üretimi ile ilgili olarak yapılan ilk çalışma olup, ülkemiz kaynaklarının kullanımını açısından önem teşkil etmektedir. *A. densiflora* gibi Anadolu'da bulunan ve pek çok tıbbi değeri olan bitkiler üzerinde yapılan fitokimyasal ve farmakolojik çalışmaların artırılarak bu bitkilerin etken maddelerinin izole edilmesi, yeterli miktarda üretilmesi, tedavi ve ticari alanda kullanılabilmesi sağlanmalıdır. Artan talepler doğrultusunda kullanılacak olan bu etken maddelerin bitkinin habitatına zarar vermeden biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi ile ülke ekonomisine katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Davis PH. Flora of Turkey and East Aegean Islands.Vol 6. Edinburgh: Edinburg University Press; 1978.p. 311-313.
2. Kırimer N, Bozan B, Başer KHC. A. densiflora'dan Naftokinonların İzolasyonu ve Yapı Tayini. In: Başer KHC, ed. 9.BİHAT Bildiri Kitabı Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi; 1992.
3. Papageorgiou VP. Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctoria*. *Experientia*. 1978 Nov 15;**34**(11):1499-1501.
4. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Samanidou VF, Papadoyannis I. Analytical methods for the determination of alkanins and shikonins. *Current Organic Chemistry*. 2006;**10**(5):583-622.
5. Papageorgiou VP. Naturally occurring Isohexenylnaphthazarin pigments: A new class of drugs. *Planta Medica*. 1980;**38**(3):193.
6. Brigham LA, Michaels PJ, Flores HE. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol*. 1999;**119**(2):417-428.
7. Gao D, Kakuma M, Oka S, Sugino K, Sakurai H. Reaction of beta-alkannin (shikonin) with reactive oxygen species: detection of beta-alkannin free radicals. *Bioorg Med Chem*. 2000 Nov;**8**(11):2561-2569.
8. Karyagina TB, Arzumanyan VG, Timchenko TV and Bairamashvili DI. Antimicrobial Activity of Shikonin Preparations *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2001 Aug;**35**(8):435-6.
9. Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull*. May 2002;**25**(5):669-670.
10. Lee HJ, Lee HJ, Magesh V, et al. Shikonin, acetylshikonin, and isobutyroylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*. Nov 2008;**128**(11):1681-1688.
11. Kırimer N, Çingi Mİ, Alpan S, Gez S, Bozan B, Başer KHC. *Arnebia densiflora*'nın Toksikite ve Farmakolojik Etki Yönünden Araştırılması. In: Başer KHC, ed. 9.BİHAT Bildiri Kitabı Eskişehir. Anadolu Üniversitesi Basımevi; 1992.
12. Yesilada E, Aslan M, Sezik E, Yesilada A. Quantitative analysis of the enantiomeric naphthaquinone derivatives from Boraginaceous roots by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 1996;**19**(20):3369-3381.
13. Boehm R, Sommer S, Li SM, Heide L. Genetic engineering on shikonin biosynthesis: expression of the bacterial ubiA gene in *Lithospermum erythrorhizon* *Plant Cell Physiol*. 2000 Aug;**41**(8):911-919.

14. Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N, Konoshima M. Pigment formation in callus cultures of *L. erythrorhizon*. Phytochemistry. 1974 Jun;**13**(6):927-932.
15. Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. Variation in pigment production in *L. erythrorhizon* callus cultures. Phytochemistry. 1978;**17**(1):95-97.
16. Kim DJ, Chang HN. Effect of Growth hormone Modification on Shikonin Production from *Lithospermum erythrorhizon* Cell Cultures with *in situ* Extraction. Biotechnology Letters. 1990 Apr;**12**(4):289-294.
17. Sim SJ, Kim DJ, Chang HN. Shikonin Production by Extractive Cultivation in Transformed-suspension and Hairy Root Cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994 Nov 30;**745**:442-454.
18. Touno K, Harada K, Yoshimatsu K, Yazaki K, Shimamura K. Shikonin Derivative Formation on the Stem of Cultured Shoots in *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Report. Nov 14 2000;**19**(11):1121-1126.
19. Ye HC, Yin ZH, Li GF, Wu X, Dong JW, Wu ZR. Effects of physical and chemical factors on callus growth and shikonin derivative formation in the callus cultures of *Arnebia euchroma*. Acta Botanica Sinica. 1991;**33**(12):927-931.
20. Yüzbaşıoğlu M. *Arnebia purpurea* S. Erik & H. Sümbül Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Programı, Hacettepe Üniversitesi; 2010.
21. Sümbül SEH. *Arnebia purpurea* P. H. Davis, Mill R.R. ve Tan K. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Cilt 10) Edinburgh: Edinburgh University Press; 1988.
22. Bozan B. *Arnebia densiflora*'dan naftokinonların izolasyonu ve yapı tayini: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi; 1990.
23. Aktan Y. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. kök ekstresinin antiinflamatuvar, analjezik, yara iyileştirici ve karaciğer üzerine olan etkileri: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 1994.
24. Bozan B, Kara S, Başer KHC. *Arnebia densiflora* Bitkisinden Elde Edilen Naftokinonların Gıda, Kozmetik ve İlaç Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. In: M. C, ed. 11.BİHAT, Bildiri Kitabı Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1997.
25. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. Angewandte Chemie International Edition. 1999;**38**(3):270-301.
26. Sevimli Gür C. Bazı Alkanna Türlerinin Biyoaktivite Rehberli İzolasyon Yöntemi Kullanarak Çeşitli Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin *In Vitro* Ortamlarda Taranarak, Hücresel Mekanizmalara ve Apoptoz Yolaklarına Olan Etkilerinin Araştırılması [Doktora Tezi]: Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2009.

27. Wang R, Yin R, Zhou W, Xu D, Li S. Shikonin and its derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012 Sep;**22**(9):977-997.
28. Ikeda Y, Ishida N, Fukaya C, et al. Determination of the ratio between optical isomers, shikonin and alkannin by high performance liquid chromatography analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 1991;**39**(9):2351-2352.
29. Albrecht A, Vovk I, Simonovska B, M. S. Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L. *Journal of Chromatography A.* 2009 Apr 10;**1216**(15):3156-3162.
30. Gaisser S, Heide L. Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. *Phytochemistry.* 1996 Mar;**41**(4):1065–1072.
31. Köhle A, Sommer S, Yazaki K, et al. High level expression of chorismate pyruvate-lyase (UbiC) and HMG-CoA reductase in hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Physiol.* 2002 Aug;**43**(8):894-902.
32. Chen X, Yang L, Zhang N, et al. Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine, Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003;**47**(9):2810-2816.
33. Mann J. Chemical Aspects of Biosynthesis, Oxford Chemistry Primers. In: S.G. D, ed. Vol 20. Oxford: Oxford University Press; 1994.
34. Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Naliwajski MR, et al. Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2012 Oct;**48**(5):555-564.
35. Wu SJ, Qi JL, Zhang WJ, et al. Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Physiol.* Jan 2009;**50**(1):118-128.
36. Okamoto T, Yazaki K, Tabata M. Biosynthesis of shikonin derivatives from l-phenylalanine via deoxyshikonin in *Lithospermum* cell-cultures and cell-free-extracts. *Phytochemistry.* 1995;**38**:83-88.
37. Heide L, Berger U. Partial purification and properties of geranyl pyrophosphate synthase from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Arch Biochem Biophys.* 1989 **Sep**;273(2):331-338.
38. Heide L, Tabata M. Enzyme activities in cell-free extracts of shikonin-producing *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Phytochemistry.* 1987;**26**(6):1645-1650.
39. Boehm R, Li S-M, Melzer M., Heide L. 4-Hydroxybenzoate Prenyltransferases in Cell-Free Extracts of *Lithospermum erythrorhizon* Cell Cultures. *Phytochemistry.* 1997 Feb; **44**(3):419-424.

40. Tabata M, Yazaki K, Nishikawa Y, Yoneda F. Inhibition of shikonin biosynthesis by photodegradation products of FMN. *Phytochemistry*. 1993;**32**:1439-1442.
41. Yamaga Y, Nakanishi K, Fukui H, Tabata M. Intracellular-localization of p-hydroxybenzoate geranyl-transferase, a key enzyme involved in shikonin biosynthesis. *Phytochemistry*. 1993;**32**:633-636.
42. Srinivasan V, Ryu DD. Enzyme activity and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 1992 Jun 5;**40**(1):69-74.
43. Srinivasan V, Ryu DD. Improvement of shikonin productivity in *Lithospermum erythrorhizon* cell culture by alternating carbon and nitrogen feeding strategy. *Biotechnol Bioeng*. 1993 Sep 20;**42**(7):793-799.
44. Lange BM, Severin K, Bechthold A, Heide L. Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase for shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Planta*. 1998 Feb;**204**(2):234-241.
45. Mühlenweg A, Melzer M, Li SM, L. H. 4-Hydroxybenzoate 3-geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*: Purification of a plant membrane-bound prenyltransferase. *Planta*. 1998 Jul;**205**(3):407-413.
46. Sommer S, Köhle A, Yazaki K, Shimomura K, Bechthold A, Heide L. Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial UbiC gene. *Plant Mol Biol*. 1999 Mar;**39**(4):683-693.
47. Yamamoto H, Inoue K, K. Y. Caffeic acid oligomers in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Phytochemistry*. 2000;**53**(6):651-657.
48. Georgiev M, Pavlov A, Ilieva M. Selection of high rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell line. *Process Biochemistry*. 2006 Sep;**41**(9):2068-2071.
49. Yamamoto H, Zhao P, Yazaki K, Inoue K. Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2002 Aug;**50**(8):1086-1090.
50. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları; 2002.p.17-249-254.
51. Rajendran L, Suvarnalatha G, Ravishankar GA, Venkataraman LV. Enhancement of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. under the influence of fungal elicitors. *Applied microbiology and biotechnology*. 1994 Nov;**42**(2-3):227-231.
52. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002 May;**20**(2):101-153.

53. Yağcı C. *Gentiana olivieri* Griseb.'de kallus ve süspansiyon kültürlerinde bulunan bazı sekonder metabolitler: Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi; 2011.
54. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962 Jul;**15**(3):473-497.
55. Linsmaier EM, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1965 Jan;**18**(1):100-127.
56. Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 1972;**50**:199-204.
57. Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK. Plant tissue culture media. *In Vitro*. 1976 Jul; **12**(7):473-478.
58. Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant cell reports*. 1981 Dec;**1**(2):61-63.
59. Ge F, Wang X, Zhao B, Wang Y. Effects of rare earth elements on the growth of *Arnebia euchroma* cells and the biosynthesis of shikonin. *Plant growth regulation*. 2006 Mar;**48**(3):283-290.
60. Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vargas VM. 'Radicale' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science*. 1999 Jun;**4**(6):220-226.
61. Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2002 Jan-Feb;**38**(1):1-10.
62. Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*. 2010 Jul 7;**5**(3):222-247.
63. Sasson A. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. *Biotechnology-Economic and Social Aspects: Issues for Developing Countries*. 1992:81-109.
64. School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology web page; [Internet] 2009 Feb 21;. Available from: [www.sith.itb.ac.id/profile/pdf/bt5136/Scale Up Production of shikonin](http://www.sith.itb.ac.id/profile/pdf/bt5136/Scale%20Up%20Production%20of%20shikonin).
65. Hunter CS, Kilby NJ. Betanin Production and Release In Vitro from Suspension Cultures of *Beta vulgaris*. *Methods Mol Biol*. 1990;**6**:545-554.
66. Liu Z, Qi J-L, Chen L, et al. Effect of Light on Gene Expression and Shikonin Formation in Cultured *Onosma paniculatum* Cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006 Jan;**84**(1):38-46.

67. Australian New Crops Web Site web page; [Internet]; 2011 Jun 5; Available from:http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/species_pages_L/lithospermum_erythrorhizon.htm.
68. Tsukada M, Tabata M. Intracellular localization and secretion of naphthoquinone pigments in cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Planta Med.* 1984 Aug;**50**(4):338-341.
69. Yazaki K, Fukui H, Kikuma M, Tabata M. Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant cell reports.* 1987 Apr;**6**(2):131-134.
70. Hara Y, Morimoto T, Fujita Y. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant cell reports.* Feb 1987;**6**(1):8-11.
71. Kim DJ, Chang HN. Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by *in situ* extraction and calcium alginate immobilization. *Biotechnol Bioeng.* 1990 Aug 20;**36**(5):460-466.
72. Bulgakov VP, Kozyrenko MM, Fedoreyev SA, et al. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia.* 2001 May;**72**(4):394-401.
73. Lin L, Wu J. Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnol Bioeng.* 2002 Apr 5;**78**(1):81-88.
74. Ding J, Shi S, Jiang B-H, et al. Effects of Methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 2004;**40**(6):581-585.
75. Hu L. Production of shikonin by cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Zhong Yao Cai.* May 2004;**27**(5):313-314.
76. Touno K, Tamaoka J, Ohashi Y, Shimomura K. Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol Biochem.* 2005 Feb;**43**(2):101-105.
77. Yang Y, Zhang H, Cao R. Effect of Brassinolide on Growth and Shikonin Formation in Cultured *Onosma paniculatum* Cells. *J Plant Growth Regul.* 1999 Oct;**18**(2):89-92.
78. Qi JL, Zhang WJ, Liu SH, et al. Expression analysis of light-regulated genes isolated from a full-length-enriched cDNA library of *Onosma paniculatum* cell cultures. *J Plant Physiol.* 2008 Sep 29;**165**(14):1474-1482.

79. Zare K, Nazemiyeh H, Movafeghi A, et al. Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkanin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2010 Feb;**100**(2):157-164.
80. Zare K, Khosrowshahli M, Nazemiyeh H, Movafeghi A, Azar AM, Omidi Y. Callus culture of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative. Natural product research. 2011 Sep;**25**(16):1480-1487.
81. Fu XQ, Lu DW. Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and in situ extraction in suspension cultures of *A. euchroma*. Enzyme and Microbial Technology. 1999 Apr 1;**24**(5-6):243-246.
82. Poronnik OA, Kunakh VA. Biosynthesis of naphthoquinone pigments in plants from Boraginaceae family in nature and *in vitro* culture. Ukr Biokhim Zh. 2005;**77**(6):24-36.
83. Singh RS, Gara RK, Bhardwaj PK, et al. Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, p-hydroxybenzoate-m-geranyltransferase and genes of phenylpropanoid pathway exhibits positive correlation with shikonins content in *Arnebia* (*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston). BMC Mol Biol. 2010 Nov 21;**11**:88.
84. Malik S, Bhushan S, Sharma M, Singh Ahuja P. Physico-chemical factors influencing the shikonin derivatives production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, a medicinally important plant species. Cell Biol Int. 2011 Feb;**35**(2):153-158.
85. Kurnaz N. *Arnebia densiflora* (Normd.) Ledeb. bitkisinin çeşitli kısımlarından kallus oluşturulması [Yüksek Lisans Tezi]. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi; 2002.
86. Övet B. *Arnebia densiflora* ledeb. Farklı hormon konsantrasyonları içeren MS ortamına yanıtı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi;2003.
87. Sim SJ, Chang HN. Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor. Biotechnology letters. 1993;**152**(2):145-150.
88. Pietrosiuk A, Sykłowska-Baranek K, Wiedenfeld H, Wolinowska R, Furmanowa M, Jaroszyk E. The shikonin derivatives and pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. Plant cell reports. 2006 Oct;**25**(10):1052-1058.
89. Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Gawron A, et al. Enhanced production of antitumour naphthoquinones in transgenic hairy root lines of *Lithospermum canescens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2012 Feb;**108**(2):213-219.

90. Chen YF, Lu WH, Wang F, Ma H, Li JG. Induction and Culture of Hairy Roots from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. 2008;**12**(010).
91. CuiFang L, Fang W, Hao M, XinHua S. Effects of culture medium and temperature on growth of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst hairy roots. Xinjiang Agricultural Sciences. 2009;**46**(5):1117-1120.
92. Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Furmanowa M, Szypuła W, Jeziorek M. Production of shikonin derivatives in transgenic roots of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. cultivated in mist bioreactor. Planta Medica. 2008;**74**(09):PG52.
93. Ge F, Yuan X, Wang X, Zhao B, Wang Y. Cell growth and shikonin production of *Arnebia euchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor. Biotechnol Lett. 2006 Apr;**28**(8):525-529.
94. Mani H, Sidhu GS, Singh AK, et al. Enhancement of wound healing by shikonin analogue 93/637 in normal and impaired healing. Skin Pharmacol Physiol. 2004 Jan-Feb;**17**(1):49-56.
95. Hayashi M. Pharmacological studies of Shikon and Tooki. (3) Effect of topical application of the ether extracts and Shiunko on inflammatory reactions. Nihon Yakurigaku Zasshi. 1977 Mar;**73**(2):205-214.
96. Ozaki Y, Ohno A, Abe K, Saito Y, Satake M. Comparative study on the accelerative effect of "koushikon" and "nanshikon" and their constituents on proliferation of granuloma tissue in rats. Biol Pharm Bull. 1993 Jul;**16**(7):683-685.
97. Ozaki Y, Ohno A, Saito Y, Satake M. Accelerative effect of shikonin, alkannin and acetylshikonin on the proliferation of granulation tissue in rats. Biol Pharm Bull. 1994 Aug;**17**(8):1075-1077.
98. Sakaguchi I, Tsujimura M, Ikeda N, et al. Granulomatous tissue formation of shikon and shikonin by air pouch method. Biol Pharm Bull. 2001 Jun;**24**(6):650-655.
99. Khatoon S, Mehrotra BN, Mehrotra S. Pharmacognostic evaluation of ratanjot-*Arnebia nobilis* Rech. F. Natural Product Sciences. 2003;**9**(4):286-290.
100. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Ballis AC. Alkanins and shikonins: a new class of wound healing agents. Curr Med Chem. 2008;**15**(30):3248-3267.
101. Michaelides C, Striglis C, Panayiotou R, Ioannovich J. The therapeutic action of *Alkania* root extract in the conservative treatment of partial-thickness burn injuries. Ann. Medit. Burns Club. 1993;**6**:1.
102. Karayannopoulou M, Tsioli V, Loukopoulos P, et al. Evaluation of the effectiveness of an ointment based on Alkannins/Shikonins on second intention wound healing in the dog. Can J Vet Res. 2011 Jan;**75**(1):42-48.

103. Hsiao CY, Tsai TH, Chak KF. The molecular basis of wound healing processes induced by *Lithospermi* radix: A proteomics and biochemical analysis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Jul 2012.
104. Sidhu GS, Singh AK, Banaudha KK, Gaddipati JP, Patnaik GK, Maheshwari RK. Arnebin-1 Accelerates Normal and Hydrocortisone-Induced Impaired Wound Healing. Journal of investigative dermatology. 1999;**113**(5):773-781.
105. Akkol EK, Koca U, Pesin I, Yilmazer D, Toker G, Yeşilada E. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. J Ethnopharmacol. 2009;**124**(1):137-141.
106. Köşger H. *Arnebia densiflora* Ledeb. bitkisinden elde edilen ekstrenin yara iyileşmesi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi; 2002.
107. Kim SH, Kang IC, Yoon TJ, et al. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyim-DMNQ-S-33. Cancer letters. 2001;**172**(2):171-175.
108. Lu Q, Liu W, Ding J, Cai J, W. D. Shikonin derivatives: synthesis and inhibition of human telomerase. Bioorg Med Chem Lett. 2002 May 20;**12**(10):1375-1378.
109. Nakaya K, Miyasaka T. A shikonin derivative, beta-hydroxyisovalerylshikonin, is an ATP-non-competitive inhibitor of protein tyrosine kinases. Anticancer Drugs. 2003 Oct;**14**(9):683-693.
110. Singh F, Gao D, Lebwohl MG, Wei H. Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling in human epidermoid carcinoma cells. Cancer Lett. 2003 Oct 28;**200**(2):115-121.
111. Nigorikawa K, Yoshikawa K, Sasaki T, et al. A naphthoquinone derivative, shikonin, has insulin-like actions by inhibiting both phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 and tyrosine phosphatases. Mol Pharmacol. 2006 Sep;**70**(3):1143-1149.
112. Thangapazham RL, Singh AK, Seth P, et al. Shikonin analogue (SA) 93/637 induces apoptosis by activation of caspase-3 in U937 cells. Front Biosci. 2008 Jan 1;**13**:561-568.
113. Komi Y, Suzuki Y, Shimamura M, et al. Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by beta-hydroxyisovalerylshikonin. Cancer Sci. 2009 Feb;**100**(2):269-277.
114. Yang H, Zhou P, Huang H, et al. Shikonin exerts antitumor activity via proteasome inhibition and cell death induction *in vitro* and *in vivo*. International journal of cancer. Journal international du cancer. 2009 May 15;**124**(10):2450-2459.
115. Chen CH, Lin ML, Ong PL, Yang JT. Novel multiple apoptotic mechanism of shikonin in human glioma cells. Ann Surg Oncol. 2012 Sep;**19**(9):3097-3106.

116. Yeh CC, Wu LT, Lin SY, Li TM, Chung JG. The inhibition of N-acetyltransferase activity and gene expression in human bladder cancer cells (T24) by shikonin. *In Vivo*. 2004 Jan-Feb;**18**(1):21-31.
117. Yeh C, C,, Kuo HM, Li TM, et al. Shikonin-induced apoptosis involves caspase-3 activity in a human bladder cancer cell line (T24). *In Vivo*. 2007 Nov-Dec;**21**(6):1011-1019.
118. Guo XP, Zhang XY, Zhang SD. Clinical trial on the effects of shikonin mixture on later stage lung cancer. Zhong xi yi jie he za zhi= Chinese journal of modern developments in traditional medicine/Zhongguo Zhong xi yi jie he yan jiu hui (chou), Zhong yi yan jiu yuan, zhu ban. 1991 Oct;**11**(10):598-599.
119. Hashimoto S, Xu Y, Masuda Y, et al. Beta-hydroxyisovalerylshikonin is a novel and potent inhibitor of protein tyrosine kinases. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Aug;**93**(8):944-951.
120. Lim ES, Rhee YH, Park MK, et al. DMNQ S-64 induces apoptosis via caspase activation and cyclooxygenase-2 inhibition in human nonsmall lung cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jan;**1095**:7-18.
121. Kontogiannopoulos KN, Assimopoulou AN, Dimas K, Papageorgiou VP. Shikonin-loaded liposomes as a new drug delivery system: Physicochemical characterization and *in vitro* cytotoxicity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2011 Jun 8;**113**:1113-1123.
122. Hou Y, Guo T, Wu C, He X, Zhao M. Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis *in vitro* *Yakugaku Zasshi*. 2006 Dec;**126**(12):1383-1386.
123. Zhang Y, Qian RQ, Li PP. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, down-regulates the expression of steroid sulfatase genes in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2009 Oct;**284**(1):47-54.
124. Yao Y, Zhou Q. A novel antiestrogen agent Shikonin inhibits estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 May;**121**(1):233-240.
125. Cui XR, Tsukada M, Suzuki N, et al. Comparison of the cytotoxic activities of naturally occurring hydroxyanthraquinones and hydroxynaphthoquinones. *Eur J Med Chem*. 2008 Jun;**43**(6):1206-1215.
126. Hsu PC, Huang YT, Tsai ML, Wang YJ, Lin JK, Pan MH. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 2004 Oct 6;**52**(20):6330-6337.
127. Fan Y, Jin S, He J, et al. Effect of β,β -Dimethylacrylshikonin on Inhibition of Human Colorectal Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo. *Int J Mol Sci*. 2012;**13**(7):9184-9193.

128. Calonghi N, Pagnotta E, Parolin C, et al. A new EGFR inhibitor induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 9;**354**(2):409-413.
129. Hisa T, Kimura Y, Takada K, Suzuki F, Takigawa M. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Anticancer Res*. 1998 Mar-Apr;**18**(2A):783-790.
130. Wu Z, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells. *J Pharmacol Sci*. 2004;**94**(2):166-176.
131. Mao X, Yu CR, Li WH, Li WX. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. *Cell Res*. 2008 Aug;**18**(8):879-888.
132. Rajasekar S, J. Pd, Park C, et al. In vitro and in vivo anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. *J Ethnopharmacol*. 2012 Nov 21;**144**(2):335-345.
133. Kretschmer N, Rinner B, Deutsch AJ, et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma Cells. *J Nat Prod*. 2012 May 25;**75**(5):865-869.
134. Yang F, Chen Y, Duan W, Zhang C, Zhu H, Ding J. SH-7, a new synthesized shikonin derivative, exerting its potent antitumor activities as a topoisomerase inhibitor. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2006 Sep 1;**119**(5):1184-1193.
135. Yoon Y, Kim YO, Lim NY, Jeon WK, Sung HJ. Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon* induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. *Planta Med*. 1999 Aug;**65**(6):532-535.
136. Gao D, Hiromura M, Yasui H, Sakurai H. Direct reaction between shikonin and thiols induces apoptosis in HL60 cells. *Biol Pharm Bull*. 2002 Jul;**25**(7):827-832.
137. Hashimoto S, Xu M, Masuda Y, et al. beta-hydroxyisovalerylshikonin inhibits the cell growth of various cancer cell lines and induces apoptosis in leukemia HL-60 cells through a mechanism different from those of Fas and etoposide. *J Biochem*. 1999 Jan;**125**(1):17-23.
138. Su Y, Xie J, Wang Y, Hu X, Lin X. Synthesis and antitumor activity of new shikonin glycosides *Eur J Med Chem*. 2010 Jul;**45**(7):2713-2718.
139. Zhou W, Peng Y, Li SS. Semi-synthesis and anti-tumor activity of 5,8-O-dimethyl acylshikonin derivatives. *Eur J Med Chem*. 2010 Dec;**45**(12):6005-6011.
140. Wu Z, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Shikonin regulates HeLa cell death via caspase-3 activation and blockage of DNA synthesis. *J Asian Nat Prod Res*. 2004;**6**(3):155-166.

141. Wu Z, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis. *Chin Med J (Engl)*. 2005;**118**(8):671-677.
142. Rao Z, Liu X, Zhou W, Yi J, Li SS. Synthesis and antitumour activity of β -hydroxyisovalerylshikonin analogues. *Eur J Med Chem*. 2011 Sep;**46**(9):3934-3941.
143. Wang HB, Ma XQ. Mechanisms of (2-methyl-n-butyl) shikonin induced apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2012 Jun;**47**(6):816-821.
144. Yoshimi N, Wang A, Morishita Y. Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res*. 1992 Dec;**83**(12):1273-1278.
145. Min R, Tong J, Wenjun Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cell lines by Shikonin was partly through the inactivation of NF-kappaB pathway. *Phytother Res*. 2008 Mar;**22**(3):407-415.
146. Ahn BZ, Baik KU, Kweon GR, Lim K, Hwang BD. Acylshikonin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. *J Med Chem*. 1995 Mar 17;**38**(6):1044-1047.
147. Plyta ZF, Li T, Papageorgiou VP, et al. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Dec 1;**8**(23):3385-3390.
148. Hu X, Han W, Li L. Targeting the weak point of cancer by induction of necroptosis. *Autophagy*. 2007 Sep-Oct;**3**(5):490-492.
149. Hu X, Xuan Y. Bypassing cancer drug resistance by activating multiple death pathways--a proposal from the study of circumventing cancer drug resistance by induction of necroptosis. *Cancer Lett*. 2008 Feb 8;**259**(2):127-137.
150. Xuan Y, Hu X. Naturally-occurring shikonin analogues-A class of necroptotic inducers that circumvent cancer drug resistance. *Cancer Lett*. 2009 Feb 18;**274**(2):233-242.
151. Efferth T, Miyachi H, Bartsch H. Pharmacogenomics of a traditional Japanese herbal medicine (Kampo) for cancer therapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 2007 Mar-Apr;**4**(2):81-91.
152. Sevimli-Gur C, Akgun IH, Deliloglu-Gurhan I, Korkmaz KS, Bedir E. Cytotoxic Naphthoquinones from *Alkanna cappadocica*. *Journal of natural products*. 2010;**73**(5):860-864.
153. Lu G, Liao J. Detection of the anti-cancer biological effect of naphthoquinone pigment-LIII. *Zhong xi yi jie he za zhi= Chinese journal of modern developments in traditional medicine/Zhongguo Zhong xi yi jie he yan jiu hui (chou), Zhong yi yan jiu yuan, zhu ban*. 1990;**10**(7):422.

154. Gaddipati JP, Mani H, Raj K, Mathad VT, Bhaduri AP, Maheshwari RK. Inhibition of growth and regulation of IGFs and VEGF in human prostate cancer cell lines by shikonin analogue 93/637 (SA). *Anticancer Res.* 2000 Jul-Aug;**20**(4):2547-2552.
155. Xiong W, Luo G, Zhou L, Zeng Y, Yang W. In vitro and in vivo antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chin Med.* 2009 Jul 11;**4**(1):14.
156. Kuo HM, Hsia TC, Chuang YC, Lu HF, Lin SY, Chung JG. Shikonin inhibits the growth and N-acetylation of 2-aminofluorene in *Helicobacter pylori* from ulcer patients. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;**3a**(3a):1587-1592.
157. Gao H, Liu L, Qu ZY, et al. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine *in vitro*. *Biol Pharm Bull.* 2011 Feb;**34**(2):197-202.
158. Ali A, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Kolodziej H. Structure/antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns. *Planta Med.* 2011 Dec;**77**(18):2003-2012.
159. Kim JY, Jeong HJ, Park JY, et al. Selective and slow-binding inhibition of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on glycosyl hydrolase 33 and 34 sialidases. *Bioorg Med Chem.* 2012 Mar;**20**(5):1740-1748.
160. Karyagina TB, Arzumanyan VG, Timchenko TV, Bairamashvili D. Antimicrobial Activity of Shikonin Preparations *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2001 Aug;**35**(8):435-436.
161. Shen CC, Syu WJ, Li SY, Lin CH, Lee GH, Sun CM. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *J Nat Prod.* 2002 Dec;**65**(12):1857-1862.
162. Jain SC, Jain R, Singh B. Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*. *Pharmaceutical Biology.* 2003;**41**(4):231-233
163. Singh B, Sahu PM, Jain SC, Singh S. Estimation of naphthaquinones from *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. *In vivo* and *in vitro*. I. Anti-inflammatory screening. *Phytother Res.* 2004 Feb;**18**(2):154-159.
164. Girişgin O. Bazı bitki ekstraktlarının theileria annulata'ya karşı *in vitro* etkisi: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Ana Bilim Dalı, Uludağ Üniversitesi; 2008.
165. Erecevit P, Onganer AN, Kursat M, S. K. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activities of Some Plant Extracts Used in Traditional Medicine. *Turkish Journal of Science & Technology.* 2011;**6**(2):81-86.
166. Seto Y, Motoyoshi S, Nakamura H, Imuta J, Ishitoku T, Isayama S. Effect of shikonin and its derivatives, pentaacetylated shikonin (MDS-004) on granuloma formation and delayed-type allergy in experimental animals. *Yakugaku Zasshi.* 1992;**112**(4):259-271.

167. Ozaki Y, Suga C, Yoshioka T, Morimoto T, Harada M. Evaluation on equivalence of pharmacological properties between natural crude drugs and their cultured cells based on their components. Accelerative effect of *Lithospermi* radix and inhibitory effect of *Coptidis* rhizoma on proliferation of granulation tissue. *Yakugaku Zasshi*. 1990 Apr;**110**(4):268-272.
168. Ozaki Y, Sakaguchi I, Tujimura M, et al. Study of the accelerating effect of shikonin and alkannin on the proliferation of granulation tissue in rats. *Biol Pharm Bull*. 1998 Apr;**21**(4):366-370.
169. Sekine T, Kojima K, Matsumoto T, Yamamoto T, Maitani Y, Nagai T. Evaluation of shikonin on granulation tissue formation compared with carrageenan. *Biol Pharm Bull*. 1998;**21**(9):950-952.
170. Wang WJ, Bai JY, Liu DP, Xue LM, Zhu XY. The antiinflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B4 biosynthesis. *Yao Xue Xue Bao*. 1994;**29**(3):161-165.
171. Chen X, Oppenheim J, Howard OM. Shikonin, a component of antiinflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. *Int Immunopharmacol*. 2001 Feb;**1**(2):229-236.
172. Subbaramaiah K, Bulic P, Lin Y, Dannenberg AJ, Pasco DS. Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *J Biomol Screen*. 2001 Apr;**6**(2):101-110.
173. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Feb 13;**279**(7):5877-5885.
174. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Alkanna tinctoria* root extracts and their main constituents, hydroxynaphthoquinones. *Phytother Res*. 2005 Feb;**19**(2):141-147
175. Takano-Ohmuro H, Yoshida LS, Yuda Y, Morioka K, Kitani S. Shikonin inhibits IgE-mediated histamine release by human basophils and Syk kinase activity. *Inflamm Res*. 2008 Oct;**57**(10):484-488.
176. Kourounakis AP, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Gavalas A, Kourounakis PN. Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation - a preliminary pharmacological investigation. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2002 Jun;**335**(6):262-266.
177. Nishizawa M, Kohno M, Nishimura M, Kitagawa A, Niwano Y. Presence of peroxyradicals in cigarette smoke and the scavenging effect of shikonin, a naphthoquinone pigment. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005 Jul;**53**(7):796-799.

178. Andújar I, Recio MC, Bacelli T, Giner RM, Ríos JL. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with IkappaB α degradation thus inhibiting translocation of NF-kappaB to the nucleus. *Br J Pharmacol*. 2010 May; **160**(2):376-388.
179. Lu L, Qin A, Huang H, et al. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition. *Eur J Pharmacol*. 2011 May 11; **658**(2-3):242-247.
180. Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M. A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. *J Nat Prod*. 1986 May-Jun; **49**(3):466-469.
181. Kaith BS, Kaith NS, Chauhan NS. Anti-inflammatory effect of *Arnebia euchroma* root extracts in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 1996; **55**(1):77-80.
182. Lin ZB, Chai BL, Wang P, Guo QX, Lu FS, Xiang G-Q. Studies on the antiinflammatory effect of chemical principle of Zi-Cao [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. Pei-ching I Hsueh Yuan Hsueh Pao. 1980; **12**(2):101-106.
183. Singh B, Sharma MK, Meghwal PR, Sahu PM, Singh S. Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from *Arnebia hispidissima*. *Phytomedicine*. 2003; **10**(5):375-380.
184. Jin R, Bai Y. Theoretical investigation of the radical scavenging activity of shikonin and acylshikonin derivatives. *J Mol Model*. Apr 2012 **18**(4):1401-1408.
185. Orhan I, Şenol FS, Koca U, Ercetin T, Toker G. Evaluation of the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*. 2011; **35**:111-115.
186. Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard MZ. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother Res*. 2002 May; **16**(3):199-209.
187. Toker A. *Onosma armenicum*'dan izole edilen asetilşikoininin sıçan midelerinde etanolle oluşturulan ülser modelinde oksidatif strese olan etkileri: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Atatürk Üniversitesi; 2008.
188. Lee CC, Wang CN, Lai YT, et al. Shikonin inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and suppresses allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec; **161**(7):1496-1511.
189. Kamei R, Kitagawa Y, Kadokura M, et al. Shikonin stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes via an insulin-independent tyrosine kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Apr 5; **292**(3):642-651.
190. Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papapeorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytother Res*. 2003 May; **17**(5):501-507.

191. Hu CM, Cheng YW, Cheng HW, Kang JJ. Impairment of vascular function of rat thoracic aorta in an endothelium-dependent manner by shikonin/alkannin and derivatives isolated from roots of *Macrotomia euchroma*. *Planta Med.* 2004 Jan;**70**(1):23-28.
192. Ozgen U, Ikbal M, Hacimuftuoglu A, et al. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *J Ethnopharmacol.* 2006 Mar 8;**104**(1-2):100-103.
193. Ishida T, Sakaguchi I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Biol Pharm Bull.* 2007 May;**30**(5):928-934.
194. Zhao YX, Luo YL, Lai WY, Xu J, Ren DQ, Li ZX. Shikonin inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* May 2008;**28**(5):805-807.
195. Lee HY, Kim YJ, Kim EJ, Song YK, Byun SY. Red pigment from *Lithospermum erythrorhizon* by supercritical CO₂ extraction. *J Cosmet Sci.* 2008 Sep-Oct;**59**(5):431-440.
196. Wang XC, Feng J, Huang F, et al. Effects of shikonin isolated from zicao on lupus nephritis in NZB/W F1 mice. *Biol Pharm Bull.* Sep 2009;**32**(9):1565-1570.
197. Kim YO, Hong SJ, Yim SV. The efficacy of shikonin on cartilage protection in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2010 Aug;**14**(4):199-204.
198. Oberg AI, Yassin K, Csikasz RI, et al. Shikonin increases glucose uptake in skeletal muscle cells and improves plasma glucose levels in diabetic Goto-Kakizaki rats. *PLoS One.* 2011;**6**(7).
199. Gwon SY, Ahn JY, Chung CH, Moon B, Ha TY. *Lithospermum erythrorhizon* suppresses high-fat diet-induced obesity, and acetylshikonin, a main compound of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits adipocyte differentiation. *J Agric Food Chem.* 2012 Sep 12;**60**(36):9089-9096.
200. Yao XS, Ebizuka Y, Noguchi H, et al. Biologically active constituents of *Arnebia euchroma*: structure of arnebinol, an ansa-type monoterpenylbenzenoid with inhibitory activity on prostaglandin biosynthesis. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 1991 Nov; **39**(11):2956-2961.
201. Chang YS, Kuo SC, Weng SH, Jan SC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Planta Med.* 1993 Oct;**59**(5):401-404.
202. Ko FN, Lee YS, Kuo SC, Chang YS, Teng C, M. Inhibition on platelet activation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Sep 21;**268**(3):329-334.

203. Singh H. Indian Journal of Traditional Knowledge. Importance of local names of some useful plants in ethnobotanical study. 2008 Apr;7(2):365-370.
204. Kunwar R, Nepal B, Kshhetri H, Rai S, Bussmann R. Ethnomedicine in Himalaya: a case study from Dolpa, Humla, Jumla and Mustang districts of Nepal. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2006 Jun 2;2(1):27.
205. Ağmil A. *Arnebia densiflora* (enik otu) bitki köklerinin boyama niteliklerinin incelenmesi: Fen Bilimleri Enstitüsü. , Uludağ Üniversitesi,; 1998.
206. Jian Y, Zhou Y, Zhang H. Quality of Chinese drug zicao. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica. 1991 Sep;16(9):524-526.
207. Kang JS, Ahn BZ, Blaschke G. Enantiomeric ratio of shikonin derivatives as a possible key for the determination of the origin of *Lithospermi* Radix. Arch Pharm Res. Oct 1998;21(5):565-569.
208. Cho MH, Paik YS, Hahn TR. Propionylshikonin from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*. Arch Pharm Res. 1999 Aug;22(4):414-416.
209. Cho MH, Paik YS, Hahn TR. Physical stability of shikonin derivatives from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* cultivated in Korea. J Agric Food Chem. 1999 Oct;47(10):4117-4120.
210. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Study on the enantiomeric ratio of the pharmaceutical substances alkannin and shikonin. Biomedical chromatography: BMC. 2004 Dec;18(10):791-799.
211. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Kyriacou G. Determination of naturally occurring **Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.Hata! Bağlantı geçersiz.**Aprhydroxynaphthoquinone polymers by size-exclusion chromatography. Chromatographia. 2002 Apr;55(7-8):423-430.
212. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Study on polymerization of the pharmaceutical substances isohexenylnaphthazarins. Biomedical chromatography : BMC. 2004 Oct;18(8):492-500.
213. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Study on isohexenylnaphthazarins polymerization in alkaline media. Biomed Chromatogr. 2004 Oct;18(8):508-522.
214. Lu HT, Jiang Y, Chen F. Preparative high-speed counter-current chromatography for purification of shikonin from the Chinese medicinal plant *Lithospermum erythrorhizon*. J Chromatogr A. 2004 Jan 9;1023(1):159-163.
215. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Encapsulation of isohexenylnaphthazarins in cyclodextrins. Biomedical chromatography : BMC. 2004 May;18(4):240-247.

216. Wu PC, Huang YB, Lin IC, Tsai Y, H. A rapid, simple high performance liquid chromatography method for the determination of traditional chinese medicine ointment Shiunko. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2004;**12**(4):311-315.
217. Spyros A, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Structure determination of oligomeric alkannin and shikonin derivatives. *Biomedical chromatography: BMC*. Sep 2005;**19**(7):498-505.
218. Hu Y, Jiang Z, Leung KS, Zhao Z. Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2006 Sep 1;**577**(1):26-31.
219. Pekin G, Ganzera M, Senol S, Bedir E, Korkmaz KS, Stuppner H. Determination of naphthazarin derivatives in endemic Turkish *Alkanna* species by reversed phase high performance liquid chromatography. *Planta Med*. 2007 Mar;**73**(3):267-272.
220. Assimopoulou AN, Ganzera M, Stuppner H, Papageorgiou VP. Simultaneous determination of monomeric and oligomeric alkannins and shikonins by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*. 2008 Feb;**22**(2):173-190.
221. Sagratini G, Cristalli G, Giardina D, et al. Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L.: extraction method study and quantification. *Journal of separation science*. 2008 Apr;**31**(6-7):945-952.
222. Assimopoulou AN, Sturm S, Stuppner H, Papageorgiou VP. Preparative isolation and purification of alkannin/shikonin derivatives from natural products by high-speed counter-current chromatography. *Biomedical chromatography : BMC*. 2009 Feb;**23**(2):182-198.
223. Feng L, Ji H, Gu H, et al. An Efficient Method for Extraction, Separation and Purification of Naphthoquinone Pigments from *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. by SFE and HSCCC. *Chromatographia*. 2009 Oct; **70**(7-8):1197-1200.
224. Tian H, Sun D, Dou G, Yuan D, Meng Z. Quantitative determination of beta,beta-dimethylacrylshikonin (DASK) in rat whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pre-column derivatization and its pharmacokinetic application. *Biomedical chromatography : BMC*. 2009 Apr;**23**(4):365-370.
225. Zhu M, Gao Y, Wu Z, Zhao Y. A rapid HPLC/ESI-MS/MS method for quantitative analysis of isovalerylshikonin in rat plasma. *Biomedical chromatography : BMC*. 2010 Apr;**24**(4):413-419.
226. Noula E, Samanidou VF, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Papadoyannis IN. Solid-phase extraction for purification of alkanin /shikonin samples and isolation of monomeric and dimeric fractions. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Jul;**397**(6):2221-2232.

227. Zhou W, Jiang Hda G, Peng Y, Li SS. Comparative study on enantiomeric excess of main akannin/shikonin derivatives isolated from the roots of three endemic Boraginaceae plants in China. *Biomedical chromatography:BMC*. 2011 Oct;**25**(10):1067-1075.
228. Akgun I, Markus G, G. C, Serdar Ş, Kemal K, Bedir E. Determination of Naphthazarin Derivatives in 16 *Alkanna* Species by RP-LC Using UV and MS for Detection. *Chromatographia*. 2009;**70**(5-6):963-967
229. Graikou K, Pietrosiuk A, Damianakos H, Jeziorek M, Chinou I. Chemical Analysis of *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. Hairy Roots through TLC, CC, GC-MS, ESI-MS and NMR Methods. *Acta Chromatographica*. 2011 Jun;**23**(2):353-363.
230. Ito Y, Onobori K, Yamazaki T, Kawamura Y. Tigloylshikonin, a new minor Shikonin derivative, from the roots and the commercial root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;**59**(1):117-119.
231. Li H, Luo S, Zhou T. Studies on in vitro metabolism of shikonin. *Phyther Res*. 1999 May;**13**(3):236-238.
232. Shukla YN, Srivastava A, Singh SC, Kumar S. New naphthoquinones from *Arnebia hispidissima* roots. *Planta Med*. 2001 Aug;**67**(6):575-577.
233. Sharma N, Sharma UK, Malik S, et al. Isolation and purification of acetylshikonin and beta-acetoxyisovalerylshikonin from cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using rapid preparative HPLC. *Journal of separation science*. 2008 Mar;**31**(4):629-635.
234. Sharma N, Sharma UK, Gupta AP, et al. Simultaneous densitometric determination of shikonin, acetylshikonin, and beta-acetoxyisovaleryl-shikonin in ultrasonic-assisted extracts of four *Arnebia* species using reversed-phase thin layer chromatography. *Journal of separation science*. 2009 Sep;**32**(18):3239-3245.
235. Wei YJ, Wang M, Yuan MR, Jia XB, Zhang RT, W. T. Study on dynamic changes and stability of effective components of *Arnebia euchroma*. *Zhong Yao Cai*. 2011 Sep;**34**(4):611-615.
236. Xiao Y, Wang Y, Gao S, et al. Determination of the active constituents in *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. by ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2011 Jun 15;**879**(20):1833-1838.
237. Bozan B, Baser KHC, Kara S. Quantitative determination of naphthaquinones of *Arnebia densiflora* Ledeb. by an improved high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr*. 1997 Oct 3;**782**(1):133-136.
238. Bozan B, Baser KHC, Kara S. Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC-densitometry. *Fitoterapia*. 1999 Aug 1;**70**(4):402-406.

239. Kyte L. Plants from test tubes. An Introduction to Micropropagation. Portland, Oregon: Timber Press; 1987.
240. Guri DJ, Patel KN, Inventors. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. 1998.
241. Rihan HZ, Al-Issawi M, Al-swedi F, Fuller MP. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia Horticulturae*. 2012 Jun 15; **141**:47-52.
242. Memişoğlu M. *Ecballium elaterium* Bitkisinde Hücre Süspansiyon Kültürü Tekniği ile Sekonder Metabolit (Kukurbitasin B) Üretimi. [Doktora Tezi]. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi; 2005.
243. Weng XC, Xiang ALJ, Liu Y, Wu LL, Dong XW, Duan S. Antioxidant properties of components extracted from Pucoon (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. Et Zucc.). *Food Chemistry*. 2000 May 1; **69**(2):143-146.
244. Janicsak G, Mathe I. Paralel Determination of Rosmarinic and Caffeic Acids by TLC- Densitometry. *Chromatographia*. 1997 Sep; **46**(5-6):322-324.
245. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Munich, Germany: Springer Verlag. 275 second edition; 1996.p: 274.
246. Hara Y, Suga C, Inventors. Method For Producing Secondary Metabolites of Plants. Mitsui Petrochemical Industries LTD. EP0071999 1986. B1. <http://www.freepatentsonline.com/EP0071999B1.html>.
247. Hara Y, C. S, Inventors. Method for producing secondary metabolites of plants. US patent US 4717664 A1988. United States Mitsui Petrochemical Industries, Ltd. (Tokyo, JP) US 4717664 A <http://www.freepatentsonline.com/4717664.html>.
248. Yesil-Celiktas O, Gurel A, Vardar-Sukan F. Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research Network*. 2010:1- 54.
249. Colgecen H, Koca U, Toker G. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk J Biol*. 2011; **35**:513-520.
250. Ding J, Shi S, Jiang B-H, et al. Effects of Methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2004 Nov-Dec; **40**(6):581-585.
251. Fujita Y. Industrial production of shikonin and berberine Vol 137. *Chichester* 1988:228-237.
252. Gupta K, Garg S, Singh J, Kumar M. Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp. and its up-scaling through bioreactor. *3 Biotech*. 2013: 1-11.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğba ERÇETİN

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 07.06.1982

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ankara Gazi Lisesi (1996-1999)

Lisans: Ankara Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu, İngilizce Hazırlık (1999-2000)
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2000-2004)

Tezsiz Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Orta Öğretim Alan
Öğretmenliği- Biyoloji Bölümü (2004 -2005)

Tezli Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Botanik Ana Bilim
Dalı (2004 -2007)

Kurumu:

Görevi:

Yılları:

Nobel İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş. Farmasötik Araştırma
Geliştirme Merkezi (FARGEM)

Ar-ge
Sorumlusu

2010-...

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1 İlkay Orhan, Fatma Sezer Şenol, Ufuk Koca, Tuğba Erçetin, Gülnur Toker. Evaluation of antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Arnebia densiflora* Ledeb. Turkish Journal of Biology. 2011;**35**(1):111-5.

2 Tuğba Erçetin, Gülnur Toker, Murat Kartal, Hatice Çölgeçen, M. Cihat Toker. Analysis of some isoflavones in natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (red clover) calluses. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2012;**22**(5):964-70.

3 Tugba Ercetin, Fatma Sezer Senol, Ilkay Erdogan Orhan, Gulnur Toker. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. Industrial Crops and Products. 2012 Mar;**36**(1):203-8.

4 Ilkay Erdogan Orhan, Fatma Sezer Senol, Tugba Ercetin, Ahmet Kahraman, Ferhat Celep, Galip Akaydin, Bilge Sener, Musa Dogan. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. Industrial Crops and Products. 2013 Jan;**41**:21-30.

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Ufuk Koca, Hatice Cölgecen, Tuğba Ercetin, Gülnur Toker. *In vitro* seed germination and callus production from *Ecballium elaterium* Rich. as a source for cucurbitacin B. Biomed. 2009;**4**(4):350-9. ISSN: 0973-3965.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1 U. Koca, T. Erçetin, G. Toker. PSE Congress Plants for Human Health in the Post-Genome Era- Helsinki/Finland, Poster Bildirisi -Production and increase of cucurbitacin B in *Ecballium elaterium* (L) Rich. Cell suspension culture by using elicitors (26-29 Ağustos 2007).

2 U. Koca, T. Erçetin. Fifth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries –Brno/ Czech Republic, Poster Bildirisi - Effects of different media compositions on the production of shikonin derivatives in callus cultures of *Arnebia densiflora* Ledeb (02-05 Eylül 2008).

3 U. Koca, H. Bardakçı, H. Kırmızıbekmez, T. Erçetin, G. Toker, M. C. Toker, E. Yeşilada. 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences- Ankara, Poster Bildirisi - Identification of Shikonin Derivatives and Rosmarinic acid in *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. Plant and Callus Cultures (23-26 Haziran 2009).

4 T. Erçetin, F.S. Şenol, I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, G. Akaydin, B. Şener, M. Doğan. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC)- Antalya, Poster Bildirisi- Anticholinesterase and Antioxidant Appraisal of Some *Salvia* Species from Euro-Sibirian And Mediterranean Phytogeographic Regions (18-22 Nisan 2010).

5 F.S. Şenol, T. Erçetin, I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman, G. Akaydin, B. Şener, M. Doğan. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC)- Antalya, Poster Bildirisi-Assessment of Anticholinesterase and Antioxidant Effects of Some *Salvia* Species from Irano-Turanian Phytogeographic Region (18- 22 Nisan 2010).

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- 1 T. Erçetin, H. Çölgeçen, M. Kartal, M. C. Toker, G. Toker. XVII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı - Kuşadası , Sözlü Bildiri - Doğal Tetraploid *Trifolium pratense* L. (Çayır üçgülü) ve Kalluslarının İzoflavon (Fitoöstrojen) İçeriğinin Araştırılması (26-29 Ekim 2007).
- 2 U. Koca, T. Erçetin, G. Toker , M. C. Toker. XVIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı- İstanbul, Sözlü Bildiri - Farklı Besi Yerlerinin (Ortamlarının) *Arnebia densiflora* (Normd.) Ledeb Kallus Kültürlerinde Naftokinon Üretimi Üzerine Etkileri (16-18 Ekim 2008).
- 3 U. Koca, T. Erçetin, H. Çölgeçen, M. Kartal, M. C. Toker, Y. Kan. XVIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı- İstanbul, Poster Bildirisi - Aseptik Ortamda Yetiştirilen *Echinacea purpurea* ve *Echinacea pallida* Fidelerinin Kallus Oluşturma Potansiyellerinin Karşılaştırılması (16-18 Ekim 2008).
- 4 T. Erçetin, H. Çölgeçen, M. C. Toker, G. Toker. 19. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı- Mersin, Poster Bildirisi - *Arnebia densiflora* Ledeb. Bitkisinin Kallus Oluşumunun Arttırılmasında Farklı Sterilizasyon Yöntemlerinin Kullanılması (27-30 Ekim 2010).
- 5 T. Çeçen, T. Erçetin, G. Toker. 20. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı- Antalya, Poster Bildirisi. *Calendula officinalis* L. Çiçekleri ile Bazı Aktar Numuneleri ve Ticari Preparatları Üzerinde Çalışmalar (10-13 Ekim 2012).

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

- 1 Orhan İlkay, Şenol Fatma Sezer, Koca Ufuk, Erçetin Tuğba, Toker Gülnur. Evaluation of antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Arnebia densiflora* Ledeb. Turkish Journal of Biology. 2011;**35**(1):111-5.