T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SYMPHYTUM OFFICINALE L. SÜSPANSİYON HÜCRE KÜLTÜRÜ EKSTRAKTININ İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE (CRL-2076) YAŞLANMA KARŞITI GENLERİN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Ayşenur ÇALLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Haziran, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SYMPHYTUM OFFICINALE L. SÜSPANSİYON HÜCRE KÜLTÜRÜ EKSTRAKTININ İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE (CRL-2076) YAŞLANMA KARŞITI GENLERİN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Ayşenur ÇALLI tarafından hazırlanan tez çalışması **23.06.2022** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ, Üye
Trakya Üniversitesi _____

Danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘‘*Symphytum officinale* L. süspansiyon hücre kültürü ekstraktının insan fibroblast hücrelerinde (CRL-2076) yaşlanma karşıtı genlerin ekspresyonlarına etkisinin belirlenmesi’’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ayşenur ÇALLI

İmza

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bilgisi, deneyimleri ile katkı sağlayarak bana destek olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Şenay Vural KORKUT'a, tezimin her aşamasında fikirlerime ve çalışma azmime güvendiği, çalışmalarımda hep teşvik edici olduğu için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaptığım çalışmalarda bilgisi, deneyimleri ile katkı sağlayarak bana destek olan değerli müdürüm Dr. Yıldız BODURLAR'a ve sağladığı kaynaklarla tez çalışmalarımı ACTV Biyoteknoloji Ar-Ge laboratuvarlarında yapmamı sağlayan değerli müdürüm Dr. Yakup BAKIR'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Yıldız Teknik Üniversitesi'ne eğitim hayatım boyunca kazandırdığı tüm değerler için çok teşekkür ederim.

Bir bireyi olmaktan mutluluk duyduğum ACTV Biyoteknoloji ailesine birlikte geçirdiğimiz beş yıl boyunca kazandırdığı tüm değerler için çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan bana benden daha fazla inanan ve güvenen eğitimim adına bir çok fedakarlıkta bulunan başta annem olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim. Beni ben yapan değerleri bana kattıkları için minnettarım.

Ayşenur ÇALLI

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ viii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 3
1.3 Hipotez ... 3
2 GENEL BİLGİLER 5
2.1 Bitki Biyoteknolojisi ... 5
2.2 *Symphytum officinale* L. ... 19
2.3 Cilt Yaşlanması ... 27
3 HAZIRLIKLAR 33
3.1 Materyal ... 33
3.2 Metod ... 42
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 61
4.1 Bitki Hücre Kültürü Çalışmaları ... 61
4.2 Kimyasal Analiz Çalışmaları ... 67
4.3 Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları ... 70
4.4 Moleküler Biyoloji ve Genetik Çalışmaları ... 71
KAYNAKÇA 77
A FOLIN-CIOCALTEU DENEYİ 87
B DPPH DENEYİ 89
C MTT DENEYİ 91
D RT-qPCR CT DEĞERLERİ 92
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 94

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
g	Gram
pH	Hidrojenin Gücü
L	Litre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
mg/ml	Miligram/Mililitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogram
OD	Optik Densite
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
B5	Gamborg B5
BAP	6-Benzilaminopurin
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
COL1A1	Kolajen tip 1 alfa 1
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ECM	Hücre Dışı Matriks
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELN	Elastin
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Floresan Diasetat
GAG	Glikozaminoglikan
HA	Hyalüronik Asit
HAS3	Hyalüronan Sentaz 3
HSF	İnsan Derisi Fibroblastları
IAA	İndol-3-Asetik Asit
IC50	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LS	Linsmaier&Skoog
MMP	Matriks metalloproteinazlar
MS	Murashige&Skoog
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
NAA	Naftalen asetik asit
NN	Nitsch&Nitsch
PCV	Paketlenmiş Hücre Hacmi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
RT-qPCR	Ters Transkripsiyon Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SH	Schenk&Hilderbrant

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Hücre süspansiyon kültürü elde edilmesine kadar gerçekleştirilen aşamalar 12

Şekil 2.2 *Symphytum officinale* L.- HEYNS 1888'den sonra [45] 19

Şekil 2.3 Karakafes otu karbonhidratlar, tanenler, amino asitler, allantoin, polisakkaritler, triterpenler, steroller, fenolik bileşikler ve pirolizidin alkaloidleri gibi çok çeşitli kimyasal bileşenler içerir. [18]..... 21

Şekil 2.4 Rosmarinik asitin yapısı [54] 24

Şekil 2.5 Salvionik asit A ve B'nin kimyasal yapısı [57]..... 25

Şekil 2.6 Kafeik asit (I) ve klorojenik asit (II) yapısı [63] 26

Şekil 2.7 Epidermal farklılaşma [19]..... 30

Şekil 4.1 Toprakta yetiştirilen karakafes otu bitkisi 61

Şekil 4.2 A1 besin ortamında oluşturulan sürgünlerin MS besin ortamına taşınmasıyla oluşan karakafes otu fidesi (1. alt kültür) 62

Şekil 4.3 MS besin ortamında çoğaltılan ve kallus kültürü çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılan fideler (3. alt kültür)..... 63

Şekil 4.4 Karakafes otu yaprak eksplantlarında kallus uyarımı B5 (Açık renkli kallus oluşumu) ve B10 (Koyu renkli kallus oluşumu) besin ortamları 1. alt kültür 65

Şekil 4.5 Karakafes otu bitkisinden elde edilen kırılgan kalluslar. B5 (Açık renkli kallus yanıtı) ve B10 (Koyu renkli kallus yanıtı) besin ortamları (3. alt kültür)..... 65

Şekil 4.6 B5 besin ortamında çoğaltilan karakafes otu hücre süspansiyon kültürü (3. alt kültür, 14. gün)..... 66

Şekil 4.7 10X büyütme oranında karakafes otu süspansiyon hücrelerinin mikroskop görüntüsü 67

Şekil 4.8 Gallik asit standartı grafiği 68

Şekil 4.9 KOHSK liyofilizatlarının farklı çözücü ekstrelerindeki toplam fenolik miktarının gallik eşdeğerleri 68

Şekil 4.10 Troloks doz bağımlı antioksidan aktivite grafiği 69

Şekil 4.11 KOHSK ekstraktı antioksidan aktivite grafiği 69

Şekil 4.12 Troloks doza bağımlı antioksidan sütün grafiği aktivite grafiği 70

Şekil 4.13 KOHSK ekstraktı doza bağımlı antioksidan aktivite grafiği..... 70

Şekil 4.14 MTT deneyi konsantrasyon bağımlı % canlılık grafiği..... 71

Şekil 4.15 RNA izolasyonu için inkübe edilen CRL-2076 hücreleri 72

Şekil 4.16 KOHSK ekstraktının COL1A1 gen ifadesine etkisi..... 72

Şekil 4.17 KOHSK ekstraktının ELN gen ifadesine etkisi..... 73

Şekil 4.18 KOHSK ekstraktının HAS3 gen ifadesine etkisi 73

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus ve süspansiyon kültürleri ile fitokimyasalların üretilmesi [35] 14

Tablo 3.1 Kimyasallar 33

Tablo 3.2 Kitler 36

Tablo 3.3 Primerler 36

Tablo 3.4 Cihazlar 37

Tablo 3.5 Laboratuvar Malzemeleri 39

Tablo 3.6 Programlar 41

Tablo 3.7 1 lt Gamborg B5 10X makro stok solüsyonu hazırlanması 42

Tablo 3.8 1 lt Gamborg B5 100X mikro stok solüsyonu hazırlanması 43

Tablo 3.9 1 lt Gamborg B5 100X vitamin stok solüsyonu hazırlanması 43

Tablo 3.10 1 lt MS 10X makro stok solüsyonu hazırlanması 44

Tablo 3.11 1 lt MS 100X mikro stok solüsyonu hazırlanması 44

Tablo 3.12 1 lt MS 100X vitamin stok solüsyonu hazırlanması 45

Tablo 3.13 Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması 46

Tablo 3.14 *in vitro* ortamda fide eldesi için deneme yapılan besin ortamları bileşenleri 47

Tablo 3.15 Kallus kültürü eldesi için deneme yapılan besin ortamları bileşenleri 48

Tablo 3.16 Troloks standartı konsantrasyon hesaplama 53

Tablo 3.17 KOHSK ekstraktı (%70 etanol) konsantrasyon hesaplama 54

Tablo 3.18 cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri 58

Tablo 3.19 RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü 59

Tablo 4.1 *in vitro* ortamda fide büyütülmesi için kullanılan besin ortamları ve elde edilen yanıtlar 62

Tablo 4.2 Kırılgan kallus kültürü için kullanılan besin ortamları ve elde edilen yanıtlar 63

ÖZET

SYMPHYTUM OFFICINALE L. SÜSPANSİYON HÜCRE KÜLTÜRÜ EKSTRAKTININ İNSAN FİBROBLAST HÜCRELERİNDE (CRL-2076) YAŞLANMA KARŞITI GENLERİN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Ayşenur ÇALLI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Cilt yaşlanması kolajen, elastin ve hyaluronik asit sentezinin azalması ve dermal kolajen ve elastin yapılarının bozulmasıyla karakterize edilen biyolojik bir süreçtir. Bu çalışmada *Symphytum officinale* L. (Karakafes otu) hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen ekstraktın yaşlanma karşıtı aktivitesinin belirlenmesi için insan normal fibroblast hücrelerinde (CRL-2076) yaşlanma karşıtı aktivite ile ilişkili genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla karakafes otu bitkisi yaprakları kullanılarak *in vitro* ortamda uygun bitki büyüme düzenleyicileri ile fideler elde edilmiştir. *In vitro* ortamda büyütülen fidelerin yaprak eksplantları yaralanarak kallus kültürleri oluşturulmuş, kırılgan kalluslar kullanılarak süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Karakafes otu hücre süspansiyon kültüründen (KOHSK) elde edilen ekstraktta toplam fenolik içerik Folin Ciocalteu yöntemiyle, antioksidan aktivite DPPH metodu ile belirlenmiştir. KOHSK ekstraktının *in vitro* sitotoksitesi CRL-2076 hücreleri üzerinde MTT deneyi ile değerlendirilmiştir.

KOHSK ekstraktının CRL-2076 hücreleri üzerinde yaşlanma karşıtı aktivitesinin belirlenmesi için Kolajen tip 1 alfa 1 (COL1A1), elastin (ELN) ve hyaluronan sentaz 3 (HAS3) genlerinin gen anlatımına etkisi RT-qPCR ile analiz edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda KOHSK liyofilizatları ile hazırlanan ekstraktlarda %70 etanol ekstraktının 1181 µM gallik asit eşdeğeri ile en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. KOHSK ekstraktının yarılanma konsantrasyonu (IC_{50} değeri) DPPH deneyi ile 83 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan RT-qPCR çalışmasında 100 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan CRL-2076 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla COL1A1 geninin ifadesinin 1,2 kat, ELN geninin ifadesinin 1,4 kat ve HAS3 geninin ifadesinin 1,4 kat oranında arttığı belirlenmiştir. 200 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan CRL-2076 hücrelerinde ise COL1A1 geninin ifadesinin 1,3 kat, ELN geninin ifadesinin 2,7 kat ve HAS3 geninin ifadesinin 1,7 kat oranında arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde KOHSK ekstraktının yaşlanma karşıtı aktivite gösterme potansiyeline sahip olduğu ve yaşlanma karşıtı etken hammadde olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Symphytum officinale* L., hücre süspansiyon kültürü, ekstrakt, RT-qPCR, yaşlanma karşıtı aktivite.

ABSTRACT

SYMPHYTUM OFFICINALE L. SUSPENSION CELL CULTURE EXTRACT ON EXPRESSION OF ANTI-AGING RELATED GENES ON HUMAN FIBROBLAST CELLS (CRL-2076)

Ayşenur ÇALLI

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Skin aging is a biological process characterized by decreased synthesis of collagen, elastin, and hyaluronic acid and degradation of dermal collagen and elastin structures. This study, it was aimed to determine the changes in the expression levels of genes associated with antiaging activity in human normal fibroblast cells (CRL-2076) to determine the antiaging activity of the extract obtained from *Symphytum officinale* L. (Comfrey) cell suspension cultures.

For this purpose, seedlings were obtained with suitable plant growth regulators *in vitro* by using comfrey plant leaves. Callus cultures were created by wounding leaf explants of seedlings grown *in vitro*, suspension cultures were obtained using friable callus. Total phenolic content in the extract obtained from comfrey cell suspension culture (CCSC) was determined by Folin Ciocalteu method and antioxidant activity was determined by DPPH method. *In vitro* cytotoxicity of CCSC extract was evaluated by MTT assay on CRL-2076 cells. To determine the anti-aging activity of CCSC extract on CRL-2076 cells, the effects of collagen type 1 alpha 1 (COL1A1), elastin (ELN), and hyaluronan synthase 3 (HAS3) genes on gene expression were analyzed by RT-qPCR.

As a result of the studies, it was concluded that the 70% ethanol extract has the highest total phenolic content with 1181 µM gallic acid equivalent in the extracts prepared with CCSC lyophilisates. The half-life concentration (IC_{50} value) of the CCSC extract was determined as 83 µg/ml by DPPH experiment. In the RT-qPCR study, it was determined that the expression of the COL1A1 gene increased by 1.2-fold, the expression of the ELN gene by 1.4-fold and the expression of the HAS3 gene by 1.4-fold, compared to the control group, in CRL-2076 cells treated with 100 µg/ml CCSC extract. It was concluded that the expression of the COL1A1 gene increased by 1.3-fold, the expression of the ELN gene increased by 2.7-fold and the expression of the HAS3 gene increased by 1.7-fold in the CRL-2076 cells treated with 200 µg/ml CCSC extract.

When the data obtained in this thesis study were evaluated, it was concluded that the CCSC extract has the potential to show anti-aging activity and can be used as an anti-aging raw material.

Keywords: *Symphytum officinale* L., cell suspension culture, extract, RT-qPCR, anti-aging activity

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Bitki doku kültürü; bitki parçalarının aseptik şartlar altında uygun besin ortamlarında doku, bitki veya hücrelerin elde edilmesini ve sağlayan *in vitro* kültür teknikleridir [1]. Kallus doğadaki bitkilerde yaralanan bölgenin tamir edilmesi amacıyla oluşan, yaralanmış bitki dokusunun doğal olarak oluşturduğu cevaptır [2],[3]. Kallus kültürü organize olmamış hücre kümeleridir ve bu hücreler *in vitro* olarak korunabilir, doğru besin ortamı kullanıldığında sınırsız çoğalabilme potansiyeline sahiptir [4]. Hücre süspansiyon kültürü ise sıvı besin ortamında tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının elde edildiği bir hücre kültürü tekniğidir ve kallus kültüründe elde edilen hücrelerin bir devamı niteliğindedir [1],[5]. Hücre süspansiyon kültürü ile hücrelerin büyüme yüzeyi arttırılır; böylece kütle transferi geliştirilir ve hücrelerin kalluslara göre daha yüksek büyüme hızına sahip olması sağlanır [6].

Sekonder metabolitler farklılaşmış ya da özel hücrelerde bulunan, hücre için gerekli olmayan; ancak bitkinin çevresi ile etkileşiminde önemli bir role sahip olan bileşiklerdir [7],[8],[9]. Süspansiyon kültürü hücreleri, kallus kültürü hücrelerine göre daha çabuk büyür ve morfolojik olarak daha homojen bir yapıya sahiptir; bu nedenle sekonder metabolitlerin üretilmesinde kallus kültürlerine göre daha avantajlıdır [1]. Sekonder metabolitler ilaç, zirai, kozmetik, tekstil ve gıda gibi önemli alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir; bu nedenle ekonomik açıdan önem arz ederler [8].

Bitki hücre kültürü teknikleri bitki kullanımına bağlı olarak karşılaşılabilen karbon ayak izi ve su ihtiyacı, pestisit ve herbisit gerekliliği gibi problemlerin üstesinden gelerek birçok avantaj sağlar [10]. Bitki hücre kültürü teknikleri ile tarım arazisine ihtiyaç olmadan, kontrollü şartlar altında, yüksek tutarlılık seviyelerine sahip, mevsimlerden veya bitki üreme döngüsünden bağımsız, güvenli ve temiz bileşen eldesi sağlamak mümkündür. Bununla birlikte bitki hücre kültürü teknikleri ile bileşiklerin konsantrasyonu, kültürleme koşulları, fiziksel parametreleri değiştirilebilir veya kültür ortamına indükleyici bileşik ilave edilerek istenen bileşik miktarı arttırılabilir veya optimize edilebilir [4],[6],[11].

Bitki hücreleri iyi bir aktif bileşen kaynağıdır ve kozmetik formülasyonlara farklı tiplerde bitki hücre özütleri dahil edilerek kullanılabilir [4]. Bitki hücre kültürü teknolojisi, bitkilerden geleneksel yöntemlerle yeterli miktarda elde edilemeyen sekonder metabolitleri elde etmek için kullanılabilir [4],[6],[12].

Karakafes otu, Avrupa ve Asya'nın çok yıllık yerli bir bitkisidir ve Kuzey Amerika'da da yaygın olarak bulunur [13],[14]. Karakafes otu kökü kas ve eklem şikayetlerinin tedavisinde geleneksel olarak kullanılmıştır ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri ile bilinmektedir [13],[14],[15].

Karakafes otu antiinflamatuar, analjezik ve anti-ödem aktivitelerine sahiptir ve ağrı, yanık, kolay iyileşmeyen yaraların ve kırık kemiklerin tedavisinde kullanılmaktadır. Karakafes otu kökünün farmakolojik olarak en aktif bileşenleri allantoin ve [15],[16]. rosmarinik asittir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla antioksidanların yara iyileşmesini destekleyebileceği kanıtlanmıştır [17]. Karakafes otu da içerdiği allantoin ve fenolik asitler sayesinde kayda değer antioksidan aktivite sergiler [18]. Günümüzde yapılan çalışmalarla elde edilen modern klinik veriler karakafes otu kökü preparatlarının geleneksel topikal uygulamasını doğrulamaktadır [13].

Deri, kendini sürekli yenileyen ve vücudu dehidrasyon, yaralanma ve enfeksiyona karşı koruma amacı taşıyan bir sistemdir [12],[19]. Deri yaşlanması epidermis ve dermisin tüm katmanlarını içeren karmaşık bir biyolojik yapı olup henüz tam aydınlatılamamakla birlikte içsel (genetik) ve dışsal (fotoyaşlanma) yaşlanma olarak adlandırılan biyolojik olarak bağımsız iki sürecin sonucudur [20],[21],[22].

Kolajen ve elastin dermal fibroblastlar tarafından üretilen ve bol miktarda bulunan hücre dışı matriks (ECM) proteinlerdir. Kolajen ana yapısal proteindir; hücrelere destekleyici bir çerçeve sağlar [23] ve tip I kolajen dermisin kuru ağırlığının yaklaşık %80'ini oluşturur [24],[25]. Elastin, cildin elastikiyetini ve direncini korumada önemli bir rol oynar ve diğer ECM proteinleri ile yüksek dereceli yapılara organize olur [24]. Hyaluronan veya hyaluronik asit (HA), ECM'nin bir bileşenidir ve yara iyileşmesi ile doku onarımı sırasında fibroblastlar için bir çevre sağlar [26].

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada cilt yaşlanmasını yavaşlatmak için cildi güçlendirecek ve koruyacak yöntemler araştırılmıştır. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte kozmetik ürünlerde ekolojik ayak izi düşük, işlevsel ve güvenli doğal ürün üretme eğilimi oluşmuştur. Bu nedenle kozmetik sektöründe bitki hücre kültüründen türetilmiş aktif

bileşenlerin geliştirilmesi çalışmalarına odaklanılmıştır. Bitki hücre kültürlerinden elde edilen bileşenler cilt yenilenmesini sağlayabilir, kolajen gibi önemli proteinlerin üretimini uyararak yaşlanma karşıtı aktivite gösterebilirler [10],[12],[27].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında birçok tıbbi özelliğe sahip karakafes otu bitkisinden hücre süspansiyon kültürünün elde edilmesi ve hücre süspansiyon kültüründen elde edilen ekstraktın CRL-2076 hücreleri üzerindeki yaşlanma karşıtı etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, karakafes otunun *in vitro*'da büyütülen fide yaprakları ve uygun besin ortamları kullanılarak kallus kültürleri oluşturulmuştur. Kallus kültüründe oluşan kırılgan kallus hücreleri sıvı besin ortamına transfer edilerek uygun sıcaklık ve çalkalama hızı ile hücre süspansiyon kültürü oluşturulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonları yeterli kütlede çoğaltıldıktan sonra hasat edilerek liyofilizat haline getirilip kimyasal analiz çalışmaları için kullanılmıştıt. Hücre süspansiyon kültürü ekstraktının toplam fenolik bileşik miktarı Folin Ciocalteu deneyi ile ve antioksidan aktivitesi DPPH metodu ile belirlenmiştir. Toplam fenolik miktarı ve antioksidan aktivitesi belirlenen ekstraktın CRL-2076 hücreleri üzerinde sitotoksitesi MTT deneyi ile belirlenmiştir. Yaşlanma karşıtı aktivitenin belirlenmesi için cildin temel yapı taşlarını oluşturan kolajen, elastin ve hyalüronik asit proteinlerini kodlayan genlerin gen ifadesine etkisi RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Bu amaçla CRL-2076 hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmış, elde edilen RNA'lardan cDNA sentez kiti ile cDNA sentezlenmiştir. Ardından elde edilen cDNA'lar kullanılarak RT-qPCR için reaksiyon kurulmuş ve plaka cihazda okutulduktan sonra kantitatif değerler incelenerek sonuçlar yorumlanmıştır. RT-qPCR çalışmalarının değerlendirilmesi sonucunda KOHSK ekstraktının yaşlanma karşıtı aktivite gösterme potansiyelinin olup olmadığı değerlendirilmiştir.

1.3 Hipotez

Bitki hücre kültürleri, çok çeşitli fitokimyasalları sentezleme yeteneğine sahip olduğundan kozmetik bileşenler olarak kullanım potansiyeline sahiptirler. Son yıllarda kozmetikte karbon ayak izi düşük, işlevsel ve güvenli doğal ürünler kullanılması tercih edilmektedir. Bu talep aktif kozmetik bileşenlerin üretiminde bitki hücre kültürü kullanılması amacıyla bitki hücre kültürü çalışmalarında dikkate değer bir ilerleme olmasını sağlamıştır [4],[10]. Bitki biyoteknolojisi geleneksel yöntemlerle elde

edilemeyen konsantrasyonlarda sekonder metabolitler açısından zenginleştirilmiş bitki ekstraktlarının elde edilmesine olanak sağlar [4],[6]. Hücre süspansiyon kültürlerinden farklı tipte kozmetik aktif bileşenler geliştirilmiş ve üretilmiştir [6].

Karakafes otu allantoin, rosmarinik asit, terpenoidler, triterpenler, flavonoidler, tanenler gibi çok çeşitli biyoaktif bileşenler içerir. Yapılan çalışmalarla karakafes otu kökü ekstresinin tahriş önleyici, nemlendirici ve iltihap önleyici, yara iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir [15],[16].

Literatürde mevcut çalışmalar değerlendirildiğinde bitki hücre kültürü teknikleri ile elde edilen karakafes otu ekstraktının yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip kozmetik aktif hammaddesi üretim potansiyeli için çalışma yapılmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında karakafes otundan hücre süspansiyon kültürü elde edilmesi, elde edilen hücre süspansiyon kültüründen yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip ekstrakt elde edilmesi amaçlanmıştır. Literatürde yaşlanma karşıtı aktivite ilgili hücrelerde gen ve protein düzeyinde incelenerek belirlenmektedir. Bu nedenle elde edilecek ekstraktın CRL-2076 hücrelerinde yaşlanma gen ifadesine etkisinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. KOHSK wkstraktının yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip olması için ilgili genlerin gen ifadesini değiştirmesi gerekir. Bu nedenle KOHSK ekstraktının COL1A1, ELN ve HAS3 genlerinin gen anlatımına etkisi RT-qPCR ile belirlenerek yaşlanma karşıtı aktiviteye sahip olup olmadığı değerlendirilmiştir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Bitki Biyoteknolojisi

2.1.1 Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; bitki parçalarının aseptik şartlar altında yapay bir besin ortamı kullanılarak yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesini sağlayan *in vitro* kültür tekniklerini kapsar [1]. Bitki doku kültürü çalışmaları 1900'lü yılların başında başlamıştır [5]. 1902 yılında Alman botanikçi Gottlieb Haberlandt, bitki hücresi ve doku kültürlerinin kullanımının temelini oluşturarak tekli bitki hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültüre alınabileceğini ileri sürmüştür [28]. Totipotensi (toplam güç) olarak adlandırılan bu görüşe göre; her bitkinin başlangıç hücresinde bütün bir bitkinin toplam genetik potansiyeli kodlanmıştır. Bu nedenle uygun şartlar sağlandığında bir bitkinin tek bir hücresinden rejenarasyon ile bütün bir bitki elde etmek mümkündür [5],[2],[29]. Bu teorinin ispatı için Haberlant tarafından birçok çalışma yapılmıştır ve 1965 yılına gelindiğinde tek bir hücreden bitki jenarasyonu gerçekleştirilerek Haberlant'ın totipotensi teorisi kanıtlanmıştır [1],[5],[28].

1934 yılında Fransız bir bilim insanı olan Roger J. Gautheret, havuç kambiyal dokularının kültürlemiş ve bu çalışmalardan önemli sonuçlar elde etmiştir. Yine aynı yıl Philip White domates köklerini kültürlemeyi başarmıştır. Hem White hem de Gautheret elde ettikleri kültürleri belirli aralıklarla taze besin ortamında alt kültürlemiş ve yaklaşık 6 yıl boyunca kültürlerin canlı kalmasını sağlamışlardır. Yapılan bu çalışmalarla, kültürlerin oluşturulduktan sonra alt kültüre alınarak uzun bir süre boyunca canlı tutulabileceği gösterilmiştir [1],[3],[28].

1962 yılında Toshio Murashige ve Skoog, MS besin ortamı olarak bilinen ve şu anda doku kültürü için en yaygın kullanılan ortam olan bir bitki doku kültürü ortamı yayınlamıştır. MS besin ortamı, bitkilerin büyümesi için ihtiyaç duyduğu tüm besin maddelerini nispi oranlarda içerdiği için birçok kültür için idealdir. Murashige ve Skoog'un 1962'de yayınladığı bu makale bitki biyolojisinde en çok alıntı yapılan makalelerden biri olmaya devam etmektedir [1],[28].

Başarılı bir doku kültürü çalışması gerçekleştirilebilmesi için en önemli basamak sterilizasyon ve steril bir çevrenin sağlanmasıdır [5]. Doku kültürü çalışmaları; yapılacak çalışmalara uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması, çalışmaya uygun besin ortamının seçimi, besin ortamının hazırlanması ve sterilizasyonu, kültüre alınacak bitki eksplantının orijinini oluşturacak bitkinin seçimi, eksplantın sterilizasyonu, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması, kallus veya hücre süspansiyon kültürlerinden (dolaylı) veya somatik ya da gametik hücrelerden (doğrudan) bitki rejenarasyonunun uyarılması, somatik embriyoların olgunlaştırılması, oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve sürgünlerin uzatılması ve sürgünlerin köklendirilmesi ve bitkilerin seraya aktarılması (aklimatizasyon) şeklinde birçok basamaktan oluşur [1],[5].

Kallus kültürü, hücre süspansiyonu kültürü ve bitki rejenerasyonu gibi bitki doku kültürü çalışmalarında en öncelikli aşama çalışmalarda kullanılacak besin ortamlarının seçimidir. Farklı araştırıcılar tarafından bildirilen birçok besin ortamı formülasyonu mevcuttur. MS (1962), WH (1963), LS ortamı (1965), B5 (1968), NN (1969) ve SH (1972) gibi besin ortamları sıkça kullanılan besin ortamlarındandır. Bu besin ortamları dışında farklı bitki türleri için geliştirilmiş çok özel besin ortamları da mevcuttur [1],[28].

Bitki besin ortamlarında bulunan bileşenler su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, şekerler, jel yapıcı maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, aminoasitler, kimyasal olarak tanımlanamayanlar, organik asitler, antibiyotik ve diğer bileşenler şeklinde sıralanabilir. Bu bileşenlerin hepsi aynı anda her besin ortamında bulunmaz ve besin ortamı bileşenleri kültür gereksinimlerine göre belirlenir [1].

2.1.1.1 Makro Elementler

Besin ortamı içindeki en önemli bileşenlerden birisi azottur ve besin ortamlarında NH_4^+ ve NO_3^- gibi farklı formlarda kullanılabilir [1]. Bazı besin ortamlarında yüksek oranda azot bulurken bazı besin ortamlarında çok düşük oranda azot bulunur ya da hiç bulunmaz [1]. Fosfor, bitki biyokimyasında hayati bir öneme sahiptir, ko-enzimler, fosfolipidler ve nükleik asitler gibi çok sayıda makromolekülde yer alır. Potasyum metabolize olmaz, hücrelerin ozmotik potansiyeline önemli ölçüde katkıda bulunur. Sodyum iyonları (Na^+) çoğu durumda büyüme ve gelişme için gerekli olmasa da bitkiler tarafından alınır. Magnezyum klorofil yapısında bulunur; ayrıca birçok enzimin aktivitesi için gereklidir [30],[31]. Kükürt besin ortamında SO_4^{2-} formunda bulunur ve kültürdeki bitkiler tarafından bu formda emilir. Sülfür, bitkiler tarafından lipit sentezinde ve S-S

köprülerinin oluşumu yoluyla proteinlerin yapısının düzenlenmesinde kullanılır. [31]. Kalsiyum, büyük bir katyon olarak, bitki içindeki anyonları dengelemeye yardımcı olur, ancak potasyum ve magnezyumdan farklı olarak, kolayca hareket etmez. [30],[31]. Klorür iyonu (Cl^-) turgor basıncını korur ve K^+, Mg^{2+} ve Na^+ gibi serbest katyonların seviyesindeki hızlı değişimleri dengeler [31].

2.1.1.2 Mikro Elementler

Temel mikrobesin metaller Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co ve Mo metabolik ve fizyolojik önemi olan bitki hücre proteinlerinin bileşenleridir.

Demir fotosentezde elektron taşıyıcıları olarak işlev gören ferredoksin proteinlerinin bir bileşenidir [30],[31]. Manganez, Mg^{2+} ile benzer kimyasal özelliklere sahiptir ve bazı enzim sistemlerinde magnezyumun yerini alabilir. Mn solunum ve fotosentezde yer alan metaloproteinlerin yapısına katılıt [30],[31]. Çinko ve molibden birçok farklı fonksiyona sahip kararlı metalo-enzimlerin bir bileşenidir. Molibden ve çinko eksikliği olan bitkiler azalmış klorofil içeriğine ve az gelişmiş kloroplastlara sahiptir [31]. Bor, plazma membran bütünlüğünde ve membran proteinlerini ve hücre duvarı sağlamlığını etkileyerek etkiler. Bakır, oksijenle reaksiyona giren enzimlere bağlanır. Kobalt, B12 vitamininin nükleik asit sentezinde yer alır [30],[31]. İyot, bitkilerin beslenmesi için gerekli bir element olarak kabul edilmez; ancak iyodür iyonu birçok doku kültür ortamına eklenmiştir. [31]. Silisyum (Si)'nin bitkilerin büyümesi için faydalı olduğu ve biyotik ve abiyotik stresi hafiflettiği gösterilmiştir [31].

2.1.1.3 Vitaminler

Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik etkiye sahip, bitki kültürlerinin sağlıklı gelişmesini sağlayan besin ortamı bileşenleridir. Normalde vitaminler bitkiler tarafından sentezlenir; ancak *in vitro* kültür şartlarında besin ortamına dışarıdan vitamin ilavesi gerekir. Kültürdeki bitkilerin vitamin ihtiyacını karşılamak için kullanılan en gerekli vitaminler thiamin (B_1), pridoksin (B_6) ve nikotinik asittir (B_3). Myo-inositol ve d-biotin (H) de bitki kültürlerininin büyümesini teşvik etmek için besin ortamlarına sıkça eklenir. Bu vitaminler dışında askorbik asit (C), a-tokoferol (E), d-pantotenik asit (B_5), riboflavin (B_2), retinol (A), folik asit (M) ve kolekalsiferol (D_3) vitaminleri de bazı çalışmalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir [1],[28].

2.1.1.4 Şekerler

Şekerler besin ortamının en önemli bileşenlerindendir. Bitkilerde karbonhidratların çeşitli temel işlevleri vardır. Şekerler solunum için gerekli substratlardır, birçok bileşiğin sentezinde rol oynarlar, makromoleküllerin yapı taşlarıdır. Karbonhidratlar birçok gelişim sürecini etkiler. *In vitro* koşullarda büyüyen kültürler (bitki, hücre ve dokular) yeterli miktarda karbonhidrat sentezi yapamadıkları için hazırlanan besin ortamlarına karbon kaynağı olarak şeker eklenir. Bitki doku kültürlerinde en çok kullanılan şeker sakkaroz olmakla birlikte glikoz, maltoz, sorbitol, rafinoz ve fruktoz kullanımı da mevcuttur [1],[28],[30].

2.1.1.5 Jel Yapıcı Maddeler

Kırmızı deniz alglerinden elde edilen çeşitli polisakkarit bileşimleri besin ortamlarını yarı-katı hale getirmek amacıyla kullanılır. Jel yapıcı maddeler olarak adlandırılan bu polisakkaritler besin ortamının diğer bileşenleri ile etkileşime girmez ve bitki hücreleri tarafından alınamaz. Agar, gellan gum, agaroz, jelatin, nişasta, aljinat ve silikajel bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan jelleştirici maddeler olarak sıralanabilir [1],[5].

2.1.1.6 Aminoasitler

Bitki doku kültürlerinde en çok kullanılan aminoasitler glisin, glutamin, arginin, aspartik asit, asparagin ve prolindir. Amino asitlerin L- formları biyolojik olarak aktiftir, bu nedenle bitki doku kültürlerinde aminoasitlerin L- formları kullanılmalıdır [1].

2.1.1.7 Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki hormonları bitki bünyesinde oluşan, büyüme ve gelişmeyi düzenleyen, iletişimi sağlayan ve çok düşük miktarlarda bile etkili olan bileşiklerdir. IAA, GA, absisik asit, etilen, zeatin ve zeatin ribozid bitkiler tarafından üretilen hormonlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda bitki bünyesinde büyümeyi teşvik edici maddelerin yanı sıra büyümeyi engelleyen maddelerin de sentezlendiği sonucuna ulaşılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri; büyümeyi teşvik edici (oksinler, giberellinler, sitokininler), büyümeyi engelleyici (absisik asit) ve olgunlaştırıcı olarak gruplandırılmıştır [1],[32],[33].

Oksinler hücre genişlemesini ve büyümesini sağlayan maddelerdir; fotoperiyodizm, doku gelişimi, köklendirme, apikal dominansi ve yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus oluşumunu ve somatik embriyo oluşumunu uyarabilirler; ayrıca hücre

süspansiyonlarının elde edilmesini sağlayabilirler. Oksinler ve sitokininler birlikte kullanıldıklarında sürgün rejenerasyonunu (organogenesis), somatik embriyo oluşumunu ve kallus oluşumunu uyarabilirler. Oksinler ve sitokininler hücre bölünmesini sağlar, bu nedenle bu iki hormon tipinin aynı anda kullanılmasıyla daha iyi büyüyen ve bölünen hücre kütlelerinin elde edilmesi sağlanabilir [1],[33].

Oksin grubu bitki büyüme düzenleyicileri indol grubu, fenoksi grubu, naftelen grubu ve benzol grubu olmak üzere dört gruba ayrılır. Oksin grubu bitki büyüme düzenleyicileri arasında 2,4 -Diklorofenoksi asit (2,4-D), naftelen asetik asit (NAA), indol asetikasit (IAA), indol butirik asit (IBA), pikloram ve 2,4,-5-Triklorofenoksi asetik asit (2,4,5-T) en sık kullanılanlardır [32],[33].

Sitokininler bitki dokularında özellikle hücre bölünmeleri esnasında oluşan kinin yapısındaki organik maddelerdir. Diğer hormonlardan farklı olarak hem bitkilerde, hem de hayvanlarda bulunur [34]. Sitokininler bitki ıslahı ve doku kültürü çalışmalarında sürgün çoğaltımı, bitki rejenerasyonu, yeniden farklılaşma ve hücre bölünmesi amacıyla kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan sitokininler kinetin, benzil adenin ve zeatindir. Sitokininler sürgün oluşumunu teşvik ederler ve sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesisi engellerler [1],[33],[34].

Bitki hormonlarının doz-tepkileri genellikle çan şeklinde bir eğri oluşturur. Bitki hormonlarının çok düşük bir konsantrasyonda eklenmesi bir değişikliğe neden olmaz ve çok yüksek bir konsantrasyonda eklenmesi de oluşacak yanıtı engeller. İstenilen teşvik edici etki sadece ara konsantrasyonlarda elde edilir [30].

2.1.1.8 Kültür Koşulları

In vitro kültürler ile çalışılırken kontrollü kültür şartlarının sağlanması zorunludur. Sıcaklık, ışık ve nem kontrol edilmesi gereken en önemli kültür şartlarındandır. Kültür odalarındaki sıcaklık kullanım amacına göre 18±2 °C, 22±2 °C ve 25±2 °C olacak şekilde ayarlanabilir. Kültür ortamının aydınlanma durumu yapılan çalışma ihtiyaçlarına göre önceden belirlenerek (genellikle beyaz serin floresan lambalar) ışıklandırma sağlanmalıdır. Işıklandırmada ışıklanma süresi ve zamanlaması (fotoperiyot) çok önemlidir. Kültürler fotoperiyotta tutulabileceği gibi sürekli ışıkta veya sürekli karanlıkta da tutulabilirler. Bununla birlikte hücre kültürlerinin (embriyogenik, kallus oluşumu, hücre süspansiyonları ve özellikle fenolik bileşikler üreten kültürler) ışıksız ortamda kültüre tutulması çalışmanın gidişatı için daha uygundur. Kültür odalarındaki nem

yüzdesi %50-70 aralığında bir değere ayarlanabilir; ancak kültürlerin sürekli yüksek neme maruz bırakılması da kültürlerin çok sulu bir görünüm kazanmasına neden olur [1],[28],[35].

Doku kültürleri çalışmaları için 22-25 °C sıcaklık, 25-50 µmol $m^{-2}s^{-1}$ ışık şiddeti, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık uygulamalı fotoperiyot ve %50-60 nem oranları yaygın olarak kullanılan kültür koşullarıdır [1],[28].

2.1.2 Kallus Kültürü

Kallus kültürleri organize olmamış hücre kümeleri olarak tanımlanabilir. Kallus kültürü elde edilmesinde ilk basamak kültüre alınacak ana bitkiden bölünme özelliğini kaybetmemiş bitki materyalinin (organ veya doku) seçimidir. Kallus kültürünü oluşturmak için uygun bitki materyali (eksplant) seçimi yapılır [4]. Eksplant bitkiden ayrıldıktan sonra sonra sterilize edilir ve aseptik koşullar altında bistüri ile yaralanır. Yaralanan eksplant makro elementler, mikro elementler, vitaminler, karbon kaynağı (genellikle sükroz) ve bitki büyüme düzenleyicileri içeren yarı-katı besin ortamına aktarılır ve uygun kültür koşulları altında inkübe edilerek kallus uyarımı sağlanır [1],[3].

Kallus oluşumu doğadaki bitkilerde kesilme, mekanik yaralanma, rüzgarla kırılma, böcek saldırısı, mikroorganizma istilası vb. gibi etkiler sonucu yaralanan bölgenin tamir edilmesi amacıyla oluşan, yaralanmış bitki dokusunun doğal olarak oluşturduğu cevaptır. Kallus oluşumu üzerinde kulllanılan ana materyalin sahip olduğu genotip, fizyolojik yaş, kullanılan eksplant tipi ve büyüklüğü gibi özelliklerin yanı sıra besin ortamının bileşimi, ışıklandırma ve sıcaklık gibi kültür koşulları oldukça etkilidir. En iyi kallus büyüme özelliği gelişmenin erken safhalarında ya da büyümenin hızlı olduğu bitki kısımlarından alınan eksplantlarda gözlemlenmektedir [2],[3]. Yaprak, hipokotil, kotiledon, gövde, çiçek, kök ucu, embriyo, petal, mikrosporlar, genç anterler gibi çok çeşitli bitki kısımları kallus oluşumu için başlangıç materyalleri olarak kullanılabilmektedir [2].

Eksplantlar farklılaşmamış hücre çoğalmasına elverişli koşullarda kültürlendiğinde kallus oluşur ve genellikle organogenezin olmadığı durumlarda kallus oluşumu daha çok teşvik edilir [28]. Kallus kültürünü oluşturmak için temel besin ortamı kulanımı yeterli değildir; bu nedenle oksin ve sitokinin bulunan besin ortamına ihtiyaç duyulur. Ayrıca kallus kültürünün oluşumunda ve büyümesinde oksin hormonlarının teşvik edici rol oynadığı ileri sürülmektedir [5],[28]. Kallus kültürleri *in vitro* olarak korunabilir ve doğru besin ortamı kullanıldığında sınırsız çoğalabilme potansiyeline sahiptir [4].

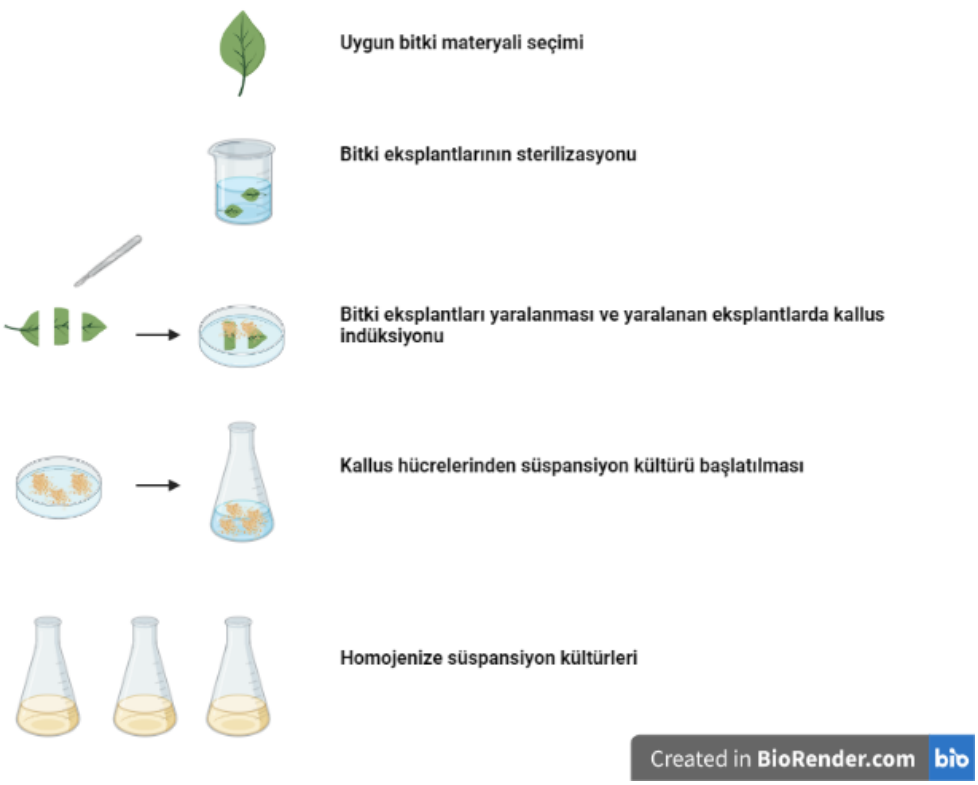
Kallus hücreleri canlılığını devam ettirdiği süre boyunca besin ortamında yer alan besin elementlerini kullanır ve besin ortamına metabolit salınımı gerçekleştirir. Kallus hücrelerinin canlılığının devam ettirilebilmesi için bu hücrelerin belirli zaman aralıklarıyla taze besin ortamına aktarılması gereklidir. Kallus kültürlerinin bu ihtiyaç doğrultusunda taze besin ortamın aktarılmasıyla hücreler alt kültüre alınmış olur. Böylece hücreler için hem besin elementleri ve su ihtiyacı karşılanır hem de hücreler tarafından besin ortamına salınan metabolitlerin toksik etkisi ortadan kaldırılır. Düzenli alt kültüre alınan kallus hücrelerinde belirli aralıklarla taze besin ortamı sağlandığı için hücrelerin daha iyi büyümesi sağlanır. Alt kültürleme zaman aralığı çalışılan bitkiye göre değişiklik göstermekle birlikte üç ila altı haftalık aralıklarla gerçekleştirilebilir. Kallus kültürü ve besin ortamı bileşimine bağlı olarak kallus kültürlerinin dört haftalık aralıklarla alt kültüre alınması hücrelerin büyümesi için daha uygundur [1],[36].

2.1.3 Süspansiyon Kültürü

Hücre süspansiyon kültürü sıvı besin ortamında tek hücrelerin veya küçük çaptaki hücre gruplarının elde edildiği bir hücre kültürü tekniğidir. Hücre süspansiyon kültürü kallus hücrelerinin bir devamı niteliği taşır ve kültür başlatılırken hızlı çoğalan, yumuşak ve gevşek yapılı kalluslar tercih edilir. *In vitro* ortama uyum sağlamış, belli bir büyüme stabilitesine sahip hücreler kallus kültüründen alınıp sıvı besin ortamına transfer edildiğinde çalkalamanın da etkisi ile birbirinden kolay bir şekilde ayrılır ve daha homojen dağılım göstererek sıvı besin ortamına daha çabuk adapte olurlar [1],[5].

Bir bitkinin bütün kısımları bir kallus kültürünü başlatmak için başlangıç materyali kullanılabilir; ancak ilgili biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi için ana bitki ve organ tipini seçmek oldukça önemlidir. İlgili biyoaktif bileşenlerin miktarı ve kalitesi bitki türüne, gelişim aşamasına, konumuna ve bitki organı türüne bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kültür ortamına eklenen büyüme düzenleyicileri (oksinler ve sitokininlerin bir kombinasyonu olan fitohormonlar) kırılgan, iyi çoğalan ve stabil olan yüksek performanslı bir kallus kültürü oluştururken dikkate alınmalıdır. Büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve kullanım miktarı kallus büyümesi ve morfolojisi üzerinde ve sekonder metabolit sentezi üzerinde bir etkiye sahiptir. Bu nedenle başlatılacak, sürdürülecek ve kitlesel çoğaltılacak farklı kallus hücre hatları arasında en umut verici adayları belirlemek önemlidir [1],[5],[6].

Hücre süspansiyon kültürü spesifik büyüme yüzeyini artırarak kütle transferini geliştirir ve erlendeki hücrelerin petri kabına göre daha yüksek büyüme hızına sahip olmasını sağlar, homojen olarak çoğalan bir bitki süspansiyon kültürü sağlamak için gereken zamanı azaltır. Ayrıca, kültür ortamının fitohormon tipi ve konsantrasyonu nitrojen, fosfat ve sükroz seviyeleri açısından farklı amaçlar için sıklıkla optimize edilir [6]. Murashige ve Skoog [37], Schenk ve Hildebrandt [38] veya Gamborg B5 ortamı [39] optimize edilen bu kültür ortamlarına örnek olarak verilebilir. Bitki hücre süspansiyonları, 2 ila 4 gün arasında tipik iki katına çıkma sürelerine ulaşır ve normalde yüzlerce hücreye kadar oluşan kümeler halinde büyürler. Kültürlerde hücre dışı polisakkaritlerin oluşumuna atfedilen agregat oluşumu, kültür sıvısının akışını değiştirebilir, kütle transferini sınırlayabilir ve hücre büyümesini ve ürün oluşumunu azaltabilir [6]. Hücre süspansiyon kültürü elde edilmesine kadar gerçekleştirilen aşamalar Şekil 2.1'de şematize edildiği gibidir.



Şekil 2.1 Hücre süspansiyon kültürü elde edilmesine kadar gerçekleştirilen aşamalar

2.1.4 Sekonder Metabolit Üretimi

Bitkiler primer ve sekonder metabolizma vasıtasıyla üretilen primer metabolit ve sekonder metabolit olarak adlandırılan iki ana metabolit grubu içerir. Primer metabolizma hücre yaşamının devamlılığı için gerekli olan bütün yolakları içerir ve primer metabolitler temel metabolik yolaklardaki ara ürünlerdir. Sekonder metabolitler ise farklılaşmış ya da özel hücrelerde bulunan, hücre için gerekli olmayan; ancak bitkinin çevresi ile etkileşiminde önemli bir role sahip olan bileşiklerdir [7],[8],[9].

Sekonder metabolitler bitkiler tarafından abiyotik (tuzluluk, kuraklık, yüksek ısı, UV ışınları, ağır metal gibi) ya da biyotik (böcek ve mikroorganizma gibi) uyaranlara maruz kalındığında üretilir [40]. Bitkilerdeki sekonder metabolitlerin dağılımı, birincil metabolitlerden çok daha sınırlıdır (%1 kuru ağırlıktan az) ve bir bileşik genellikle yalnızca birkaç türde, hatta bir tür içindeki birkaç çeşitte bulunur. Sekonder metabolitler toksik özellik gösterebilir; bu nedenle hücrede bulunan sekonder metabolitler vakuol ve özel keseciklerde depolanırlar [8].

Sekonder metabolitlerin üretilmesinde hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine göre daha avantajlıdır. Süspansiyon kültüründe hücreler kallus kültürlerine göre daha çabuk büyür ve morfolojik olarak daha homojen bir yapıya sahiptir. Böylece alt kültürleme işlemlerinde farklılaşma riski azdır. Hücre süspansiyon kültürlerinde farklılaşma ortadan kalktığı için metabolit birikimi orijinal doku ve hücrelere göre çok daha düşük düzeyde kalmaktadır. Bununla birlikte hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolitlerin bitkilerde üretilene yakın hatta daha yüksek oranda oranda üretimine dair yapılan çalışmalar da mevcuttur [1]. Sekonder metabolitler ilaç (farmasotik ürünlerin eldesi), zirai (insektisit ve herbsitlerin eldesi), kozmetik, tekstil ve gıda gibi öenmli alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir; bu nedenle ekonomik açıdan önem arz ederler [8].

1960'lar ve 1980'ler arasında, bitki hücre kültürlerini kitlesel olarak çoğaltmak ve ilaç, gıda ve kozmetik endüstrileri için sekonder metabolitler sağlayan biyoprosesler geliştirmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bitki hücre kültürlerine dayanan farklı ticari sekonder metabolitler (örneğin, şikonin, skopolamin, protoberinler, rosmarinik asit, ginseng şaponinler ve immün sistemi uyarıcı polisakkaritler), 1980'lerin başı ile 1990'ların sonu arasında piyasaya girmiştir [6].

Bitkilerden sekonder metabolitlerin üretilmesinde çevresel faktörler, üretici ülkelerdeki siyasi ve iş gücü istikrarsızlıkları, ürün kalitesinde kontrol edilemeyen değişiklikler, ürünün depolanması ve işlemesindeki kayıplar nedeniyle problemler yaşanmaktadır. Bunun yanı sıra bitkilerden türetilmiş bileşiklerin kimyasal sentezi genellikle ekonomik olarak uygun değildir [8]. Bitki hücre kültürlerinde değerli sekonder metabolitlerinin üretimini sağlamak amacıyla tüm bitki materyalinin ekstraksiyonuna yerine kullanılabilecek ilgi çekici bir tekniktir. Pfizer Inc., hücre kültürleri tarafından metabolitlerin üretimi için ilk patenti 1956'da sunulmuştur. Hücre kültürlerinden bitkinin tamamına göre daha büyük miktarlarda visnagin ve diosgenin izole edilmiştir. 1978'de Zenk (1978), bitki hücrelerinin metabolik kapasitelerini göstermiş ve bitki hücrelerinin biyosentez kapasitesinin değişkenliğini vurgulamıştır. Bu doğal değişkenlik, endüstriyel ölçekte kullanılmak üzere yüksek verimli kültürleri tanımlamak için kullanılmaktadır. 1970'lerin sonlarından bu yana, bu alandaki araştırma geliştirme çalışmalarında ve dosyalanmış patent başvurularının sayısında yüksek bir artış göstermiştir. 1983'te şikonin endüstriyel ölçekte ilk kez Mitsui Petrochemical Industries Ltd. tarafından bitki hücre kültürleri ile üretilmiştir. Şu anda, bitki hücre kültürünün doğrudan ticari uygulamaları olduğu kadar hücre biyolojisi, genetik ve biyokimyaya yönelik temel araştırmalarda değeri vardır [8].

Tablo 2.1'de de gösterildiği gibi bazı metabolitler bitki hücre kültürlerinde ana bitkilerdekilere kıyasla daha yüksek bir konsantrasyonda üretilebilir. Bu durum bütün bitki yetiştirme yerine bitki hücre kültürü teknolojisi kullanılarak metabolitlerin üretimininin sağlanabileceğini göstermektedir.

Tablo 2.1 Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus ve süspansiyon kültürleri ile fitokimyasalların üretilmesi [35]

Bitki Adı	**Üretilen Fitokimyasal**
Abrus pecatorius	Glisirizin
Arachis hypogaea	Resveratrol
Arnebia euchroma	Şikonin

Tablo 2.1 Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus ve süspansiyon kültürleri ile fitokimyasalların üretilmesi (devamı) [35]

Bitki Adı	**Üretilen Fitokimyasal**
Brugmansia candida	Hiyosiyamin
Brugmansia suaveolens	Tropan alkaloidleri
Calendula officialis	Oleanolik asit
Calypogeia granulata	1,4-dimetilazulen
Camptotheca acuminata	Kamptotesin ve 10-hidroksikamptotesin
Carthamus tinctorius	Alfa tokoferol
Chrysanthemum cinerariefolium	Kersetin
Coleus blumei	Rosmarinik asit
Datura stramonium	Tropan alkaloidleri
Ginkgo biloba L	Ginkgolid B and ginsenosit
Glycine max	Apigenin, daidzein, genistein ve luteolin
Glycyrrhiza glabra	Soyasaponin
Hypericum perforatum	Hiperisin and hiperforin
Linum flavum	Podofilotoksin
Lithospermum erythrorhizon	Şikonin ve rosmarinik asit
Ocimum basilicum	Rosmarinik asit

Tablo 2.1 Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus ve süspansiyon kültürleri ile fitokimyasalların üretilmesi (devamı) [35]

Bitki Adı	**Üretilen Fitokimyasal**
Panax ginseng	Şaponin
Podophyllum hexandrum	Podofilotoksin
Rauwolfia serpentina	Ajmalin, serpentin and reserpin
Rubia tinctorum	Tropan alkaloidleri
Salvia miltiorrhiza	Rosmarinik asit, salvianolik asit B ve diterpenoid tanshinon
Saussurea medusa	Flavonoidler
Silybium marianum	Silmarin
Solidago chilensis	Klorojenik asit ve rutin
Taxus baccata	Paklitaksel
Taxus chinensis	Paklitaksel
Vitis vinifera	Stilben, resveratrol ve antosiyaninler

Farklılaşmamış ve farklılaşmış bitki hücre kültürlerinin büyük ölçekli ekimi, teknolojik, ekonomik ve yasal nitelikteki çeşitli zorluklarla bağlantılıdır. Bununla birlikte bitki biyoteknolojisi kontrollü bir ortam altında bitki hücrelerinin, doku ve organ kültürlerinin *in vitro* büyümesi, nadir, endemik, korunan, tehdit altındaki veya tehlike altındaki bitki türleri tarafından bile değerli bitki bileşenlerinin sürdürülebilir tedariki için en umut verici çevre dostu teknolojidir. Bitki hücre kültürü teknolojisi, yakın gelecekte biyoaktif doğal bileşiklere yönelik sürekli artan talebi karşılama potansiyeline sahiptir [10]. Sıvı ortamda

inkübe edilen bitki hücre kültürleri büyük hacimlere yükseltilebilir ve kozmetik de dahil olmak üzere endüstriyel uygulamalar için ticari olarak ilgi çekici bileşiklerin üretiminde kullanılabilirler [4].

Biyoreaktörler; hücrelerin aseptik koşullar altında optimum pH, sıcaklık, oksijen ve diğer çevre koşullarının kontrol edilerek çoğaltılmasını sağlayan çeşitli reaksiyonların gerçekleşebildiği kapalı kaplardır [41]. Hücre süspansiyon kültürlerinin, başlangıçta küçük hacimde biyoreaktörde kültür koşullarının optimize edilmesi, ardından büyük ölçekli biyoreaktör sistemlerinde çoğaltımının sağlanması ticari açıdan büyük önem taşımaktadır [41],[42]. Farmasötik ürünler ve aktif maddeler genellikle bakteri, maya, bitki veya memeli hücrelerinin 75.000 L'ye kadar kapasiteye sahip büyük ölçekli biyoreaktörlerde (örneğin: Phyton Biotech, ABD tarafından üretilen Taxol) yetiştirilmesiyle başlayan ve çok karmaşık bir down proses prosedüründe aktif maddelerin izolasyonu, arıtılması ve konsantre edilmesi ile devam eden biyoteknolojik işlemlerle üretilir. Biyoteknoloji ve bitki hücre kültürü teknolojisi ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen kozmetik alanında henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır [12].

2.1.5 Bitki Hücre Kültürü ve Kozmetik

Günümüzde kozmetik şirketleri, biyolojik değeri yüksek ve çevre dostu oldukları için yeni teknolojilerle üretilen özellikle bitkisel kaynaklı hammaddeler üzerinde çalışmaktadırlar [43]. Kozmetik araştırma ve geliştirme grupları çok sayıda spesifik aktiviteye sahip yeni ürünlerin geliştirilmesi için bitki hücre kültüründen türetilmiş aktif bileşenlerin geliştirilmesi çalışmalarını yürütmektedirler. Bu tür ürünlerin çoğu, kozmetik ürünün pazarlama pozisyonuna ve iddialarına da katkıda bulunan aktif bileşenler olarak tanımlanır [10],[12].

Bitki hücre kültürleri, farmasötikler, gıda katkı maddeleri ve kozmetik bileşenler olarak kullanılan çok çeşitli fitokimyasalları sentezleme yeteneğine sahiptir. Çoğu araştırma farmasötik açıdan önemli bileşiklerin üretimine odaklanmış olsa da, son yıllarda aktif kozmetik bileşenlerin veya gıda katkı maddelerinin üretiminde kullanılan bitki hücre kültürü teknolojilerinin geliştirilmesinde de dikkate değer bir ilerleme olmuştur [10].

Bitki hücre hacminin %55'i hücre duvarı ve zarlardan oluşur. Geri kalanı farklı organellerin konumlandığı ve %90 sudan oluşan sitozoldür. Yaşam döngüsü boyunca bitkiler farklı hücre bölmelerinde depolanan, farklı kimyasal yapılara sahip (örneğin,

yağda çözünen veya suda çözünen) çeşitli metabolitler üretir. Bitki hücresi özütlerinin hazırlanması, istenen spesifik bileşikler açısından zengin bileşenler elde etmek için kritik öneme sahiptir [4]. Aktif bileşenlerin üretiminin yanı sıra biyoteknoloji, doku mühendisliği ve ürün güvenliği ve iddia testi için moleküler yaklaşımlar gibi diğer kozmetik araştırma alanlarında da giderek daha önemli hale gelmektedir [12].

Bitki hücre kültürü teknolojisi geleneksel yöntemlerle elde edilemeyen konsantrasyonlarda, spesifik olarak istenen sekonder metabolitler açısından zenginleştirilmiş bitki ekstraktlarını elde etmek için de kullanılabilir. Bu durumda, hücreler bu nedenle "biyo-fabrikalar" olarak kullanılır, en iyi büyüme koşullarına yerleştirilir veya belirli sınıf bileşikleri aşırı üretmeye teşvik edilir Bitki hücre kültürü ekstraktlarının bir diğer önemli özelliği, çok çeşitli aktif bileşikler içermeleri ve çoğu durumda bitki ekstraktlarında bulunanlardan daha yüksek konsantrasyonlarda olmalarıdır. Bitki hücre özütleri kozmetik preparatlarda minimum konsantrasyonlarda kullanılsalar bile sinerjik bir şekilde hareket ederek belirli aktiviteleri gösterebilirler [4],[12].

Kültür ortamında sentetik fitohormonların (2,4-diklorofenoksiasetik asit, 6-bezylaminopurine, N6-furfuryladenine) doğal fitohormonlarla (indol-3-asetik asit, zeatin) değiştirilmesi ve fitohormon elisitörlerinin uygulanması (jasmonik asit, metil jasmonat, salisilik asit) kozmetik ve gıda sanayi temelli ürünlerde daha fazla etken madde eldesi için kullanılmaktadır. Kozmetik ve gıda endüstrileri için bitki hücre kültürü ekstraktlarının formülasyondaki son kullanımlarının toksikolojik bir kaygı oluşturmaması önemlidir. Nihai üründe çok düşük konsantrasyonlarda bulunan ek bileşenlerin olması durumunda tüketici için bir risk senaryosu oldukça düşüktür [6].

Kozmetik endüstrisinde bitki hücre kültürüne dayanan birkaç *in vitro* proses kurulmuştur. Bu tür ticari olarak temin edilebilen ürünlere kozmetik pigment olarak şikonin (*Lithospermum erythrorhizon'*dan üretilmiştir, Mitsui Petrochemical Industries, Japonya), beyazlatıcı bileşen olarak arbutin (*Catharanthus roseus*'tan üretilmiştir, Mitsui Petrochemical Industries, Japonya) ve kozmetik pigment olarak carthamin (*Carthamus tinctorius'*tan üretilmiştir, Kibun, Japonya) örnek olarak verilebilir [12],[44]

2.2 *Symphytum officinale* L.

Karakafes otu geleneksel tıpta kullanılır ve iğ biçimli dallı köklü, çok yıllık, yarı gür bir bitkidir. Karakafes otu kökü ve bitkinin diğer kısımları 2.000 yıldan fazla bir süredir tıbbi bir bitki olarak değerlenmektedir [15],[18].



Şekil 2.2 *Symphytum officinale* L.- HEYNS 1888'den sonra [45]

Karakafes otu kökü, yüzyıllardır ağrılı kas ve eklem şikayetlerinin tedavisinde geleneksel bir şifalı bitki olarak kullanılmıştır ve geleneksel tıpta kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri ile bilinmektedir [13],[15]. Karakafes otu kullanımı ilk kez eski Romalılar ve Yunanlılar tarafından belgelenmiştir. MS 200 civarında Dioscorides, Materia Medico kitabında karakafes otunun terapötik kullanımlarını anlatmıştır. Orta Çağ boyunca karakafes otu kırık kemikleri iyileştirmek için popüler olmuştur [14].

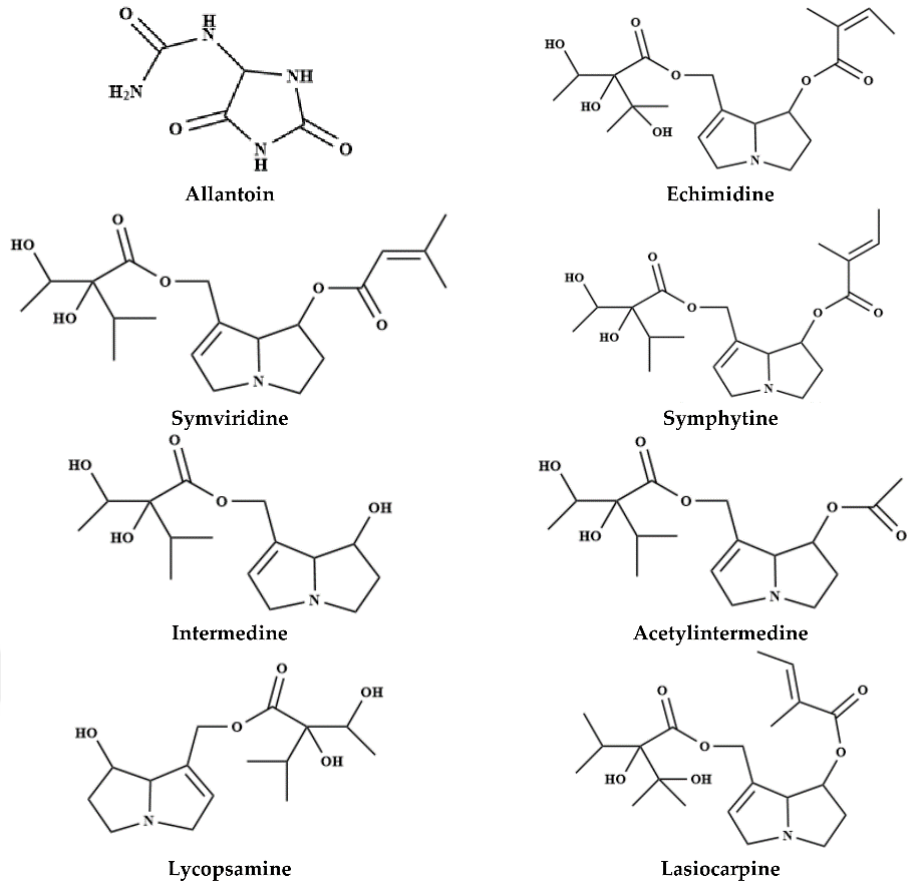
Karakafes otu kökü ekstrelerinin temel aktivite belirleyici bileşenleri ve moleküler etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır. Allantoin ve rosmarinik asit, farmakodinamik etkileri açısından muhtemelen merkezi öneme sahiptir. Alman

Komisyonu E karakafes otundan türetilen Symphyti radix'i çürükler, incinmeler ve burkulmalarda harici kullanım için olumlu olarak değerlendirmiş ve anti-inflamatuar olarak kabul etmiştir. Ayrıca karakafes otu kökü için bir Avrupa Fitoterapi Monografı (ESCOP) Bilimsel Kooperatifi mevcuttur. ESCOP, karakafes otu kökünün tendinit sendromu, diz eklemi yaralanmaları, aktif olmayan diz ekleminde kireçlenme, böcek ısırıkları, mastitis, kırıklar ve cilt iltihabı için de kullanıldığını belirtir [14]. Karakafes otu kökü ekstresi doku rejenerasyonunu sağlar, büzücü etkiye sahiptir [13].

Günümüzde yapılan çalışmalarla elde edilen modern klinik veriler karakafes otu kökü preparatlarının geleneksel topikal uygulamasını doğrulamaktadır. Yakın zamanda yapılan birkaç randomize klinik çalışma ile dejeneratif artrit, sırtta akut miyalji, burkulmalar, kontüzyonlar, spor yaralanmaları ve 3 yaş ve üzeri çocuklarda ağrı, iltihaplanma ve şişme tedavisinde etkinliği doğrulanmıştır. Karakafes otu kökü kas ve eklem ağrısı olan hastalar için etkili bir tedavi seçeneğidir [13].

Karakafes otu akut yaralanmalar, kırıklar, şişmiş morluklar, varis ülserleri ve yanıklar için iyileştirici teşvik eder, antiinflamatuar, analjezik ve anti-ödem aktivitelerine sahiptir. Hasarlı dokuların tedavisinde, artrit, romatizmal ağrı ve kolay iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılır [15],[16]. Karakafes otu ekstraktlarının farmakolojik etkileri, birkaç kimyasal bileşiğe atfedilir [15],[16],[18]. Karakafes otunun iyileştirici etkisi, allantoin ve içerdiği polisakkaritlerin varlığına atfedilmiştir [18].

Karakafes otu bitkisi karbonhidratlar (arabinoz, glukuronik asit, mannoz, ramnoz, ksiloz, glikoz, fruktoz) tanenler (%2,4 oranında), triterpenler (fitosteroller, steroidal saponinler, izobauerenol, triterpen saponinler semptoksit A, kaulosid D, leontosid A, leontosid B ve leontosid D), alkoloidler (karakafes otu köklerinde %0,2-0,4 pirolizidin alkaloidleri bulunur) ve diğer bileşenleri (%0,75-2,55 allantoin, %0,63 karoten, %0,2 rosmarinik asit, %0,037 klorojenik asit, %0,035 kafeik asit, kolin, litospermik asit, salvianolik asit türevleri, A ve B12 vitaminleri, glikopeptid, aminoasit, kalsiyum, potasyum ve fosfor hidroksi benzoik asit, gallik asit) içerir [14],[15],[18],[46].



Şekil 2.3 Karakafes otu karbonhidratlar, tanenler, amino asitler, allantoin, polisakkaritler, triterpenler, steroller, fenolik bileşikler ve pirolizidin alkaloidleri gibi çok çeşitli kimyasal bileşenler içerir. [18]

Yapılan bir çalışmada karakafes kökü ekstresinin biyolojik aktivitesinin yalnızca ekstraktın en aktif bileşiklerinden biri olan allantoine atfedilemeyeceği, etkinin karakafes otu ekstresinde bulunan farklı aktif bileşiklerin etkileşiminin sonucu olduğunu gösterilmiştir [15]. Karakafes otundan elde edilen polisakkaritler tahriş önleyici, nemlendirici ve iltihap önleyici etki gösterir [15]. Karakafes otu kök özütünün içerdiği allantoin ve fenolik asitler (Rosmarinik, p- hidroksibenzoik, kafeik, klorojenik ve p-kumarik asitler vd.) insan derisi fibroblastlarında olumlu bir etki göstermenin yanı sıra kayda değer antioksidan etkiler sergiler [18]. Karakafes otu antioksidan aktiviteye sahip zengin bir rosmarinik asit kaynağıdır ve son zamanlarda antioksidanların iltihaplanmanın engellenmesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu ve böylece yara iyileşmesini destekleyebileceği kanıtlanmıştır [17].

Karakafes otunun sahip olduğu antiinflamatuvar etkisinin, hücre çoğalmasını ve doku yenilenmesini uyaran allantoin ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Karakafes otu doğrulanmış antioksidan aktiviteye sahip zengin bir rosmarinik asit kaynağıdır ve son

zamanlarda antioksidanların iltihaplanmanın engellenmesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu ve böylece yara iyileşmesini destekleyebilecekleri kanıtlanmıştır. [47]. Yapılan bir çalışmada, karakafes otu kök özütünün insan derisi fibroblastları (HSF) üzerinde faydalı etkileri olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada karakafes otu kökü ekstraktının topikal bir preparat olarak güvenli olduğu ve yüksek miktarlarda antioksidatif bileşikler nedeniyle yaralı cilt dokusunu koruyabileceği ve yara iyileşmesini hızlandırabileceği öne sürülmüştür [17].

Yapılan bir çalışmada karakafes otu yaprak ekstresi yüklü gümüş nanopartiküllerin, fotokoruyucu potansiyeli nedeniyle ciltte fotoyaşlanmaya karşı bir ajan olarak kullanılması önerilmiştir [48]. Bir başka çalışmada karakafes otu yapraklarından elde edilen özütlerin mantar patojenleri üzerinde büyük bir inhibisyon sergilediği ve bitki savunma mekanizmalarını modüle ettiği gösterilmiştir. Karakafes otu özleri üzerine yapılan çalışmalarda bu bitkinin zararlı böcek ve hastalıkların yönetiminde kullanılabileceğini bildirilmiştir. Karakafes otunun antifungal aktivitesine ek olarak, sığır mastitine neden olan bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi de bildirilmiştir [18].

Yapılan bir diğer çalışmada karakafes otu kökünün hidroalkolik ekstraktının endotel hücrelerinde IL-1 ile indüklenen E-selektin ekspresyonu üzerindeki etkisinin analiz edilmesi için bir *in vitro* model kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre karakafes otu özütü, mRNA ve protein seviyesinde E-selektin ekspresyonunu azaltmış; aynı zamanda, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi transmigrasyonda yer alan ilave hücre yapışma molekülleri dahil olmak üzere iltihaplanma sürecine dahil olan diğer birkaç genin ekspresyonunu da azaltmıştır. Bu çalışma ile karakafes otu *in vitro* anti-inflamatuar özellikler gösterdiği doğrulanmıştır [49].

Karakafes otu tıbbi uygulamalarının yanı sıra toksisite, pnömotoksisite, genotoksisite ve karsinojenite ile ilişkili bazı pirolizidin alkaloidleri içerir; ancak harici kullanımında hiçbir advers olay rapor edilmemiştir [18].

2.2.1 Allantoin

Glioksildiüreid ya da üreidohidantoin-5 olarak da tanımlanan allantoin ($C_4H_6N_4O_3$) pürin metabolizmasınının son ürünüdür ve yüksek miktarda üre içerir. Karakafes otu kökünün farmakolojik olarak en aktif bileşeni allantoindir ve bu oran %0,6-0,8'tir [15],[16].

Allantoin cilt yumuşamasında ve cilt hücrelerinin yenilenmesinde aktif rol oynar [14]. Korneositler cildin en dış yüzeyi olan stratum corneum tabakasının %80'ini oluşturur. Bu

katman hücrelerarası lipid tabaka içine gömülü, keratinle dolu ve yassı korneositlerden oluşur [50]. Desmozomlar korneositlerin diğer hücrelere yapışmasını sağlar. Allantoin korneositlerin kaldırılmasında etkin rol alır. Bu işlemi korneosit hücrelerinin arasını gevşeterek ve desmozomları kaldırarak gerçekleştirir [14]. Allantoin hasarlı hücreleri temizler, yüzeyin pürüzsüz, yumuşak ve parlak olmasını sağlar; hücre dışı matriksin su içeriğini, cildin pürüzsüzlüğünü, hücre çoğalmasını ve yara iyileşmesini arttırarak cilt tahrişini önler. Allantoin hücre bölünmesini tetiklemekten sorumludur ayrıca konjonktif doku, kemik ve kıkırdak büyümesini teşvik eder [14],[15],[18].

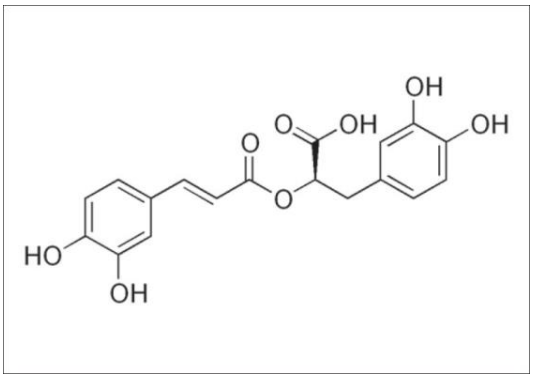
Allantoin epitelleşmeyi ve hücre çoğalmasını teşvik eder ve yaralar üzerinde yeniden sağlıklı doku büyümesini hızlandırır. Allantoin yumuşatıcı ve yatıştırıcı özelliklere sahiptir ve inflamasyonu azaltarak ciltte tahrişi azaltmaya yardımcı olur [51]. Allantoinin ayrıca antioksidan aktiviteye de sahip olduğu bilinmektedir [14].

Allantoin bu özelliklerden dolayı kozmetik endüstrisinde çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. (örn. losyonlar, kremler, güneş ürünleri, şampuanlar, rujlar ve çeşitli aerosol preparatları) Topikal farmasötik preparatlarda olduğu gibi cilt hastalıklarının tedavisi için yıllarca kullanılmıştır [47]. ABD Gıda ve İlaç İdaresi, allantoinin %0,1-2 konsantrasyonlarının cildi korumak için güvenli ve etkili bir madde olduğunu belirtmiştir [15].

2.2.2 Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit ve türevleri, kafeik asidin esterleştirilmesi yoluyla fenilalaninden ve 3,4-dihidroksifenilaktik asit yoluyla tirozinden sentezlenir. Rosmarinik asit, anti-enflamatuar, antibakteriyel, antioksidan, anti-tümör, anti-alerjik, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-aging, antidiyabetik, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, nefroprotektif ve antidepresan etkilere sahip geniş bir aktivite spektrumu gösterir [47],[52].

Rosmarinik asit, serbest radikallerden kaynaklanan hücre hasarını önlemeye yardımcı olur. Rosmarinik asidin, E vitamininden daha güçlü antioksidan ve anti-radikal özellikler sergilediği kanıtlanmıştır. Kozmetik uygulamalarda rosmarinik asidin UV radyasyonunu absorblama yeteneğini kullanılır. Rosmarinik asit biyolojik membranları stabilize eder, keratinositleri UVA ışığının zararlı etkisinden ve serbest radikaller dahil reaktif oksijen türlerinden (ROS) korur. Epidermiste stratum corneumun koruyucu işlevini etkileyerek cildin tahriş olmasını ve yaşlanmasını önler [53].



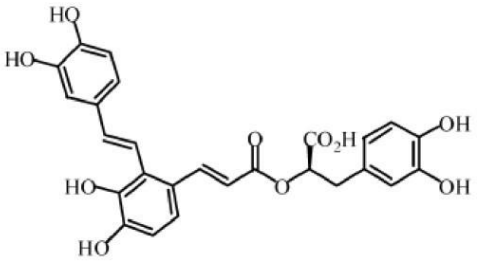
Şekil 2.4 Rosmarinik asitin yapısı [54]

Rosmarinik asit, bitki hücre kültürlerinde yüksek miktarlarda üretilebilir ve bu da ekonomik bir kullanım imkanı sunar [55]. Yapılan bir çalışmada karakafes kökü numunesinin fenolik profili, HPLCDAD-QTOF-MS/MS ile karakterize edilmiş ve rosmarinik asit ana fenolik bileşen olarak tanımlanmıştır [56].

2.2.3 Salvionik Asit ve Türevleri

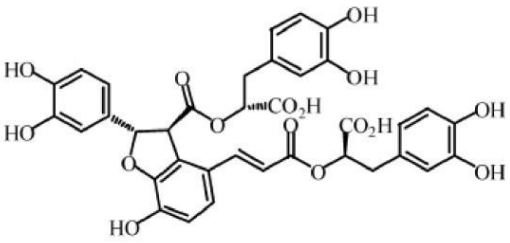
Salvianolik asitlerin, özellikle salvianolik asit A ve salvianolik asit B, polifenolik yapıları nedeniyle güçlü anti-oksidatif yeteneklere sahip olduğu bulunmuştur. Salvianolik asitlerin hepatik koruma nöral koruma ve kanser tedavisi üzerindeki terapötik potansiyeli son yıllarda önerilmiş olsa da, salvianolik asitlerin en büyük klinik etkisi kardiyovasküler korumadır [57]. Salvianolik asit ve türevlerinin büyük bir kısmının anti-inflamatuar, antioksidatif ve serbest radikal temizleme aktiviteleri gösterdiği ve hücreleri çeşitli zararlı faktörlerden koruyabildiği hem *in vitro* çalışmalarla hem de *in vivo* çalışmalarla ortaya konulmuştur. Salvianolik asitler, geleneksel Çin tıbbında kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için bin yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır [58].

Yapılan bir çalışmada karakafes otu kökü numunesinin fenolik profili HPLCDAD-QTOF-MS/MS ile karakterize edilmiş ve kafeik asidin trimerleri ve tetramerleri (salvianolik asit A, B ve C izomerleri) ilk kez karakafes otu kökünde tanımlanmış ve miktarları belirlenmiştir [56]



Salvianolic acid A

Molecular Formula: $C_{26}H_{22}O_{10}$
Molecular Weight: 494.45



Salvianolic acid B

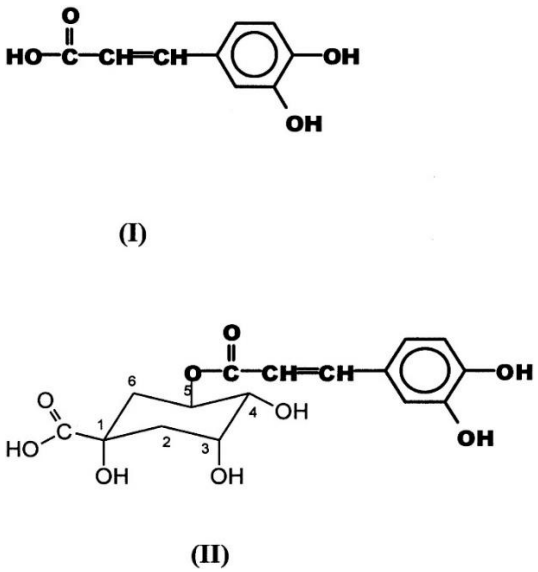
Molecular Formula: $C_{36}H_{30}O_{16}$
Molecular Weight: 718.6138

Şekil 2.5 Salvionik asit A ve B'nin kimyasal yapısı [57]

2.2.4 Klorojenik Asit ve Kafeik Asit

Klorojenik asit (CGA) doğal bir antioksidandır ve günümüzde uygulaması tıp, gıda işleme ve kozmetik kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [59]. Klorojenik asit, antioksidan, antibakteriyel, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, anti-inflamatuar, antipiretik, nöroprotektif, anti-obezite, antiviral, anti-mikrobiyal, anti-hipertansiyon, serbest radikal temizleyici ve merkezi sinir sistemi (CNS) uyarıcısı gibi birçok önemli ve terapötik rol oynayan önemli ve biyolojik olarak aktif polifenoldür. Bunların yanı sıra klorojenik asidin lipid ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemli roller üstlenebileceği ve böylece hepatik steatoz, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve obezite gibi birçok bozukluğun tedavisine yardımcı olabileceği tahmin edilmektedir [60].

Klorojenik asit, kafeik asit ile kinik asit arasında oluşan bir esterdir. Klorojenik asit, bağırsak mikroflorası tarafından kafeik asit ve kinik asit dahil olmak üzere çeşitli aromatik asit metabolitlerine hidrolize edilir. Klorojenik asit ve kafeik asit, aromatik bir kalıntı üzerinde visinal hidroksil gruplarına sahiptir ve bunlar ROS'lerini temizlemek olan *in vitro* antimutajenik, kanserojen ve antioksidan aktiviteler sergiler [61]. Kafeik asit ve türevleri, polifenol oksidazların iyi substratlarıdır ve belirli koşullar altında bitki dokularında veya bitki kaynaklı ürünlerde oksidasyona uğrayabilir [62].



Şekil 2.6 Kafeik asit (I) ve klorojenik asit (II) yapısı [63]

2.2.5 Pirilizodin Alkolidleri

Pirolizidin alkaloidleri (PA'lar), bitkinin kimyasal savunmasının bir parçası olarak yapısal olarak üretilen tipik bir bitki sekonder metabolit sınıfıdır [64]. Dehidropirrolizidin alkaloidleri potansiyel olarak hepatotoksik, pnömotoksik, genotoksik ve kanserojen etkiler gösterebilir [65].

Karakafes otunun dehidropirrolizidin alkaloidleri de içermesi nedeniyle çeşitli ülkelerdeki sağlık kuruluşları, gıda ve ilaç güvenliği kurumları karakafes otunun satışı ve kullanımına ilişkin düzenlemeler geliştirmiştir. Almanya'da, Federal Risk Değerlendirme Enstitüsü (BfR), dehidropirrolizidin alkaloidleri için bir risk değerlendirmesi yürütmüş ve maruziyetin mümkün olduğunca düşük tutulması gerektiği sonucuna vararak, tolere edilebilir günlük alımın, kg vücut ağırlığı başına 0,007 µg doymamış pirolizidin alkaloidleri ile sınırlandırılması gerektiği sonucuna varmıştır. Dünya Sağlık Örgütü, Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi, benzer endişeler ve tavsiyelerle benzer incelemeler gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak, düzenleyici kurumlar ve uluslararası sağlık kuruluşları karakafes otunun sadece harici kullanım için kullanılmasını tavsiye etmiştir [65].

ABD, Kanada ve Almanya, Danimarka ve Avusturya gibi bazı Avrupa ülkelerinde karakafes otu kullanımı sınırlandırılmıştır. Komisyon E, kullanımının 4-6 hafta/yıl ile sınırlandırılmasını önermektedir [18]

2.3 Cilt Yaşlanması

Deri, kendini sürekli yenileme yeteneğine sahip, vücudun en büyük ve yüzeysel organıdır [12],[20]. Deri vücudu dehidrasyon, yaralanma ve enfeksiyona karşı koruma amacı taşıyan çok katmanlı bir sistemdir [12]. Deri mekanik ve kimyasal saldırılar, ısı, enfeksiyonlar, su ve elektromanyetik radyasyon gibi dış etkenlere karşı koruma sağlar. Deri yüzeydeki epidermis ve derinlemesine dermis olmak üzere iki ana yapısal bölüme ayrılır. Her iki cilt bölmesi, iki bölmeyi fiziksel olarak ayıran ve dinamik bir arayüz kadar dengeleyici sağlayan, son derece özelleşmiş bir matris yapısı olan bazal membranın oluşumunda işbirliği yapar [19],[20].

İnsan cildinin yaşlanması epidermis ve dermisin tüm katmanlarını içeren biyolojik olarak bağımsız iki sürecin sonucudur [27]. İlki, tüm iç organları etkilediği gibi cildi de aynı şekilde etkileyen, önlenemez bir süreç olan içsel veya doğal yaşlanmadır. İkincisi de dış etkenlere, özellikle ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalmanın bir sonucu olan dışsal veya fotoyaşlanmadır. Doğal yaşlanmada yaşla birlikte ortaya çıkan hormonal değişiklikler, genetik, metabolik ve endokrin gibi içsel faktörler etkilidir. Östrojen ve androjen eksikliği, kolajen bozulması, kuruluk, elastikiyet kaybı, epidermal atrofi ve ciltte kırışıklık ile sonuçlanır [20],[21],[22].

Fotoyaşlanma süreci çevresel faktörlere, özellikle insan cildini farklı şekillerde etkileyen UV ışınlara maruziyet, hava kirliliği gibi dışsal faktörlere maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkar [20],[21]. UV maruziyeti, lipid peroksitler, hücre içerikleri ve enzimlerin oluşumu yoluyla bağ dokusunda meydana gelen değişiklikler ciltte fiziksel değişikliklere neden olur. UV maruziyeti, matris-metaloproteinaz (MMP'ler) ekspresyonunun artmasına, prokolajen sentezinin azalmasına, bağ dokusu hasarına ve ROS'ların önemli ölçüde artmasına neden olur. ROS, hücre sinyal molekülleri olarak protein hareket ederek mitokondriyal DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna, gen ve modifikasyonlarına neden olabilir. ROS, kolajenaz, elastaz ve hyaluronidazlar gibi enzimlerin aktivasyonunu başlatabilir. Cilt yaşlanmasının yıkıcı etkileriyle mücadele edilmesi için cilt yaşlanmasında rol alan farklı moleküler mekanizmalara odaklanılmıştır [23].

İçsel ve dışsal cilt yaşlanması moleküler mekanizmalarda benzerlik gösterirler. Örneğin; oksidatif hücre metabolizmasından kaynaklanan ROS her iki süreçte de önemli bir rol oynar. Bozulmuş kolajen seviyelerinin yükselmesi ve kolajen sentezinin azalması her iki

yaşlanma tipinde de meydana gelir [21]. Fibroblast sayısının azalması, derinin incelmesi, kolajen sentezinin azalması, dermal elastin yapısının bozulması, elastin sentezinin azalması ve elastikiyet kaybı gibi süreçler derinin yaşlanmasına neden olur. Bütün bu süreçler sonucunda cilt sıkılığını kaybeder ve ciltte gözle görülür kırışıklıklar meydana gelir [20].

Cilt yaşlanma sürecine çeşitli kompleks hücresel ve hücre dışı bileşenler katılır. Çeşitli çalışmalar yaşlanma sürecinde ROS tutulumunu, hücre dışı matrisin ve melanin pigmentasyonunun bozulmasını ve cilt keratin tabakalarının neminde bir azalma olduğunu vurgulamaktadır. Fonksiyonel yaşlanma karşıtı cilt koruyucu ajanların antioksidan, kırışıklık karşıtı, beyazlatma ve cilt nemlendirme etkilerine odaklanılmıştır [66]. Serbest radikaller cilt yaşlanmasında en aktif bileşikler olarak kabul edilmektedir. Serbest radikaller DNA'ya zarar verirler, dehidrojenasyon, hidroksilasyon ve protein glikasyonuna neden olurlar; ayrıca stratum corneumdaki lipidlere zarar verirler. Sonuç olarak doku elastikiyetini ve transepidermal su kaybını düzenleme kapasitesini kaybeder ve hücre replikasyonu verimi azalır [27].

Doğal özler, cilt yaşlanmasının etkilerini yavaşlatmak ve önlemek için kullanılan ana stratejilerden biri olmuştur. Tıbbi bitkiler, çok sayıda biyoaktif sekonder metabolitleri ile bilinmektedirler. Pek çok bitkinin biyoaktif metabolitler, özellikle deriye doğrudan katılan hücresel sinyal yollarıyla etkileşime giren, fotokoruyucu ve antioksidan etkilere sahip polifenolik bileşikler içerdiği bildirilmiştir. Cildin yaşlanma sürecine müdahale etmenin mümkün olabileceği çok sayıda biyokimyasal ve fizyolojik nokta vardır; tıbbi bitkilerin çeşitli kimyasalları aracılığıyla aynı anda hedeflenebilirler [23],[27].

Kozmetik şirketleri, kozmetik formülasyonların bileşenlerini keşfetmek, geliştirmek ve üretmek ve bu bileşenlerin cilt üzerindeki aktivitesini, özellikle yaşlanmayla ilişkili değişiklikleri nasıl etkileyebileceklerini değerlendirmek için biyoteknolojiyi kullanır. Bu nedenle biyoteknoloji, yaşlanma sürecini yavaşlatabilen aktif bileşenler geliştirmek için iyi bir alternatif aracı temsil etmektedir [67]. Bitki hücrelerinden elde edilen ekstraktlar yaşlanma önleyici özellikler veren polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, triterpenler, karotenoidler ve peptitler gibi bilinen antioksidan bileşiklerin önemli bir kaynağıdır [27].

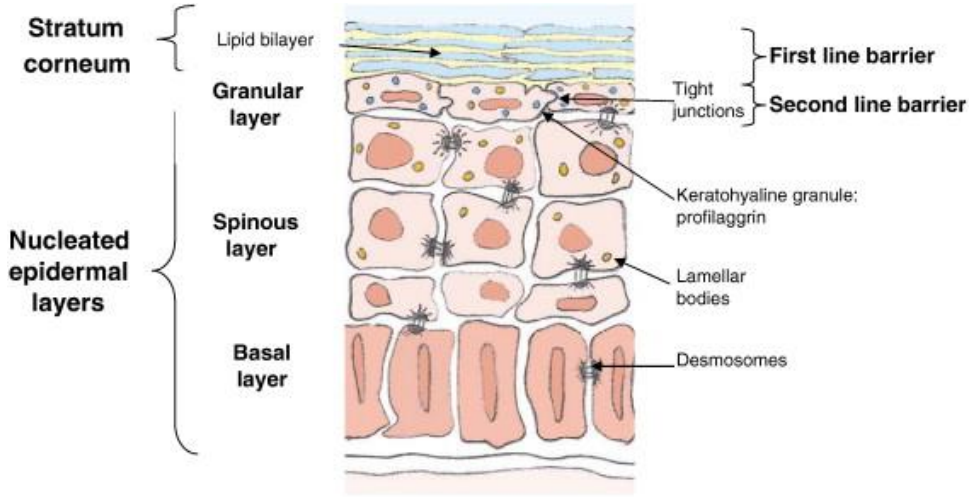
Bitki hücreleri birçok olumlu kozmetik etkiye sahiptir. Örneğin; *Oryza sativa* ve *Gardenia jasminoides* fibroblastların ömrünü uzatmak ve aktivitelerini uyarmak amacıyla; *Symphytum officinale, Capsicum annuum* ve *Opuntia* spp. epidermisin

esnekliğinin arttırılması amacıyla; *O. sativa* ve *Lotus japonicas* hücre bölünmesinin düzenlenmesi amacıyla; *Panax ginseng* ve *Opuntia* spp. hasarlı epidermisin yeniden oluşturulması amacıyla; *Rubus ideaus* ve *Lycopersicon esculentum, Citrus limon* hücrelerin DNA onarımını aktive etmek, onları oksidatif stresten korumak amacıyla kullanılmaktadır [27].

Fenolik bileşikler, serbest radikallerin adsorbe ve nötralize edilmesinde, singlet ve triplet oksijenin söndürülmesinde ve peroksitlerin ayrıştırılmasında önemli rol oynayarak antioksidan özellik sergilerler. Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri yapılarına bağlıdır. Çeşitli antioksidan aktivite mekanizmaları radikal süpürme, serbest radikal oluşumunda rol oynayan enzimlerin inhibisyonu veya metal iyonlarının (demir, bakır vb.) şelatlanması yoluyla ROS oluşumunun baskılanması ve antioksidan savunmanın korunması şeklinde sıralanabilir [27].

2.3.1 Hücre Dışı Matriks

Epidermis, genellikle dermisin hemen üzerindeki bazal katman ile başlayan, granüler katmanlardan üst katmana, stratum corneuma doğru ilerleyen, genellikle birkaç katmana bölünmüş, sürekli yenilenen bir epiteldir. Epidermis fiziksel, kimyasal, biyokimyasal (antimikrobiyal, doğuştan gelen bağışıklık) ve adaptif immünolojik bariyerler sağlayarak cildi potansiyel olarak tehlikeli çevresel tehditlerden korur. Fiziksel bariyer esas olarak stratum corneumdan oluşur, ancak alt katmanlardaki hücre-hücre bağlantıları ve ilişkili hücre iskeleti proteinleri başka önemli bileşenler sağlar. Kimyasal ve biyokimyasal bariyer lipidler, asitler, hidrolitik enzimler, antimikrobiyal peptitler ve makrofajlardan oluşur. İmmünolojik bariyer, bağışıklık sisteminin hümoral ve hücresel bileşenlerinden oluşur. Epidermiste lipitler keratinositlerde sentezlenir, lamellar gövdelerde depolanır ve hücreler arası katmanları oluşturdukları stratum corneuma salınır. Hücre tabakasına ve proliferasyona bağlı olarak çeşitli keratinler oluşur [19].



Şekil 2.7 Epidermal farklılaşma [19]

ECM, dermisin fibroblastları tarafından üretilen kolajen, elastin ve fibronektin gibi makromoleküllerle iç içe geçmiş proteoglikanlardan oluşur. Kolajen ana yapısal proteindir; hücrelere destekleyici bir çerçeve sağlar ve cildin gerilme mukavemetinden sorumludur. Elastin, benzersiz elastiyet özellikleriyle, cilde esneklik sağlamak için öneme sahiptir. Büyük bir glikozaminoglikan (GAG) olan HA, cildin hidrasyonunda rol oynar, ve vücudu pürüzsüz, nemli ve yağlı tutar. Bu bağ dokusu makromolekülleri, cildin yaşlanma süreciyle oldukça ilişkili olan MMP'ler (örneğin kolajenaz), elastaz ve mukopolisakkaraz hyalüronidaz gibi enzimler tarafından sürekli saldırıya uğrar [23].

ECM, cildin büyük bir kısmını oluşturur, güç ve esneklik sağlar. Genç ciltte fibroblastlar, esas olarak tip I kolajen fibrillerinden oluşan dermal ECM'yi üretir ve ona yapışır. Yapışma, fibroblastların çevreleyen ECM'ye yayılmasına ve mekanik kuvvet uygulamasına izin verir. Bu durumda, fibroblastlar, dermal ECM'nin bileşiminin ve yapısal organizasyonunun korunmasıyla karakterize edilen "genç" bir fenotip sergiler. Yaşlanma sırasında, fibroblast-ECM etkileşimleri, kolajen fibrillerin parçalanması nedeniyle bozulur. Bu bozulma mekanik kuvvet kaybına neden olur ve bu da "yaşlanmış" bir fenotipe yol açar. ECM homeostazının bu dengesizliği, kendi kendini devam ettiren bir döngüde kolajen fibril parçalanmasına neden olur [68].

2.3.2 Kolajen

Kolajen, insan vücudunda esas olarak kemikler, eklemler ve derideki konjonktif ve bağ dokularına uyum sağlayan fibriller bir proteindir ve biyolojik yapılardaki bağlayıcı rolü nedeniyle birçok canlı organizmada bol miktarda bulunur ve insan cildine güç ve destek sağlar [24], [69],[70]

Dermal kolajen demetleri, iç içe geçmiş elastik lifler yoluyla dinlenme durumuna geri dönen bir uzamayı kolaylaştırmak için düzenlendikleri genç erişkinlerde iyi organize edilmiştir [69]. Kolajen lifleri, dermisin kuru ağırlığının yaklaşık %75'ini oluşturur. Tip I ve III kolajen, esas olarak cildin gerilme mukavemetinden sorumlu olan nispeten geniş hücre dışı lifleri oluşturur [24],[71]. Tip I kolajen, yetişkin insan dermisinin toplam kolajeninin %80'ini oluşturur. Genetik olarak tip I kolajenden farklı olan bir başka kolajen türü olan tip III kolajen, yetişkin insan dermisindeki toplam kolajenin yaklaşık %10'unu temsil eder [24],[71]. UV ışığına maruz kalma, MMP upregülasyonu ve kolajen sentezinin downregülasyonu sonucu cildin fotoyaşlanmasına neden olabilir. MMP'lerin, özellikle MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un, kolajeni parçalayarak dermisin esnekliğini azalttığı bildirilmiştir [25].

Kolajendeki değişiklikler cilt yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynar. Kolajen parçalayan enzimler hem fotoyaşlanma hem de doğuşsal yaşlanma sırasında, esas olarak ROS üretimi yoluyla yukarı regüle edilir, kolajen sentezi azalır; bu durum sentez ve degradasyon arasındaki dengede bir kaymaya neden olur. Bununla birlikte, yaşla birlikte kolajen I'de bir azalma olur ve kolajen tip III'ün kolajen tip I'e oranında bir artış olur. Kolajen IV ve VII seviyelerinde de değişiklikler vardır [69]

Kolajen miktarı ve sağlamlığı ve cilt yaşlanması mekanizması doğru orantılı olduğu için kozmetik endüstrisinde büyük ilgi görmüştür. Kolajen liflerinin zamanla hasar gördüğü, cilt yaşlanması ile güçlü bir şekilde ilişkili olan kalınlık ve gücü kaybettiği tespit edilmiştir [70].

2.3.3 Elastin

Cilt dermisinde en bol ECM bileşenlerinden biri olan elastin, cildin elastikiyetini ve direncini korumada önemli bir rol oynar [24],[72]. Elastin, büyük arterler, akciğer, bağ, tendon, deri ve elastik kıkırdak dahil olmak üzere birçok omurgalı dokusunun esnekliği ve esnekliği için kritik olan önemli bir hücre dışı matris proteinidir [72]. Elastin fibroblastlar ve keratinositler tarafından sentezlenir ve kan damarlarına, akciğerlere ve cilde destek sağlayarak diğer ECM proteinleri ile yüksek dereceli yapılara organize olur. Elastin cildin elastikiyetini korur. Fizyolojik yaşlanma sırasında, elastin üretimi 30 ila 40 yaşına kadar nispeten sabit kalır, daha sonra önemli ölçüde azalır [20],[24],[72]. Tropoelastin koaservasyon yoluyla elastojenezin ana fazı sırasında çoklu tropoelastin molekülleri ile birleşir, burada bu işlem, moleküller arası hizalamayı çoğunlukla değişen

hidrofobik ve hidrofilik dizilerin kesin modellenmesiyle yönlendirilir. Büyük ölçüde çapraz bağlı tropoelastin dizileri (tipik olarak mikrofibrillerle birlikte), kalıcı esneklik yoluyla doku yapısal bütünlüğüne ve biyomekaniğe katkıda bulunur ve kritik olarak hidratlı ortamlara bağlı olan tekrarlanan germe ve gevşeme döngülerine izin verir. Elastin sekansları, mikrofibrillerde bulunan veya bunlarla birlikte bulunan çoklu proteinlerle etkileşime girer ve elastojenik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır [72].

İnsan cildi, elastik lifler açısından zengindir ve yoğunluklarında bölgesel farklılıklar vardır. UV ve MMP'ler hasarlı ciltte elastik liflerin yeniden şekillenerek bozulmasına ve üst dermiste elastinin anormal lokalizasyonuna neden olur. Elastin liflerinin çoğu, güneşten korunan bölgeler de dahil olmak üzere 70 yaşın üzerinde anormal olarak görünmektedir. Bu anormal elastatik malzeme cilde elastikiyet ve esneklik kazandırmaz [69].

2.3.4 Hyalüronik asit

HA, hücrelerin göç edebileceği alanları doldurmak için kullanılan ECM'nin bir bileşenidir. HA, yara iyileşmesi ve doku onarımı sırasında fibroblastlar için bir çevre sağlar [26]. HA sülfatlanmamış bir GAG'dir ve bir glukuronidik P (1→3) bağı ile bağlanan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozaminin tekrarlayan disakkaritlerinden oluşur [21].

Cilt yaşlanması cilt neminin kaybı ile de ilişkilidir. HA, ciltte nem tutulmasından sorumludur ve su moleküllerini bağlayıp tutmak için benzersiz bir kapasiteye sahiptir [21],[26]. HA sulu çözeltilerde kararlı tersiyer yapılar oluşturur. HA polimerleri, boyutlarına, tuz konsantrasyonlarına, pH'larına ve ilgili katyonlarına bağlı olarak çok sayıda konfigürasyonda oluşur. Diğer GAG'nin aksine, HA bir proteine kovalent olarak bağlanmaz; ancak proteoglikanlarla kümeler oluşturabilir. HA, çözeltilere düşük konsantrasyonlarda eklendiğinde bile yüksek viskozite sağlar [21].

Yara ve doku hasarında HA sentez miktarı iyileşmeyi sağlamak amacıyla artar. HA, enflamatuar hücrelerin aktivasyonu gibi çeşitli doku onarımının mekanizmalarını düzenleyerek bağışıklık tepkisini arttırır [21].

HA cilt yaşlanmasını yavaşlatmak için cilt kök hücrelerini güçlendirecek ve koruyacak yöntemler araştırılmıştır. Bitki hücreleri, diğer aktivitelerin yanı sıra, cilt yenilenmesini uyaran kolajeni sentezlemek için fibroblastları uyarabildikleri için yaşlanma karşıtı özellikler gösterir [27].

3
HAZIRLIKLAR

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Botanik Bahçesi'den tedarik edilen *S. officinale* L. tohumları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Bitki tohumları toprakta çimlendirildikten sonra bitki yaprak eksplantları sterilizasyon sonrasında uygun besin ortamları kullanılarak *in vitro* ortama taşınmıştır. *In vitro* ortamda büyütülen fidelerin yaprakları aseptik koşullar altında bistüri ile yaralanarak kallus oluşumu için uygun besin ortamlarına aktarılmıştır. Elde edilen kallus hücrelerinden hücre süspansiyon kültürü elde edilerek çalışmalara hücre süspansiyon kültürü ile devam edilmiştir.

3.1.2 Kimyasallar

Tablo 3.1 Kimyasallar

Kimyasallar	**Marka**	**Kullanım Alanı**
KNO_3	Merck	Makro Stok Hazırlama
NH_4NO_3	Merck	Makro Stok Hazırlama
$CaCl_2$	Duchefa Biochemie	Makro Stok Hazırlama
$MgSO_4$	Merck	Makro Stok Hazırlama
KH_2PO_4	Merck	Makro Stok Hazırlama
$(NH4)_2SO4$	Merck	Makro Stok Hazırlama
NaH_2PO_4	Merck	Makro Stok Hazırlama

Tablo 3.1 Kimyasallar (devamı)

Kimyasallar	**Marka**	**Kullanım Alanı**
$C_{10}H_{12}N_2O_8FeNa$	Duchefa Biochemie	Mikro Stok Hazırlama
$MnSO_4.H_2O$	PhytoTech	Mikro Stok Hazırlama
$ZnSO_4.7H_2O$	Merck	Mikro Stok Hazırlama
H_3BO_3	Merck	Mikro Stok Hazırlama
KI	Merck	Mikro Stok Hazırlama
$NaMoO_4.2H_2O$	Merck	Mikro Stok Hazırlama
$CoCl_2.6H_2O$	Merck	Mikro Stok Hazırlama
$CuSO_4.5H_2O$	Merck	Mikro Stok Hazırlama
myo-inositol	Merck	Vitamin Stok Hazırlama
Glisin	Merck	Vitamin Stok Hazırlama
Nikotinik asit	Merck	Vitamin Stok Hazırlama
Pridoksin-HCI	Merck	Vitamin Stok Hazırlama
Thiamin-HCl	Merck	Vitamin Stok Hazırlama
Gellan gum (Gelrite)	PhytoTech	Besin ortamı Hazırlama
2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)	Caisson Lab	Besin ortamı Hazırlama
6-Benzilaminopurin (BAP)	Caisson Lab	Besin ortamı Hazırlama

Tablo 3.1 Kimyasallar (devamı)

Kimyasallar	**Marka**	**Kullanım Alanı**
Kinetin	Caisson Lab	Besin ortamı Hazırlama
Sükroz	Isolab	Besin ortamı Hazırlama
NaOCI	Domestos	Sterilizasyon
Tween-20	Sigma-Aldrich	Sterilizasyon
FDA Boyası	Sigma-Aldrich	FDA boyama
Gallik asit	Sigma-Aldrich	Folin Deneyi
Folin reagent	Sigma-Aldrich	Folin Deneyi
Na_2CO_3	Merck	Folin Deneyi
Metanol	Merck	Folin Deneyi
Etanol	Merck	Folin Deneyi
Troloks	Sigma	DPPH Deneyi
DPPH boyası	Sigma	DPPH Deneyi
MTT boyası	Sigma	Sitotoksite Deneyi
IMDM	Gibco	Hücre Kültürü Çalışmaları
FBS	Gibco	Hücre Kültürü Çalışmaları
DMSO	Merck	Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.3 Kitler

Tablo 3.2 Kitler

Kit	Marka	Katalog No
RNA İzolasyon Kiti	E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, Omega Bio-Tek	RNA İzolasyonu
cDNA Sentez Kiti	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems	cDNA sentezi
Sybr Green Master Mix Kiti	PowerUp, SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems	Real-Time PCR Çalışması

3.1.4 Primerler

Tablo 3.3 Primerler

Primer Kodu	Sekans	Sentez Miktarı
ACTB-İleri primer	GGCTCTATTCCAACCATCCA	100 nanomol
ACTB-Geri primer	TAGAAGCAGTGCCACCACAC	100 nanomol
COL1A1-İleri primer	CTGGAAGAGTGGAGAGTACTG	100 nanomol
COL1A1-Geri primer	GTCTCCATGTTGCAGAAGAC	100 nanomol
ELN-İleri primer	ATAAAGCTGCTAAGGCTGG	100 nanomol
ELN-Geri primer	AAAGCTCCACCTACACCTG	100 nanomol
HAS3-İleri primer	TGGACTACATCCAGGTGTG	100 nanomol
HAS3-Geri primer	TGAGTCGTACTTGTTGAGGA	100 nanomol

3.1.5 Cihazlar

Tablo 3.4 Cihazlar

Cihaz	**Marka**
Terazi	Neck
Hassas Terazi	Ohaus
Manyetik karıştırıcı	Heidolp
Dijital Hassas Terazi	Neck
Hassas Analitik Terazi	Ohaus
Manyetik karıştırıcı	Heidolp
pHmetre	WTW
Distile Su Cihazı	Polar Su Teknolojileri
Otoklav	Zealway
Pastör Fırını	Binder
Biyogüvenlik kabini	Faster
Serolojik pipet tabancası	Eppendorf
İnkübatörlü Shaker	Infors HT
Mikroskop	Bertin-instruments
Mikropipet (100-1000 µL)	Eppendorf
Mikropipet (20-200 µL)	Thermo

Tablo 3.4 Cihazlar (devamı)

Cihaz	**Marka**
Mikropipet (2-20 µL)	Thermo
Mikropipet (1-10 µL)	Thermo
Santrifüj	Elektromag
Vakum pompası	İlmvac
Buzdolabı	Vestel
Liyofilizatör	Teknosem
Vortex	Heidolph
Homojenizatör	Roche
El homojenizatörü	Daihan
Rotary evaporatör	Heidolp
Isıtıcı soğutucu sirkülatör	Leuda
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter
Mikroplaka okuyucu	Biotek
Nanodrop Spektrofotometre	Themo scientific
İnkübatör	Heal force
Santrifüj	Beckman Coulter

Tablo 3.4 Cihazlar (devamı)

Cihaz	**Marka**
Mikroskop	Leica
Thermal cycler	Bio-RAD
Real time PCR	LightCycler 480 Real-Time PCR Systems, Roche

3.1.6 Laboratuvar Malzemeleri

Tablo 3.5 Laboratuvar Malzemeleri

Sarf Malzemeler	**Marka**	**Kullanım Alanları**
Otoklavlanabilir cam şişeler	Isolab	Kimyasal solüsyonların ve besiyerlerinin hazırlanması
Mezürler	Isolab	Kimyasal solüsyonların ve besiyerlerinin hazırlanması
Balık ve olta	Isolab	Kimyasal solüsyonların ve besiyerlerinin hazırlanması
10, 2000, 1000 µL pipet uçları	Thermo	Bitki hücre kültürü, kimyasal analiz, memeli hücre kültürü, gen ifadesi çalışmaları
Nitril Eldiven	Duchefa Biochemie	Tüm laboratuvar çalışmaları
Erlenler	Isolab	Hücre süspansiyon kültürü çalışmaları
Cam levha	Isolab	*In vitro* ortamda fide oluşturma çalışmaları

Tablo 3.5 Laboratuvar Malzemeleri (devamı)

Sarf Malzemeler	**Marka**	**Kullanım Alanları**
Bistüri	Isolab	Kallus kültürü çalışmaları
Cam petri	Isolab	*In vitro* ortamda fide oluşturma çalışmaları
Bistüri ucu	Medicine	*In vitro* ortamda fide oluşturma çalışmaları
Pens	Isolab	Bitki hücre kültürü çalışmaları
1.5 ml Santrifüj tüpü	Isolab	Bitki hücre kültürü ve kimyasal analiz çalışmaları
2 ml Santrifüj tüpü	Isolab	Kimyasal analiz çalışmaları
15 ml steril santrifüj tüpü	Capp	Bitki hücre kültürü ve kimyasal analiz çalışmaları
50 ml steril santrifüj tüpü	Isolab	Bitki hücre kültürü ve kimyasal analiz çalışmaları
Tüp standı	Isolab	Bitki hücre kültürü çalışmaları
PCR rack	Isolab	Real-time PCR çalışmaları
Kaba Filtre Kağıdı	Isolab	Ekstraksiyon hazırlama
Whatman Kağıdı	Health Biochemistry	Ekstraksiyon hazırlama
Parafilm	Isolab	Bitki hücre kültürü ve kimyasal analiz çalışmaları

3.1.7 Kullanılan Bilgisayar Programları

MTT ve Folin Ciocalteu deneyleri gerçekleştirilmesinden sonra plakalar Biotek marka plaka okuyucusu ile okutulmuş, yazılım olarak GEN 5' in 1.08 sürümü kullanılmıştır. Okutulan absorbans değerlerinin değerlendirilebilmesi için sonuçlar Excel çalışma sayfasına aktarılmıştır. RNA ve cDNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenebilmesi ve DPPH deneylerinin absorbanslarının belirlenebilmesi için Thermo Scientific firmasının NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazı kullanılmış, yazılım olarak NanoDrop 2000 kullanılmıştır. Gene özgü primer dizayn edilmesi için Blast, Primer3 ve SnapGene programları kullanılmıştır. RT-qPCR çalışmaları için için Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazı kullanılmış, reaksiyonun sıcaklığa göre gerçek zamanlı okuma yapabilmesi için ve okuma sonrası değerlendirilebilmesi için LightCycler 480 Software yazılımı kullanılmıştır. Folin Ciocalteu, DPPH deneylerinin ve RT-qPCR çalışmalarının absorbanslarına göre grafik ve tabloların oluşturulması için Microsoft Excell ve Prisim Graphpad programları kullanılmıştır.

Tablo 3.6 Programlar

Program	**Üretici Firma**
Excel Çalışma Sayfası	Microsoft
Gen 5 1.08	Biotek
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Blast	NCBI
Primer3 version 4.1.0	Primer3web
SnapGene5.2.5.1	GSL Biotech LLC
LightCycler 480 Software	Roche
GraphPad Prism 8.0.1	Prism

3.2 Metod

3.2.1 Bitki Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1 Besin Ortamı Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Stok solüsyonlar besin ortamı hazırlanması amacıyla kullanılır. En sık hazırlanan stok solüsyonlar, makro elementler, mikro elementler, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileridir. Besin ortamlarını oluşturan bileşenlerin stokları farklı konsantrasyonlarda hazırlanabilir [1]. Bu çalışmada hazırlanan stok solüsyonlardan makro element stok solüsyonları 10X konsantrasyonda, mikro element ve vitamin stok solüsyonları 100X konsantrasyonda ve ilgili bitki büyüme düzenleyiciler 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Makro element, mikro element, vitamin stokları hazırlanırken Tablo 3.7, Tablo 3.8, Tablo 3.9, Tablo 3.10, Tablo 3.11 ve Tablo 3.12'da verilen miktarlar baz alınarak tablolarda yer alan kimyasallar hassas terazide tartılmıştır. Tartılan kimyasallar belirtilen sırada distile suya eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. Stok solüsyonun hacmi distile suyla 1 lt'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar karanlıkta ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.7 1 lt Gamborg B5 10X makro stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt Gamborg B5 Makro Element Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
KNO_3	25 gram	24,73 mM
$(NH4)_2SO_4$	1,34 gram	1,01 mM
NaH_2PO_4	1,3 gram	1,09 mM
$MgSO_4$	1,2156 gram	1,01 mM
$CaCl_2$	1,1323 gram	1,02 mM

Tablo 3.8 1 lt Gamborg B5 100X mikro stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt MS Mikro Element Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
FeNaEDTA	3,67 gram	10 mM
$MnSO_4.H_2O$	1 gram	5,91 mM
H_3BO_3	0,3 gram	4,85 mM
$ZnSO_4.7H_2O$	0,2 gram	0,69 mM
KI	0,075 gram	0,45 mM
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,025 gram	0,1 mM
$CoCl_2.6H_2O$	0,0025 gram	0,01 mM
$CuSO_4.5H_2O$	0,0025 gram	0,01 mM

Tablo 3.9 1 lt Gamborg B5 100X vitamin stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt MS Vitamin Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
myo-inositol	10 gram	55,49 mM
Thiamin-HCl	1 gram	2,96 mM
Nikotinik asit	0,1gram	0,81 mM
Pridoksin-HCI	0,1gram	0,48 mM

Tablo 3.10 1 lt MS 10X makro stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt MS Makro Element Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
KNO_3	19 gram	18,79 mM
NH_4NO_3	16,5 gram	20,61 mM
$CaCl_2$	3,3202 gram	2,99 mM
$MgSO_4$	1,8 gram	1,5 mM

Tablo 3.11 1 lt MS 100X mikro stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt MS Mikro Element Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
FeNaEDTA	3,67 gram	10 mM
$MnSO_4.H_2O$	1,69 gram	10 mM
$ZnSO_4.7H_2O$	0,86 gram	2,91 mM
H_3BO_3	0,62 gram	10 mM
KI	0,083 gram	0,5 mM
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,025 gram	0,1 mM
$CoCl_2.6H_2O$	0,0025 gram	0,01 mM
$CuSO_4.5H_2O$	0,0025 gram	0,01 mM

Tablo 3.12 1 lt MS 100X vitamin stok solüsyonu hazırlanması

Kimyasallar	**1 lt MS Vitamin Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar**	**Molarite**
myo-inositol	10 gram	55,49 mM
Thiamin-HCl	0,1 gram	0,03 mM
Glisin	0,2 gram	2,66 mM
Nikotinik asit	0,05 gram	0,40 mM
Pridoksin-HCI	0,05 gram	0,24 mM

Besin ortamlarında kullanılan ilgili bitki büyüme düzenleyicileri Tablo 3.13'de belirtilen miktarlarda tartılarak ilgili çözücülerde çözdürülmüş ve 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde distile su ile hacimleri tamamlanarak hazırlanmıştır.

1 mg/ml konsantrasyonda 2,4-D, NAA ve IAA stok solüsyonlarının hazırlanması için 100 mg (0,1 gram) bitki büyüme düzenleyicileri hassas terazide tartılarak santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 5 ml 1 M NaOH eklenerek vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Üzerine 5-10 ml distile su eklenerek vortekslenmeye devam edilmiştir. Tamamen çözdürüldükten sonra hazırlanan çözeltinin hacmi distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır. IAA hormonu otoklavlanmadan filtre ile steril edilerek besiyerine eklenmiştir. Bunun için besin ortamına eklenecek miktar taze 1 mg/ml IAA stok çözeltisinden alınmış ve pH'ı 5.8'e ayarlandıktan sonra son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan IAA solüsyonu otoklav ile steril edilmiş, besiyerine aseptik koşullar altında 0.22 µM'lik mikrofiltre ile steril edilerek eklenmiştir.

1 mg/ml konsantrasyonda BAP stok solüsyonunun hazırlanması için 100 mg (0,1 gram) BAP hassas terazide tartılarak santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 5 ml 1 M KOH eklenerek vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Üzerine 5-10 ml distile su eklenerek vortekslenmeye devam edilmiştir. Tamamen çözdürüldükten sonra hazırlanan çözeltinin hacmi distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1 mg/ml konsantrasyonda Kinetin stok solüsyonunun hazırlanması 100 mg (0,1 gram) Kinetin hassas terazide tartılarak santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 5 ml 1 M HCI eklenerek vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Üzerine 5-10 ml distile su eklenerek vortekslenmeye devam edilmiştir. Tamamen çözdürüldükten çözeltinin hacmi distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır [1],[37],[39],[73],[74],[75],[76],[77],[78].

Tablo 3.13 Bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması

Kimyasallar	**Bitki Büyüme Düzenleyici Stok Solüsyonuna Eklenen Miktar (100X)**	**Konsantrasyon**
2,4-D	0,1 gram	1 mg/ml
BAP	0,1 gram	1 mg/ml
Kinetin	0,1 gram	1 mg/ml
NAA	0,1 gram	1 mg/ml

3.2.1.2 Kimyasal Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Floresan diasetat (FDA) stok solüsyonu hazırlanması için 2 mg floresan diasetat 1 ml aseton içinde çözdürülmüştür.

MTT stok solüsyonunun hazırlanması için 0,25 gram MTT bileşiği karanlıkta hassas terazide tartılmıştır. Tartılan MTT bileşiği üzerine 10 ml PBS eklenip çözdürülmüştür. Vorteks yardımıyla iyice çözünme sağlandıktan sonra; MTT bileşiği 100 ml'lik cam şişe içerisine aktarılmıştır. PBS kullanılarak son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. Balık ve manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanan solüsyonun karışması sağlanmıştır. Hazırlanan solüsyon karanlıkta 0.22 μM'lik mikrofiltreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril edilen MTT solüsyonu 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp aligotlandıktan sonra karanlıkta -20°C'de stoklanmıştır.

3.2.1.3 Besin Ortamlarının Hazırlanması

Besin ortamlarının hazırlanması için otoklavlanabilir cam şişe içerisine bir miktar distile su alınmıştır. Distile su içerisine hazırlanacak hacime uygun olacak şekilde sükroz eklenmiş ve balık kullanılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla sükrozun çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hazırlanan stok solüsyonlarından sırasıyla besiyerleri için uygun olan stok solüsyonları (Makro element, mikro elementi vitamin stok solüsyonları) Tablo 3.14 ve Tablo 3.15'da yer aldığı gibi besin ortamındaki son konsantrasyonu 1X olacak şekilde sırayla eklenmiştir. Besin ortamı bileşenleri tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Besin ortamı hazırlandıktan sonra son hacim besiyeri ortamı hacminin %90'ı olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. 0,1 M HCI ve 0,1 M NaOH solüsyonları kullanılarak besin ortamı pH'ı 5.8'ye ayarlanmış, ardından son hacim tamamlanmıştır.

Tablo 3.14 *in vitro* ortamda fide eldesi için deneme yapılan besin ortamları bileşenleri

Besin Ortamı Adı	**Besiyeri Çeşidi**	**Karbon Kaynağı (30 g/L)**	**Bitki Büyüme Düzenleyicileri (1 mg/L)**					**Kıvam arttırıcı 4 g/L**
	MS	Sükroz	2,4-D	NAA	IAA	BAP	Kinetin	Gellan gum
MS	+	+	-	-	-	-	-	+
A1	+	+	-	-	-	+	-	+
A2	+	+	-	-	+	-	-	+
A3	+	+	-	+	-	-	-	+
A4	+	+	+	-	-	-	-	+
A5	+	+	-	-	-	-	+	+

Tablo 3.15 Kallus kültürü eldesi için deneme yapılan besin ortamları bileşenleri

Besin Ortamı Adı	**Besiyeri Çeşidi**		**Karbon Kaynağı (30 g/L)**	**Bitki Büyüme Düzenleyicileri (1 mg/L)**				**Kıvam arttırıcı 4 g/L**
	MS	GB5	Sükroz	2,4-D	NAA	BAP	Kinetin	Gellan gum
B1	+	-	+	+	-	+	-	+
B2	+	-	+	+	-	-	+	+
B3	+	-	+	-	+	+	-	+
B4	+	-	+	-	+	-	+	+
B5	+	-	+	+	-	-	-	+
B6	-	+	+	+	-	+	-	+
B7	-	+	+	+	-	-	+	+
B8	-	+	+	-	+	+	-	+
B9	-	+	+	-	+	-	+	+
B10	-	+	+	+	-	-	-	+

IAA hormonu eklenen besin ortamlarında IAA hormonu 10 ml hacimde (pH=5.8) filtre ile steril edilerek eklenmiştir. Hazırlanan yarı-katı besiyerlerine hacim tamamlandıktan sonra gellan gum (4 g/L) eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamları 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilerek septik koşullar altında steril kavanoz ve petrilere aktarılmıştır.

3.2.1.4 *In vitro* Ortamda Fide Elde Edilmesi

Toprakta çimlendirilen karakafes otu bitkisi yaprakları akan çeşme suyu altında 30 dakika bekletilerek yaprak üzerindeki kirliliklerin giderilmesi sağlanmıştır. Sterilizasyonu sağlamak için steril distile su ile %10 konsantrasyonda NaOCI hazırlanmış ve hazırlanan solüsyon içine birkaç damla Tween-20 (deterjan) damlatılmıştır. Bitki yaprakları bu solüsyon içerisinde 10 dakika tutularak steril edilmiştir. %10 sodyum hipoklorit solüsyonu ile steril edilen yapraklar steril distile su ile 3-4 defa durulanmış ardından Tablo 3.14'de yer alan besin ortamlarına aktarılmıştır. *In vitro* ortama taşınan eksplantlar 25±2°C'de fotoperiyotta inkübe edilmiş ve *in vitro* ortamda fide gelişimi için besin ortamları gözlemlenerek sonuçlar kaydedilmiştir. 1 ay sonunda yaprak üzerinde oluşan sürgünler MS ortamına aktarılarak *in vitro* fideler elde edilmiştir. *in vitro* ortamda büyütülen fidelere ait yapraklar kallus uyarımı için eksplant olarak kullanılmıştır.

3.2.1.5 Kallus Kültürü Elde Edilmesi

MS besin ortamında büyütülen fide yaprakları 3. alt kültürde aseptik koşullar altında bistüri ve pens yardımıyla yaralanarak Tablo 3.15'da yer alan farklı konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin hormonu içeren MS ve Gamborg B5 besin ortamlarına aktarılmıştır. Kültüre alınan eksplantlar kallus oluşumu gözlenene kadar 25±2°C'de karanlık ortamda inkübe edilmiş ve her ay düzenli olarak taze besin ortamlarına aktarılmıştır. Eksplantlar kallus uyarımı için besin ortamına aktarıldıktan yaklaşık 3 hafta sonra kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Her bir besin ortamındaki kallus yanıtları gözlemlenerek kayıt altına alınmıştır. Elde edilen kalluslar yeterli miktara ulaştıklarında hücre süspansiyon kültürü oluşturma aşamasına geçilmiştir.

3.2.1.6 Hücre Süspansiyon Kültürü Elde Edilmesi

Süspansiyon kültürü oluşturmak amacıyla 5 gram kırılgan formdaki kalluslar 50 ml sıvı B5 besin ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Kallusların sıvı besiyerlerinde süspanse olmaları için inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde 110 rpm'de 25±2°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılmasından yaklaşık iki hafta sonra hücrelerin çoğaldıkları gözlemlenmiştir ve üç hafta sonunda yeterli yoğunluğa erişen süspanse hücreler aseptik koşullar altında alt kültüre alınmıştır. Karakafes otu süspansiyonlarının ilk alt kültüründe süspansiyonlar steril 1220 mikron gözenekli metal elekten süzülmüştür ve böylece süspanse olmayan agregatların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süspansiyon hücreleri 14 günde bir yüzde PCV (Paketlenen hücre hacmi)

belirlenerek her alt kültüre alma işleminde %10 konsantrasyonda hücre olacak şekilde taze besin ortamıyla birleştirilerek alt kültüre alınmıştır.

3.2.1.7 Hücre Süspansiyon Kültürü Çoğalması ve Canlılığının Belirlenmesi

Karakafes otu süspansiyonları 14 gün boyunca inkübe edildikten sonra aseptik koşullar altında serolojik pipet yardımıyla homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Süspansiyondan 10 ml örnek alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek hücre pelleti elde edilmiştir.

PCV (%): (Pellet hacmi/10 ml)x100 olarak hesaplanmıştır.

FDA, plazma membranından geçebilen floreseinin asetillenmiş bir türevidir. FDA sitoplazmaya girdiğinde, spesifik olmayan esterazlar molekülü floreseine ve yan ürünler olan asetik asit/asetaldehite dönüştürmek için deasetilize eder. Floresein üzerindeki yüklü gruplar, hücre içinde tutulmayı destekler. Bu tutma süresi hücre tipine ve kültür koşullarına göre değişebilir [79]. FDA boyası ile kallus veya süspansiyon hücreleri kullanılarak metabolik olarak aktif canlı hücreler belirlenebilir. Test, canlılığın nicel bir ölçüsünü vermez, ancak canlı hücrelerin sayısını tahmin etmek için kullanılır [80].

1 ml hücre süspansiyonu içerisine 10 µl FDA (1 mg/ml) boyası eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. FDA hücre süspansiyon karışımından mikropipet yardımıyla 10 µl örnek alınıp lam lamel arası preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparat floresans mikroskopta yeşil filtre altında incelenmiştir. Mikroskop alanında parlak yeşil floresans olarak görünen hücreler canlı olarak floresans olmayan veya zayıf floresans olarak görünen hücreler ölü hücreler olarak belirlenmiştir [73].

% Canlılık: (Canlı hücre/Toplam hücre)x100

3.2.2 Kimyasal Analiz Çalışmaları

3.2.2.1 Hücre Liyofilizatının Elde Edilmesi

Karakafes otu süspansiyon hücreleri 14. gününde filtre kağıdı, nuche erleni ve buchner hunisi kulanılarak vakum pompası yardımıyla besin ortamından uzaklaştırılmıştır. Hasat edilen hücreler steril distile su ile yıkanarak tekrar filtrelenerek besin ortamı atıklarından uzaklaştırılmıştır. Filtrelenen hücreler etiketlenerek dondurulması için -20ºC'ye kaldırılmıştır. Donan hücrelerdeki buz kristalleri liyofilizatörde uzaklaştırılarak nem içermeyen hücre liyofilizatı elde edilmiştir. Elde edilen liyofilizatlar ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.2.2 Liyofilizattan Fenolik Ekstraksiyon Elde Edilmesi

Her bir çözücü denemesi için son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde 3'er tekrarlı olarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine 20 mg hücre liyofilizatları tartılmıştır. Hücre liyofilizatlarına sırasıyla 2 ml %100 su, %10 etanol, %50 etanol, %70 etanol, %96 etanol çözücüleri eklenerek son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde ekstraksiyon başlatılmıştır. Ekstraktlar bir homojenizatör (Roche, MagnaLyser) cihazı kullanılarak 4000 rpm'de 45 sn boyunca homojenize edilmiştir. Her bir numune karanlıkta 25°C'de 110 rpm'de çalkalanmaya bırakılarak 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.2.3 Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik İçerik Belirleme

Folin-Ciocalteu yöntemi, fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerin alkali ortamda molibdenyum'a elektron transfer etmesi sonucu oluşan mavi renkli kompleksin spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanan bir yöntemdir. Deneyde oluşan kompleksin absorbansı bir spektrofotometre kullanılarak 750-765 nm'de ölçülür. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve deney sonucunda toplam fenolik içerikler gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanır [77],[81]. Folin-Ciocalteu deneyi, Ainsworth ve Gillespie (2007)'nin kullandığı protokole göre gerçekleştirilmiştir [81].

İnkübasyonu tamamlanan 10 mg/ml konsantrasyondaki ekstraktlar mikrosantrifüj cihazında 13000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst fazlar (süpernatant) şırınga ile toplanarak 0.45 µM'lik mikrofiltreden geçirilmiş ve partikül içermeyen ekstrakt numuneleri elde edilmiştir. Deneyde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit ana stoğu 1000 µM konsantrasyonda %80 metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Ana stoktan dilüsyon yoluyla 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM ve 600 µM konsantrasyonlarında standartlar hazırlanmıştır. Dilüsyon çözücüsü olarak %80 metanol kullanılmıştır. Fenolik ekstraksiyonu sonrası elde edilen filtreden geçirilen süpernatantlar, gallik asit standartları ve blank olarak kullanılan %80 metanol numunelerinden 100'er µl alınarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Standart ve örnek bulunan tüm tüplere 200 µl %10 Folin Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Tüm tüpler iyice vortekslenerek karışma sağlanmıştır. Tüplere 800 µl 700 mM sodyum bikarbonat eklenip 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüplerdeki blank, standart ve numunelerden 200'er µl 96 kuyucuklu plakanın farklı kuyucuklarına aktarılıp 765 nm'de absorbansları okutulmuştur. Okutulan gallik asit absorbans değerleri kullanılarak standart kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve bu kalibrasyon grafiği

denklemine göre KOHSK ekstrakt numunelerindeki toplam fenolik içeriği µM cinsinden gallik asit eşdeğerleri hesaplanmıştır [77]. Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan KOHSK ekstraktlarının toplam fenolik miktarının belirlenmesi için yapılan Folin-Ciocalteu deneyleri farklı zamanlarda 2 defa tekrarlanmış ve her deneyde ilgili çözücüler 3 teknik tekrarlı olacak şekilde deney gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi İçin Ekstrakt Hazırlanması

10 gram KOHSK liyofilizatı 400 ml %70 etanol çözücüde çözünüp el homojenizatörü ile 600 rpm'de 10 dakika karıştırılarak homojenize edilmiştir. Homojen hale getirilen ekstrakt 25°C'de 110 rpm'de çalkalamaya bırakılarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan ekstrakt miracloth filtresi üzerinde süzdürülüp, süpernatantlar 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst süpernatatnt toplanmış ve filtre kağıdından geçirilerek filtrelenmiştir. Berrak bir şekilde elde edilen süzüntülerin çözücüsü rotary evaporatörde 40°C' de buharlaştırılıp konsantre hale getirilmiştir. 4°C'ye ayarlanan ısıtma-soğutma sirkülatörü vasıtasıyla buharlaşan ekstrakt çözücüsü toplama balonu içinde biriktirilmiştir. Konsantre hale gelen ekstraktlar -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuş ve elde edilen ekstraktın yüzde verimi hesaplanmıştır.

% Verim=(Kuru ekstrakt gramı x100)/Ekstrakt başlatılan liyofilizatın gramı

3.2.2.5 DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Antioksidan Tahlili

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını durduran veya yavaşlatan bileşik gruplarına genel olarak antioksidan madde denir [82]. DPPH dppjdeneyinde koyu mor renkli DPPH serbest radikal çözeltisinin antioksidan aktivitesi belirlenecek olan ekstrakt ile karıştırılması sonucunda antioksidan bileşik ortama hidrojen atomu verir. Böylece DPPH serbest radikal çözeltisi radikal olmayan stabil DPPH formuna dönüşür. Bu indirgeme sonucunda koyu mor renk açılarak sarı renk oluşur. DPPH deneyi, özetle radikal çözeltisinin renginde meydana gelen değişikliğin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite deneyi Adedapo vd, (2009)' nin kullandığı protokole göre yürütülmüştür.

0,135 mM DPPH reaktif çözeltisi hazırlanması için 5,32 mg DPPH reaktifi hassas terazide tartılmış ve %96 etanol ile çözdürülerek 250 ml cam şişe içine aktarılmıştır. Hazırlanan reaktifin manyetik karıştırıcı ve balık yardımıyla çözücüde tamamen çözünmesi sağlanmış ve son hacmi %96 etanol ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 50 µg/ml konsantrasyonda troloks standart stoğunun hazırlanması için 2,5 mg troloks hassas

terazide tartılmış ve 50 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tartılan troloks üzerine 50 ml %96 etanol eklenerek vorteks yardımıyla çözünme sağlanmıştır. 2,5 mg/ml konsantrasyonda KOHSK ekstraktı ana stoğunun hazırlanması için 25 gram KOHSK ekstraktı hassas terazide tartılmış ve 15 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tartılan KOHSK ekstraktı üzerine 10 ml %70 'lik etanol eklenerek vorteks yardımıyla çözünme sağlanmıştır. Ekstrakt çözündükten sonra 1000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip üst faz 0.45 µM'lik mikrofiltreden geçirilerek partikül içermeyen ekstrakt numunesi elde edilmiştir. 50 µg/ml troloks standart stok çözeltisi ve 2,5 mg/ml KOHSK ekstraktı için Tablo 3.16 ve Tablo 3.17'de belirtildiği şekilde hesaplama yapılarak kuvartz spektrofotometre küvetlerine dozlar hazırlanmıştır. Troloks standart antioksidanı için dozlar 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml ve 15 µg/ml olarak hazırlanmıştır. KOHSK ekstraktı için dozlar 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml olarak hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların elde edilebilmesi için hazırlanan ana stoklar madde çözücüleri ile seyreltilmiştir.

Tablo 3.16 Troloks standartı konsantrasyon hesaplama

Doz Konsantrasyonu	**Blank**	**Kontrol**	**1 µg/ml**	**2 µg/ml**	**4 µg/ml**	**8 µg/ml**	**10 µg/ml**	**12 µg/ml**	**15 µg/ml**
50 µg/ml Troloks Ana Stoğu	-	-	20 µl	40 µl	80 µl	160 µl	200 µl	240 µl	300 µl
%96'lık Etanol	2 ml	1000 µl	980 µl	960 µl	920 µl	840 µl	800 µl	760 µl	700 µl
Toplam	2 ml	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Tablo 3.17 KOHSK ekstraktı (%70 etanol) konsantrasyon hesaplama

Doz Konsantrasyonu	**Blank**	**Kontrol**	**31,25 µg/ml,**	**62,5 µg/ml,**	**125 µg/ml**	**250 µg/ml**	**500 µg/ml**
2.5 mg/ml KOHSK ekstraktı Ana Stoğu	-	-	12.5 µl	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Çözücü	2 ml	1000 µl	987.5 µl	975 µl	950 µl	900 µl	800 µl
Toplam	2 ml	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Troloks standartı ve KOHSK ekstraktı için her bir doz 3'er tekrarlı olarak çalışılmıştır. Blank küvetleri hariç hazırlanan dozların ve kontrol küvetlerinin üzerine karanlıkta 1 ml 0.135 mM DPPH eklenerek pipetlenmiştir. Çözeltiler oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuvartz spektrofotometre küvetleri spektrofotometrede 517 nm'de okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir [78],[83],[84]. KOHSK ekstraktının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için yapılan DPPH deneyleri farklı zamanlarda 2 defa tekrarlanmış ve her deneyde ekstraktın ilgili dozları 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml) 3 teknik tekrarlı olacak şekilde deney gerçekleştirilmiştir.

% DPPH aktivitesi = (Abskontrol-Absörnek)/ Abskontrol X 100 formülüyle hesaplanır.

IC50 Değeri=Dozlara karşılık gelen % aktivite ile çizilen grafikte %50'ye karşılık gelen doz olarak belirlenmiştir.

3.2.3 Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.3.1 *In vitro* Sitotoksisitenin Belirlenmesi

MTT [3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür] testi Mosmann tarafından keşfedilen hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılan bir sitotoksisite analiz yöntemidir [85]. MTT bileşiği pozitif yüke sahiptir ve ökaryotik hücrelerin membranını geçerek hücre içinde indirgenebilir. Bu indirgenme sonucunda oluşan tetrazolyum halkası canlı hücrelerin mitokondrilerinde suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşür ve renk

oluşumunu sağlar. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeyemedikleri için bir renk değişimine neden olmazlar [85],[86],[87]. Formazan kristalleri absorbansın okutulması ile belirlenebilir. MTT testinde oluşan formazan kristalleri mor renklidir ve suda çözünmezler. Bu nedenle dimetil sülfoksit (DMSO) formazanı çözdürmek için kullanılmaktadır [85],[88],[89].

KOHSK ekstraktının 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında CRL-2076 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi MTT deneyi ile belirlenmiştir. MTT testi için plakaya ekilen hücreler %5 CO2 içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatör içinde %10 FBS içeren IMDM besiyerinde inkübe edilerek büyütülmüştür.

Flasklarda inkübe edilerek çoğaltılan CRL-2076 hücreleri enzimatik olarak (tripsin/EDTA) kültür flasklarından kaldırılmış ve hücreler %10 FBS içeren IMDM kültür medyumunda toplandıktan sonra 123x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz vakum yardımıyla çekilmiş ve CRL-2076 hücreleri kültür medyumu içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Kültür medyumu içerisinde yeniden süspanse edilen CRL-2076 hücreleri doğru sayıda ekiminin yapılması amacıyla thoma lamı ile sayım yapılarak ekim yapılmıştır.

24 kuyucuklu plakaya 1 ml $0{,}1x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek inkübe (%5 CO2, 37°C) edilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besin ortamları aspire edilmiş, yerine ekstraktın belirli konsantrasyonlarını içeren 1 ml %2 FBS içeren IMDM kültür medyumu eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına yalnızca 1 ml %2 FBS içeren IMDM kültür medyumu eklenmiştir. Tüm uygulamalar dört tekrarlı olacak şekilde ilgili kuyucuklara ekim yapılarak inkübe (%5 CO2, 37°C) edilmiştir. 48 saat uygulama sonrası işlem görmüş hücreler ve kontrol hücrelerinin büyümeleri ve sistematik hücre ekim hatalarının ayırımı için her plaka mikroskop altında incelenmiştir. Plaka ters çevrilerek içerisindeki kültür medyumu boşaltılmış ardından kuyucuklara final konsantrasyonu 5 mg/mL olan MTT-kültür medyumu solüsyonu (Her kuyucukta 125 µl olacak şekilde (100 µl %2 FBS içeren IMDM kültür medyumu ile 25 µl MTT boyası karıştırılmıştır) eklenmiştir. Hazırlanan plakalar karanlık ortamda 3±0.1 saat inkübasyona (%5 CO2, 37°C) bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda plakadaki MTT-kültür medyumu solüsyonu plaka ters çevrilerek dökülmüş, her bir kuyucuğa canlı hücrelerde oluşan formazan tuzlarının çözülmesi için 1000 µl DMSO eklenmiştir. Plaka 15 dakika çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra plakanın optik densisite (OD) değerleri 570 nm'de okutulmuştur. Ekstrakt uygulaması olan kuyucuklar kontrol hücrelerine göre karşılaştırılarak ekstrakt

konsantrasyonlarının sitotoksik veya proliferatif olup olmadıkları belirlenmiştir. KOHSK ekstraktının hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT deneyleri farklı zamanlarda 2 defa tekrarlanmış ve her deneyde uygulama grupları 4 teknik tekrarlı olacak şekilde deney gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbanslar ile verilen % canlılık denklemine göre % hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

% canlılık= 100xOD570e/OD570k

OD570e: ekstraktlardan ölçülen optikal yoğunluğunun ortalama değeri

OD570k: kontrol (hücre+kültür medyumu) ile ölçülen optikal yoğunluğunun ortalama değeri

3.2.3.2 RNA İzolasyonu İçin CRL-2076 Hücrelerinin Çoğaltılması

Bu çalışma için yaşlı hücreyi temsilen pasaj 17'deki CRL-2076 hücreleri kullanılmıştır. Flasklarda inkübe edilen (%5 CO2, 37°C) hücreler tripsin/EDTA kullanılarak kültür flasklarından kaldırılmış ve hücreler kültür medyumunda toplandıktan sonra 123x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz vakum yardımıyla çekilmiş CRL-2076 hücreleri kültür medyumu içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Kültür medyumu içerisinde yeniden süspanse edilen CRL-2076 hücreleri doğru sayıda ekiminin yapılması amacıyla thoma lamı ile sayım yapılarak ekim yapılmıştır.

Ekim için 25 cm^2 hücre kültürü flasklarına her bir flaskta 5 ml kültür medyumu içerisinde $0,5x10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası serumlu besin ortamı uzaklaştırılarak flasklara serumsuz kültür medyumu ile hazırlanan KOHSK ekstraktının 100 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonları eklenmiştir. Kontrol grubuna serumsuz kültür medyumu eklenmiştir. 48 saat inkübe edilen fibroblast hücrelerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.4 Moleküler Biyoloji ve Genetik Çalışmaları

Kolajen tip 1, COL1A1 ve COL1A2 genleri tarafından kodlanan ve iki α1 zinciri ve bir α2 zincirinden oluşan bir heterotrimer, üçlü sarmal proteindir [90]. Elastin, tek kopya ELN geni tarafından kodlanır ve globüller veya genişletilmiş polipeptitler olarak bulunabilen çözünür bir tropoelastin öncüsü olarak salgılanır [91]. HA dallanmamış bir glikozaminoglikandır ve HA sentazları (HAS1-3) tarafından sentezlenir. HAS3 geni tarafından kodlanan hyalüronan sentaz 3, HA sentezinde rol alır. HAS3 geni HA sentaz

ailesinin diğer üyeleri (HAS1 ve HAS2) tarafından kodlanan proteinlerle karşılaştırıldığında, bu proteinin daha çok HA sentezinin düzenleyicisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır [92]. Bu nedenle KOHSK ekstraktının COL1A1, ELN ve HAS3 genlerinin ifadesine etkisi insan normal fibroblast hücrelerinde analiz edilerek değerlendirilmiştir.

3.2.4.1 CRL-2076 Hücrelerinden RNA İzolasyonunun Yapılması

Flasklarda inkübe edilen hücreler tripsin/EDTA kültür flasklarından kaldırılmış ve hücreler kültür medyumunda toplandıktan sonra 123x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Lizis tamponu hazırlanması için kitte bulunan lizis solüsyonunun her 1000 µl'sine 20 µl β-Mercapto etanol eklenerek karışım hazırlanmıştır. Santrifüjlenen pellet üzerine hazırlanan lizis tamponundan 700 µl eklenmiştir. Hücre peletinin lizis tamponu içinde homojen hale getirilmesi için karışım 2 ml santrifüj tüplerine aktarılmış ve bir homojenizatör cihazında (Roche, MagnaLyser) 4000 rpm'de 45 saniye homojenize edilmiştir. Homojenize edilen karışım üzerine 700 µl hacimde %70 etanol eklenmiş ve mikropipet ile pipetaj yapılmıştır. Karışımlar kolonlara aktarılarak 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu-1 eklenerek 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir ve kolon dibinde toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolonlar 500 µl yıkama solüsyonu-2 ile iki kez yıkanmıştır. Kolonlar yeni bir toplama tüpüne alınarak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. RNA'nın elüsyonu için kolonlar 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 40'ar µl DNase/RNase içermeyen su eklenerek 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. İzole edilen RNA'lar nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek konsantrasyon ve saflıkları belirlenmiştir.

3.2.4.2 İzole Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi

Konsantrasyonları belirlenen RNA ana stokları DNase/RNase içermeyen su ile 1000 ng'a seyreltilmiş ve ara stok RNA'lar hazırlanmıştır. RNA ara stoklarının konsantrasyonu 100 ng'a düşürülerek RT-qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA kiti üretici firmanın önerdiği prosedüre göre cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi için kit içerisinde bulunan reaksiyon bileşenleri buz üzerinde çözdürülmüştür. Her bir cDNA sentez reaksiyonu için Tablo 3.18'de verilen karışım 0.2 ml mikrosantrifüj tüpleri kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir karışım üzerine 100 ng/µL konsantrasyonda RNA örneklerinden 10'ar µL alınarak aktarılmıştır. Tüm reaksiyon bileşenleri tamamlanan mikrosantrifüj tüpleri thermalcycler cihazında farklı sıcaklıklarda ve sürelerde (25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk) inkübe edilerek

cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentelenen cDNA'lar nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek konsantrasyon ve saflıkları belirlenmiştir ve RT-qPCR çalışmaları için 25 kat seyreltilen cDNA stokları kullanılmıştır.

Tablo 3.18 cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
10X RT Tamponu	2 µL
25X dNTPMix (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primerleri	2 µL
Multi Scribe Reverse Transkriptaz (50 U/ µL)	1 µL
RNase Inhibitörü	1 µL
Nuclease-Free H_2O	3.2 µL
RNA (100 ng/µL)	10 µL
Toplam reaksiyon hacmi	20 µL

3.2.4.3 RT-qPCR Analizi ile Gen İfadesinin Belirlenmesi

Nicel gen ekspresyonu mutlak ve göreceli kantifikasyon olarak iki farklı yöntem ile sunulabilir. Mutlak kantifikasyon, genellikle PCR sinyalini standart bir eğriyle ilişkilendirerek genin kopya sayısını hesaplarken göreceli gen ekspresyonu, bazı kalibratör veya dahili kontrol genine göre ilgili genin verilerini sunar. Göreceli gen ekspresyonunu sunmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntem, $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak da adlandırılan karşılaştırmalı CT yöntemidir [93].

Gerçek zamanlı RT-PCR, gen ekspresyonunu ölçmek için güçlü bir araçtır. Gerçek zamanlı PCR için nicel son nokta, eşik döngüsüdür (CT). CT, haberci boyanın floresan sinyalinin bir eşiği geçtiği PCR döngüsü olarak tanımlanır. Verileri CT olarak sunarak,

PCR'nin amplifikasyonun üstel aşamasında olması sağlanır. CT'nin sayısal değeri, reaksiyondaki amplikon miktarı ile ters orantılıdır (yani, CT ne kadar düşükse, amplikon miktarı o kadar fazladır) [93].

$2^{-\Delta\Delta CT} = (CT\ Hedef\ geni - CT\ Kontrol)_{Örnek\ A} / (CT\ Hedef\ geni - CT\ Kontrol)_{Örnek\ B}$

Bu çalışmada COL1A1 (kolajen tip 1 alfa 1), ELN (Elastin) ve HAS3 (Hyaluranan sentaz 3) genlerinin ifade düzeyleri tasarlanmış primer çiftleri ve SYBR Green boyası kullanılarak ve referans gen olarak beta-aktin (ACTB) kullanılarak belirlenmiştir.

RT-qPCR reaksiyonları Tablo 3.19'da verildiği gibi kit üretici firmanın protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakanın her bir kuyucuğuna hazırlanan reaksiyon karışımı 7.5'er µL hacimde dağıtılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 2.5'er µL cDNA eklenerek reaksiyon hacmi 10 µL'ye tamamlanmıştır. Her bir gen için tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak (Tablo 3.3) ve her bir cDNA için de 3 teknik tekrar olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. Mikroplaka şeffaf sealing film ile kapatıldıktan sonra 1500 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Hazırlanan mikroplaka Roche Lightcycler 480 II cihazında tedarik edilen SYBR green master mix kitinin önerdiği (Applied biosystems, Thermo) sıcaklık döngülerine maruz bırakılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin (COL1A1, ELN ve HAS3) gen ifadeleri, referans genin (ACTB) gen ifadelerine oranlanmıştır. Gen ifadeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ [93] yöntemine göre normalize edilerek ve gen ifade değişimleri belirlenmiştir.

Tablo 3.19 RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü

Deteksiyon Formatı		**SYBR Green**	
Program Adı		**Döngüler**	**Analiz Modu**
UDG Aktivasyonu		1 kez	-
Dual-LockDNA Polimeraz		1 kez	-
Bağlanma		40 kez	Miktar Belirleme
Erime		1 kez	Erime Eğrileri

Tablo 3.19 RT-qPCR sıcaklık döngü protokolü (devam)

Soğutma		1 kez	-
Sıcaklık Hedefleri			
Sıcaklık	**Acqusition Modu**	**Durdurma (hh:mm:ss)**	**Ramp Oranı (˚C/s)**
UDG Aktivasyonu			
50°C	Yok	00:02:00	4.4
Dual-Lock DNA Polimeraz			
95°C	Yok	00:02:00	4.4
Bağlanma			
95°C	Yok	00:00:15	4.4
58°C	Yok	00:00:15	2.2
72°C	Tek	00:01:00	4.40
Erime			
95°C	Yok	00:00:15	1.60
60°C	Yok	00:01:00	1.60
95°C	Sürekli		0.11
Soğutma			
40°C	Yok	00:00:10	2.2

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Bitki Hücre Kültürü Çalışmaları

4.1.1 *in vitro* Ortamda Karakafes Otu Fidesi Büyütülmesi

Karakafes otu bitki tohumlarının daha kolay çimlenebilmesi için tedarik edilen bitki tohumları bir hafta boyunca suda bekletilmiş, ardından tohum kabukları yumuşayan tohumlar toprağa aktarılarak çimlenmeye bırakılmıştır. Toprağa aktarılan tohumlarda yaklaşık bir ay sonra çimlenme gözlemlenerek Şekil 4.1'de gösterilen karakafes otu bitkisi elde edilmiştir.



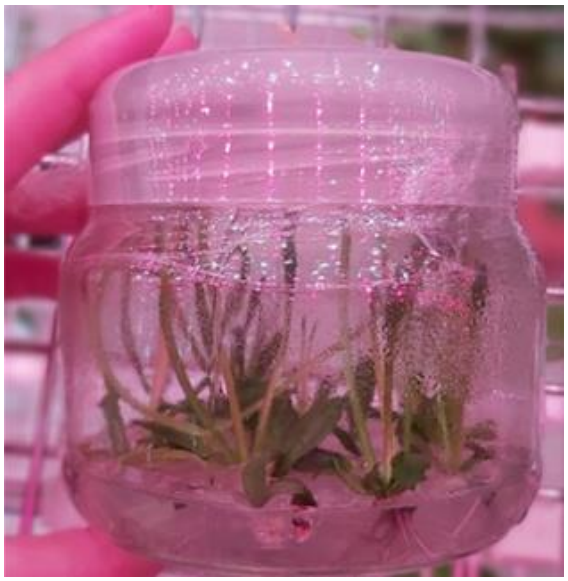
Şekil 4.1 Toprakta yetiştirilen karakafes otu bitkisi

Elde edilen karakafes otu bitkisinden *in vitro*'da fide büyütülmesi için Tablo 4.1'de verilen besin ortamlarında (A1-A5 besin ortamları) denemeler yapılmış yanıtlar kaydedilmiştir. Kullanılan tüm besin ortamları içinde en iyi sürgün oluşumunun A1 olarak isimlendirilen 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 1 mg/L IAA içeren MS besin ortamında (A2) eksplantta yoğun kök oluşumu, NAA içeren MS besin ortamında eksplantta kök oluşumu (A3), 2,4-D içeren MS besin ortamında eksplantta sararma (A4), Kinetin içeren MS besin ortamında eksplantta kahverengileşme (A5) gözlemlenmiştir.

Tablo 4.1 *in vitro* ortamda fide büyütülmesi için kullanılan besin ortamları ve elde edilen yanıtlar

Besin Ortamı Adı	**Besin Ortamı**	**Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)**					**Oluşan Yanıt**
		2,4-D	**NAA**	**IAA**	**BAP**	**Kinetin**	
A1	MS	-	-	-	1		Sürgün oluşumu
A2	MS	-	-	1	-		Yoğun kök oluşumu
A3	MS	-	1	-	-		Kök oluşumu
A4	MS	1	-	-	-		Eksplantta sararma
A5	MS	-	-	-	-	1	Eksplantta kahverengileşme

Şekil 4.2'de gösterildiği gibi A1 besin ortamında sürgün gelişimi gözlemlemiş ve bu besin ortamında elde edilen sürgünler 1. Alt kültürde MS besin ortamına aktarılmıştır. *in vitro*'da büyütülen fidelerin 3. alt kültürde yaprak eksplantlarından kallus uyarımı için farklı besin ortamlarında denemeler yapılmıştır.



Şekil 4.2 A1 besin ortamında oluşturulan sürgünlerin MS besin ortamına taşınmasıyla oluşan karakafes otu fidesi (1. alt kültür)



Şekil 4.3 MS besin ortamında çoğaltılan ve kallus kültürü çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanılan fideler (3. alt kültür)

4.1.2 Karakafes Otu Kallus Kültürü

in vitro ortamda büyütülen 3. alt kültürdeki fidelere ait yapraklar kallus uyarımı için kullanılmıştır. Tablo 4.2'de belirtilen B5 ve B10 besin ortamlarında kallus uyarımı gözlemlenirken, oluşan kalluslarda en iyi uyarım (kırılgan ve hızlı çoğalan hücreler) B5 besin ortamında elde edilmiştir.

Tablo 4.2 Kırılgan kallus kültürü için kullanılan besin ortamları ve elde edilen yanıtlar

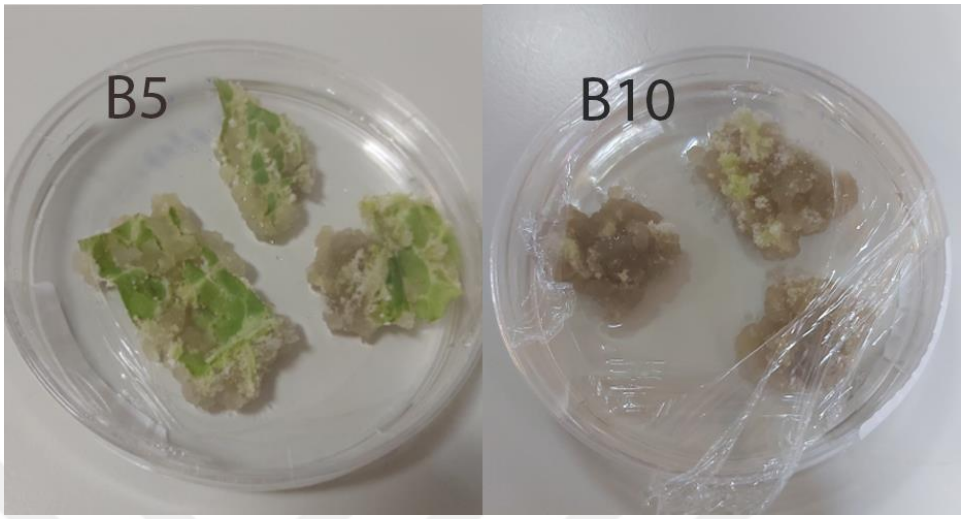
Besin Ortamı Adı	**Besin Ortamı**	**Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)**					**Oluşan Yanıt**
		2,4-D	**NAA**	**IAA**	**BAP**	**Kinetin**	
B1	MS	1	-	-	1	-	Sert kallus yanıtı
B2	MS	1		-		1	Sert ve kahvrengileşen kallus yanıtı
B3	MS	-	1	-	1	-	Kök ve sert kallus uyarımı
B4	MS	-	1	-	-	1	Kök yanıtı ve besin ortamında kahvrengileşme

Tablo 4.2 Kırılgan kallus kültürü için kullanılan besin ortamları ve elde edilen yanıtlar (devamı)

B5	MS	1	-	-	-	-	Kırılgan kallus oluşumu
B6	GB5	1	-	-	1	-	Sert kallus yanıtı
B7	GB5	1		-		1	Sert ve kahvrengileşen kallus yanıtı
B8	GB5	-	1	-	1	-	Kök ve sert kallus uyarımı
B9	GB5	-	1	-	-	1	Kök yanıtı ve besin ortamında kahvrengileşme
B10	Gamborg B5	1	-	-	-	-	Kırılgan kallus oluşumu

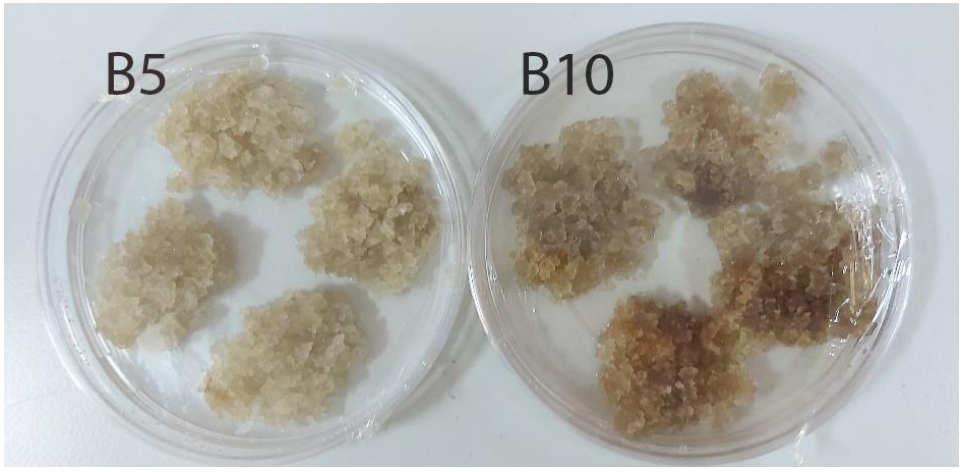
Tablo 4.2'de verildiği gibi farklı miktarlarda bitki büyüme düzenleyileri içeren 10 farklı (B1-B10) MS ve Gamborg B5 besin ortamları kullanılarak yaprak eksplantları aseptik koşullar altında pens ve bistüri yardımıyla yaralanarak kallus uyarımı yapılmıştır. İlgili besin ortamlarındaki yaprak eksplantları karanlıkta 25±2°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kallus uyarımlarında oluşan yanıtlar gözlemlenmiştir ve yaklaşık 3 hafta sonunda yaprak eksplantları üzerinde uyarım gözlemlenmiştir. Elde edilen kültürler ayda bir kez olacak şekilde yeni besin ortamlarına aktarılmıştır. Her bir alt kültürleme işleminde besin ortamlarındaki (B1-B10) yanıtlar gözlemlenerek kaydedilmiştir. 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L BAP bulunan besin ortamlarında (B1 ve B6), sert kallus yanıtı gözlemlenmiştir. 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L kinetin bulunan besin ortamlarında (B2 ve B7), sert ve kahverengileşen kallus yanıtı gözlemlenmiştir. 1 mg/L NAA ve 1 mg/L BAP bulunan besin ortamlarında (B3 ve B8), kök ve sert kallus uyarımı gözlemlenmiştir. 1 mg/L NAA ve 1 mg/L kinetin bulunan besin ortamlarında (B4 ve B9), kök oluşumu ve besin ortamında kahverengileşme gözlemlenmiştir. Sadece 1 mg/L 2,4-D bulunan besin ortamlarında (B5 ve B10) kırılgan kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin karakafes otu yaralanan yaprak eksplantlarında oluşturduğu yanıtlar incelendiğinde 2,4-

D’nin hücre çoğalmasını teşvik ettiği, NAA’nın kök oluşumunu uyardığı, BAP’ın kallus yapısında sertleşmeye neden olduğu, kinetinin kalluslarda ve yaprak eksplantında kahverengileşmeye neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.4 Karakafes otu yaprak eksplantlarında kallus uyarımı B5 (Açık renkli kallus oluşumu) ve B10 (Koyu renkli kallus oluşumu) besin ortamları 1. alt kültür

Şekil 4.4’de gösterildiği gibi B5 ve B10 besin ortamlarında kırılgan kallus yanıtı elde edilmiştir. Kalluslar ayda bir taze besin ortamına aktarılarak alt kültüre alınmıştır. B5 besin ortamında açık renkli, hızlı çoğalan ve kırılgan kalluslar elde edilmiştir. B10 besin ortamında ise koyu renkli, B5 besin ortamına göre çoğalma hızı daha yavaş olan kırılgan kalluslar elde edilmiştir. B5 besin ortamında elde edilen kalluslar 3. alt kültürde süspansiyon kültürlerinin oluşturulması amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.5 Karakafes otu bitkisinden elde edilen kırılgan kalluslar. B5 (Açık renkli kallus yanıtı) ve B10 (Koyu renkli kallus yanıtı) besin ortamları (3. alt kültür)

4.1.3 Karakafes Otu Kırılgan Kalluslarından Süspansiyon Kültürü Elde Edilmesi

B5 besin ortamında elde edilen hızlı çoğalan ve kırılgan yapıda olan 3. alt kültürdeki kalluslarla B5 sıvı besin ortamında süspansiyon kültürü oluşturulmuştur. Bunun için aseptik koşullar altında 50 ml sıvı besin ortamına 5 gram kallus hücreleri aktarılmıştır. Oluşturulan kültürler 110 rpm çalkalama hızında karanlıkta 25±2°C'de inkübe edilmiştir. 3 hafta sonunda süspanse olan hücreler steril bir elekten geçirilerek süspanse olmayan agregatlar uzaklaştırılmıştır. Hücre yoğunluğu %10'a düşürülerek 1. alt kültürleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

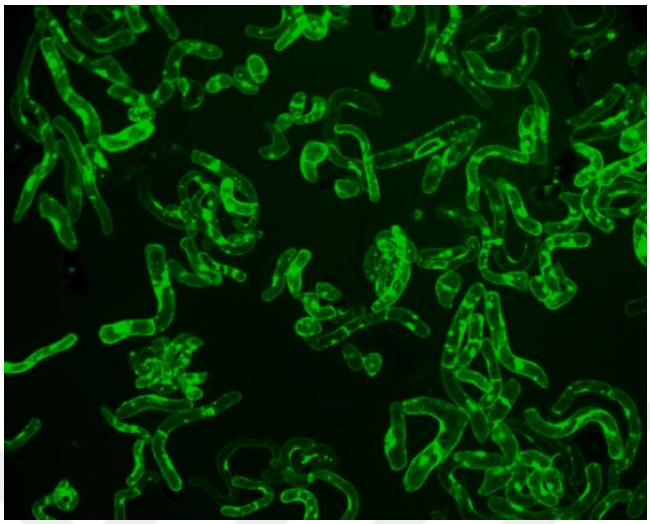
25ºC'de 110 rpm'de 14 gün inkübe edilen karakafes otu süspansiyon hücrelerinden aseptik koşullar altında serolojik pipet yardımıyla 10 ml homojen hale getirilmiş hücre süspansiyon örneği alınarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpüne aktarılan 10 ml hacimdeki hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pelet hacmi 6.5 ml bulunduğundan hücre süspansiyonlarının PCV'si %65 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6 B5 besin ortamında çoğaltilan karakafes otu hücre süspansiyon kültürü (3. alt kültür, 14. gün)

4.1.3.1 Floresin Diasetat Boyama

Hücre canlılığının belirlenmesi için hücre süspansiyonları boyanmış ardından 10X büyütme oranında hücreler görüntülenmiştir.

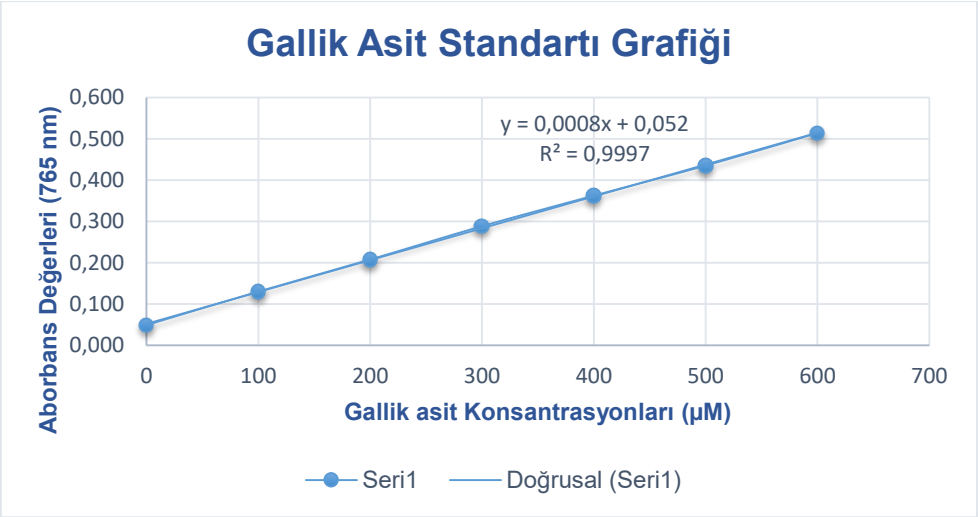


Şekil 4.7 10X büyütme oranında karakafes otu süspansiyon hücrelerinin mikroskop görüntüsü

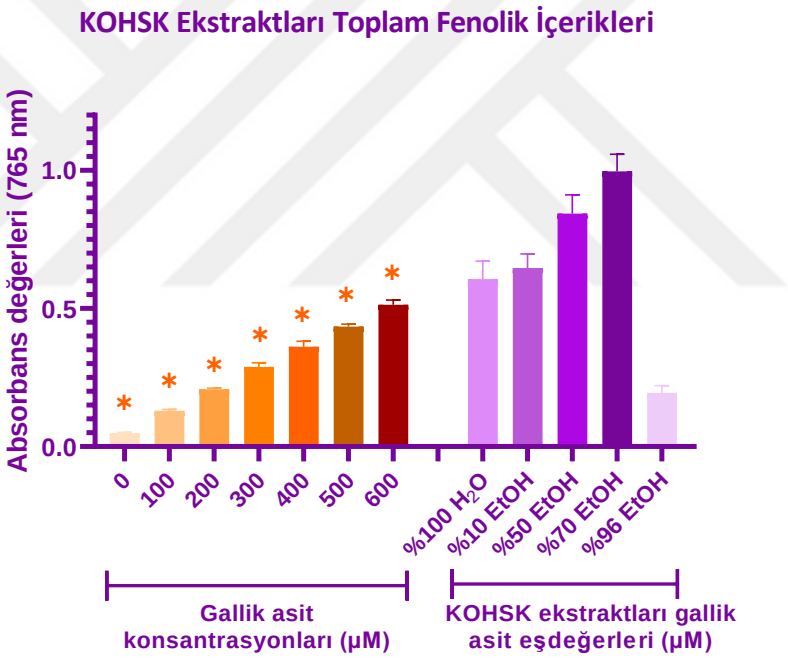
4.2 Kimyasal Analiz Çalışmaları

4.2.1 Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Folin-Ciocalteu deney absorbansı 765 nm'de okutulmuştur. Çizilen kalibrasyon grafiğinde konsantrasyona bağlı absorbans artışı gözlemlenmiştir. Her bir fenolik ekstraksiyonunu toplam fenolik içeriği gallik asit eşdeğeri çizilen kalibrasyon grafiğinde oluşan denkleme göre (y=0,0008x+0,052) hesaplanmıştır. Folin-Ciocalteu deneyi sonucunda %100 su çözücüsü ile hazırlanan ekstraktta 694 µM, %10 etanol çözücüsü ile hazırlanan ekstraktta 744 µM, %50 etanol çözücüsü ile hazırlanan ekstraktta 988.75 µM, %70 etanol çözücüsü ile hazırlanan ekstraktta 1181 µM, %96 etanol çözücüsü ile hazırlanan ekstraktta 179 µM gallik asit eşdeğeri bulunmuştur. Sonuçlara göre %70 etanol çözücüsü kullanılarak hazırlanan ekstraktın tüm ekstraktlar içinde en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8 Gallik asit standartı grafiği

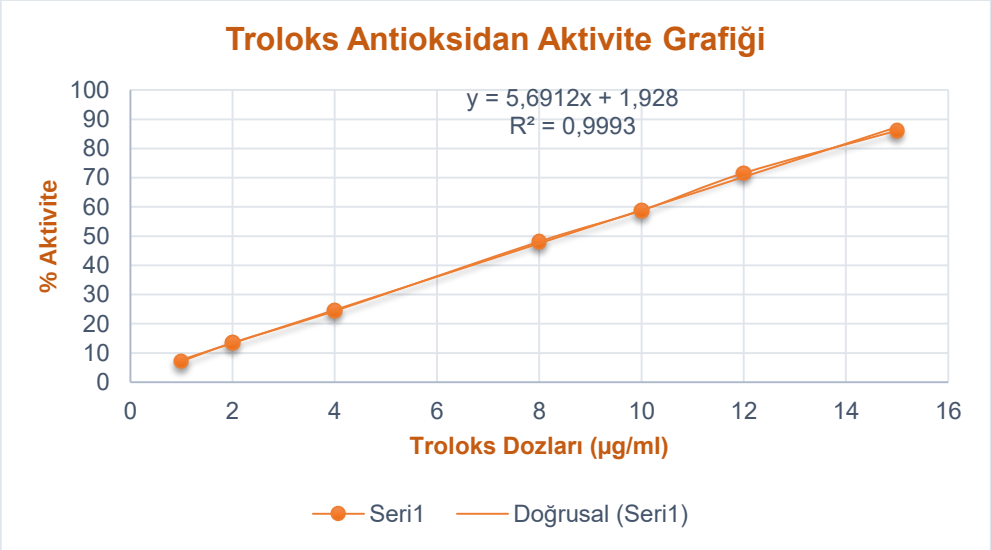


Şekil 4.9 KOHSK liyofilizatlarının farklı çözücü ekstrelerindeki toplam fenolik miktarının gallik eşdeğerleri

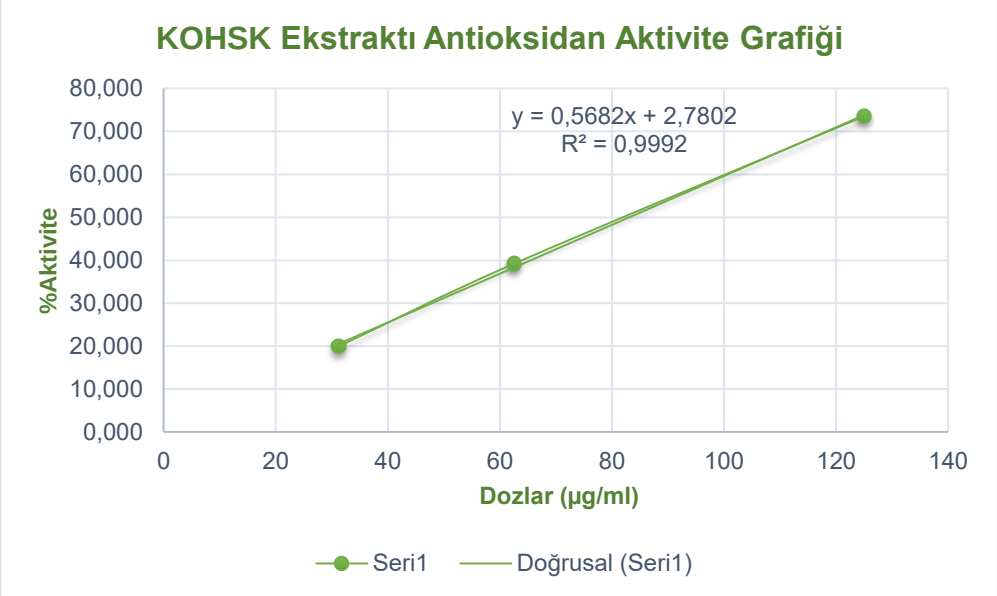
4.2.1.1 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Folin-Ciocalteu deneyi sonucuna göre KOHSK liyofilizatlarından %70 etanol kullanılarak ekstrakt elde edilmiş ve ekstrakt verimi %24 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu ekstrakt DPPH deneyinde kullanılarak antioksidan aktivite belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde standart olarak troloks kullanılmıştır. DPPH deney absorbansı 517 nm'de okutulmuştur. Çizilen troloks standartı grafiğinde konsantrasyona

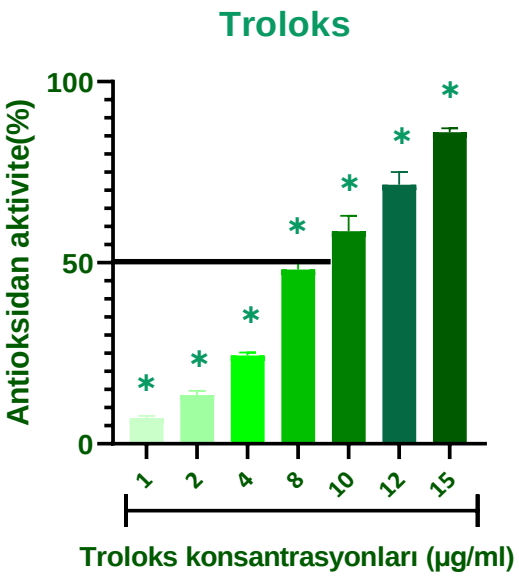
bağlı olarak % aktivite artışı gözlemlenmiştir. KOHSK ekstraktının % DPPH aktivitesi (Abskontrol-Absörnek)/AbskontrolX100 formülüyle hesaplanmıştır. KOHSK ekstraktının IC_{50} değeri konsantasyonlara karşılık gelen % aktivite ile çizilen grafikte %50'ye karşılık gelen konsantasyonlara olarak belirlenmiştir. KOHSK ekstraktının IC_{50} değerinin 83 µg/ml olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



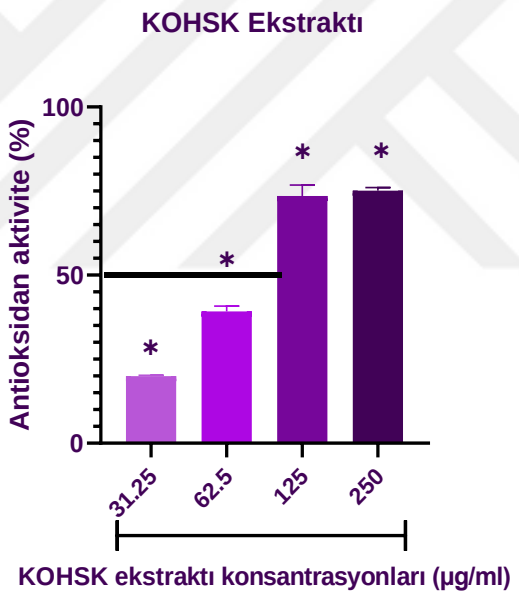
Şekil 4.10 Troloks doz bağımlı antioksidan aktivite grafiği



Şekil 4.11 KOHSK ekstraktı antioksidan aktivite grafiği



Şekil 4.12 Troloks doza bağımlı antioksidan sütün grafiği aktivite grafiği



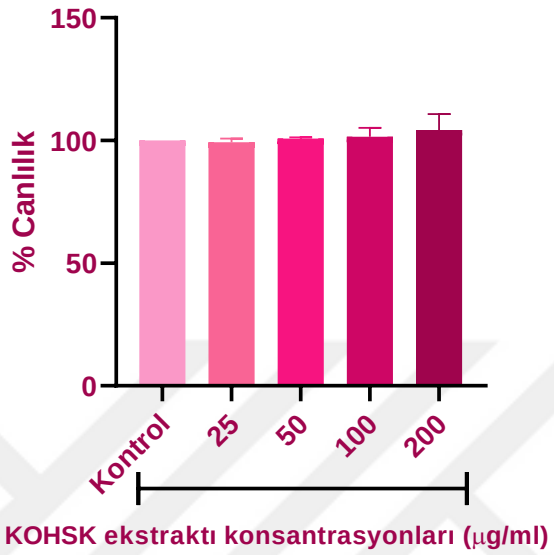
Şekil 4.13 KOHSK ekstraktı doza bağımlı antioksidan aktivite grafiği

4.3 Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1.1 *In vitro* Sitotoksisitenin Belirlenmesi

KOHSK ekstraktı 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonları kullanılarak CRL-2076 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı MTT deneyi ile belirlenmiştir. Mikroplaka okuyucu ve Gen5 programı kullanılarak yapılan okutma sonucunda elde edilen absorbans değerleri ortalamaları

alınmış ve ilgili formül kullanılarak hücrelerin canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. MTT deney sonucuna göre %70 etanol çözücüsü ile hazırlanan KOHSK ekstraktının uygulanan 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığını azaltıcı etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

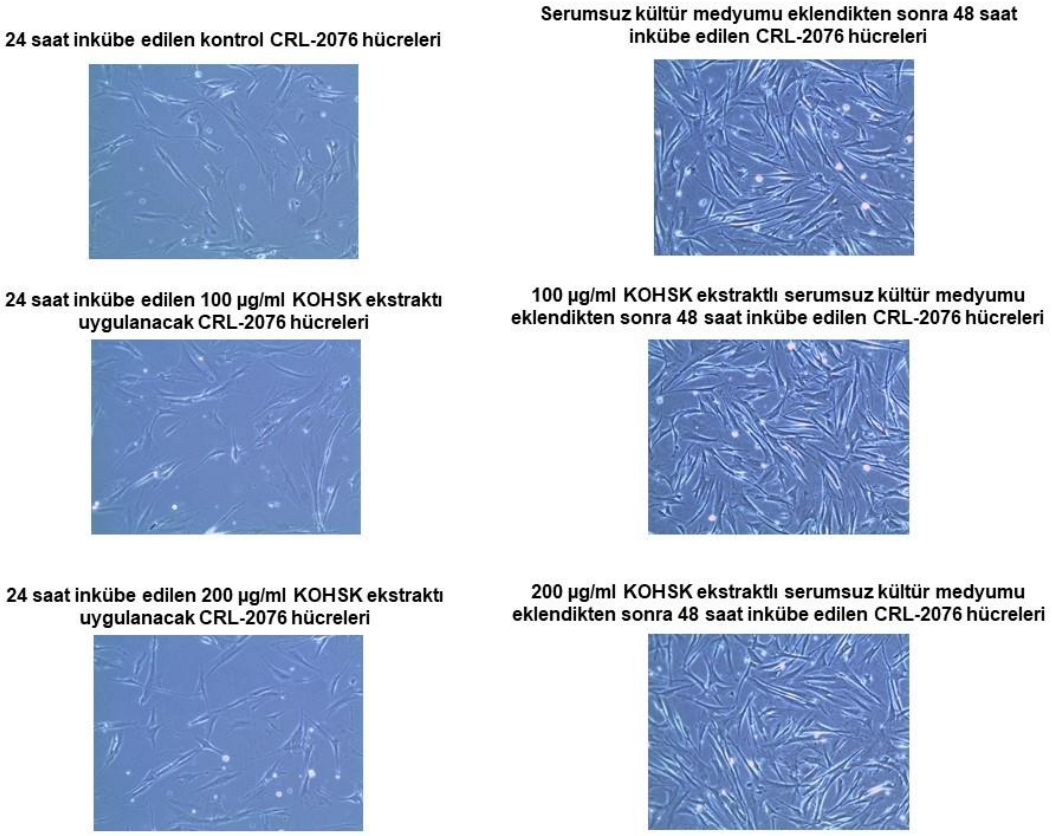


Şekil 4.14 MTT deneyi konsantrasyon bağımlı % canlılık grafiği

4.4 Moleküler Biyoloji ve Genetik Çalışmaları

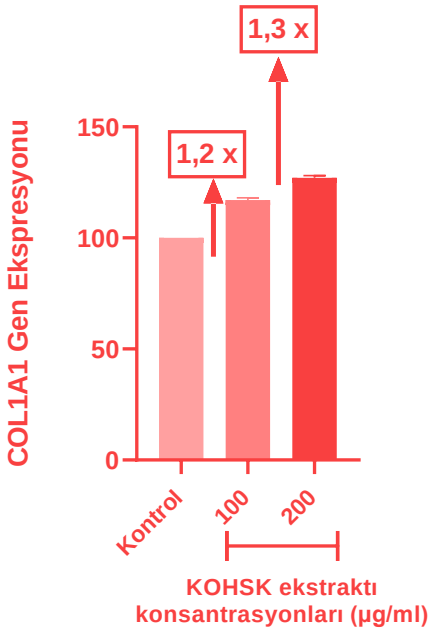
4.4.1 RT-qPCR Çalışmaları

Hücreler flaska ekim yapıldıktan sonra ve RNA izolasyonundan önce mikroskop altında incelenerek hücre yapıları ve canlılıkları gözlemlenmiştir. CRL-2076 hücreleri gen ifade analizleri için flasklara ekildikten 24 saat sonra kontrol hariç olacak şekilde KOHSK ekstraktı 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonları ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gen ifadesinin belirlenmesi için çoğaltılan hücreler ekim yapıldıktan sonra ve ekstrakt ile inkübasyondan sonra mikroskopta incelenmiştir.



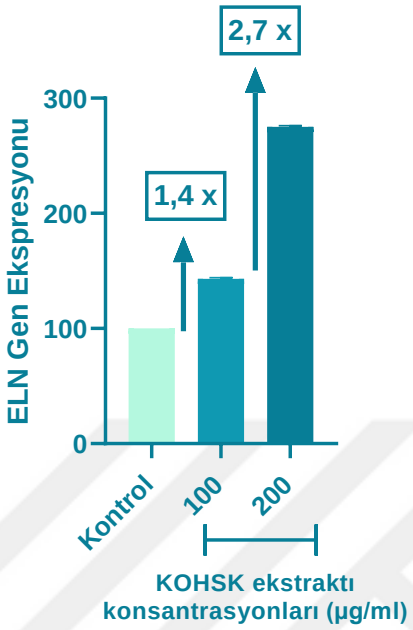
Şekil 4.15 RNA izolasyonu için inkübe edilen CRL-2076 hücreleri

Yapılan RT-qPCR çalışmasında kontrol grubuna (KOHSK ekstraktı uygulanmamış) kıyasla 100 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde COL1A1 geninin ifadesi 1,2 kat, 200 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde ise 1,3 kat arttığı belirlenmiştir.



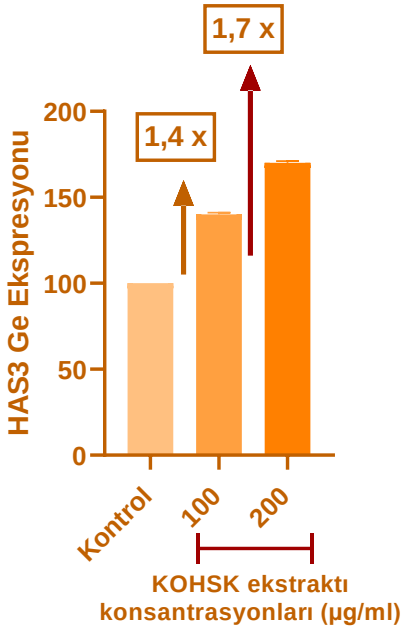
Şekil 4.16 KOHSK ekstraktının COL1A1 gen ifadesine etkisi

Yapılan RT-qPCR kontrol grubuna kıyasla 100 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde elastin geninin ifadesi 1,4 kat, 200 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde ise 2,7 kat arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.17 KOHSK ekstraktının ELN gen ifadesine etkisi

Hyalüronan Sentaz 3 (HAS3) geninin ifadesi ise KOHSK ekstraktı 100 µg/ml konsantrasyonu uygulanan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla 1,4 kat, 200 µg/ml KOHSK ekstraktı konsantrasyonda ise 1,7 kat artmıştır.



Şekil 4.18 KOHSK ekstraktının HAS3 gen ifadesine etkisi

Geçmişten günümüze değerli tıbbi bitkiler farklı sağlık alanlarında kullanılmaktadır. Bu bitkilerin bir kısmı ilaç etken maddesi olarak kullanılırken bir kısmı da kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Bitkilerin birçoğu değerli metabolitleri az miktarda bulundurur ve bu durum metabolitlerin elde edilmesi için fazla miktarda bitki kullanma ihtiyacını oluşturur. Bu nedenle bitkilerdeki değerli metabolitlerin elde edilebilmesi için biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması yerinde bir yaklaşım olmaktadır. Bitki hücre süspansiyon kültürü değerli metabolitlerin eldesi için sürdürülebilir bir kaynaktır. Yapılan birçok çalışmada hücre süspansiyon kültürleri ile kozmetik ve ilaç sektörüne yönelik metabolitlerin endüstriyel boyutta üretiminin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında karakafes otu bitkisinin hücre süspansiyon kültürünün elde edilmesi ve KOHSK ekstraktının yaşlanma karşıtı aktivite potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Karakafes otu bitkisinin yara iyileştirici aktivitesinin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Ancak şimdiye kadar KOHSK ekstraktının fibroblast hücrelerinde yaşlanma karşıtı aktivitesinin gen ekspresyonu düzeyinde araştırıldığı bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmayla birlikte KOHSK ekstraktının CRL-2076 hücreleri üzerinde yaşlanma karşıtı aktivitesi değerlendirilmiştir.

Literatürde yapılan bir çalışmada karakafes otu süspansiyon kültürlerinde glutamin birikimi 0,5 mg/L 2,4-D ile 0,3-3 mg/L kinetin içeren MS besin ortamları kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada en yüksek glutamin biriktiren karakafes otu süspansiyon kültürünün 0,5 mg/L 2,4-D ile 0,3 mg/L kinetin içeren MS besin ortamı olduğu sonucuna ulaşılmıştır [94]. Yapılan bir başka çalışmada karakafes otundan elde edilen kallus rejenerantları çeşitli fitohormonların varlığında kültürlenerek fruktan içerikleri incelenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda indol-3-butirik asit ile sadece kökler oluşurken, çeşitli konsantrasyonlarda BAP, kinetin ve zeatin kök ve sürgün oluşumunu indüklemiştir [95]. Yapılan bir diğer bir çalışmada karakafes otu doku ve hücre süspansiyon kültürlerinden bitki rejenerasyonu ve *in vitro* kültürün pirolizidin alkaloid üretimine etkisi araştırılmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri, sıvı Gamborg B5 ortamına transfer edilerek Gamborg B5 ile büyütülmüş kalluslardan türetilmiştir. 2,4-D (2 mg/L) ve BAP (1 mg/L) içeren B5 ortamında büyütülen kallus dokusundan hücre süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Bir hücre süspansiyon kültüründen alınan hücreler, 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IAA içeren MS ortamına aktarılıp fotoperiyotta tutulduğunda kalluslar yeşile dönerek farklılaşmıştır. Yaklaşık iki ay sonra elde edilen bitkicikler toprağa aktarılmıştır [96]. Bir başka çalışmada ise 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IAA içeren MS ortamının

organogenez yoluyla kallustan çoklu sürgün rejenerasyonu için en iyi besin ortamı olduğu sonucuna ulaşılmıştır [97]. Bahsedilen tüm çalışma verileri değerlendirildiğinde farklı amaçlar için *in vitro* ortamda fide eldesi, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanıldığı sonucuna ulaşılmıştır. Literatürde *in vitro* ortamda fide elde edilmesi sürecinde kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri bu tez çalışmasında denendiğinde kırılgan kallus yanıtını desteklemediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda karakafes otu yaprak eksplantlarında en kırılgan ve hızlı çoğalan kallus uyarımı 1 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında oluştuğu sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde yapılan bir çalışmada karakafes otu sulu ve etanolik ekstraktlarının antioksidan etkileri değerlendirilmiştir. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürücü ve Folin-Ciocalteu deneyleri ile belirlenmiştir. Ekstraktların çoğalma etkileri ile 3T3 Swiss albino fare fibroblast hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Etanolik ekstrakt (39,97 µg/ml IC_{50} değeri), sulu ekstrakt (96,21 µg/ml IC_{50} değeri) ile karşılaştırıldığında DPPH radikaline karşı daha güçlü radikal süpürme aktivitesi sergilemiştir. Benzer şekilde, etanolik ekstraktın süperoksit radikal süpürme aktivitesinin (IC_{50} değeri 190,76 µg/ml), sulu ekstrakttan (IC_{50} değeri 307,42 µg/ml) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Karakafes otunun etanolik ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla 116,93 mg GAE/g ve 99,49 mg GAE/g olduğu ve daha fazla fenolik bileşik miktarının daha güçlü radikal süpürücü etkiye yol açtığını gösterilmiştir [98] Literatürde elde edilen toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite değerleri bu tez çalışmasında elde edilen verilerle kıyaslandığında elde edilen literatür verileriyle desteklenebildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında karakafes otu hücre liyofilizatları ile hazırlanan ekstraktlarda toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu deneyi ile belirlenmiş ve yapılan değerlendirme sonucunda %70 etanol ekstraktının 1181 µM gallik asit eşdeğeri ile en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Karakafes otu hücre ekstraktının % DPPH aktivitesi DPPH antioksidan tahlili ile belirlenmiştir. Buradan hareketle KOHSK %70 etanol ekstraktının yarılanma konsantrasyonu (IC_{50} değeri) DPPH deneyi ile 83 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Literatürde yapılan bir çalışmada karakafes otunun sulu ve etanolik ekstraktlarının proliferatif etkilerini değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerle her iki ekstrenin de 3T3 Swiss albino fare fibroblast hücreleri üzerinde proliferatif aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir [98] Literatürde yapılan bir başka çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda

karakafes otu kök ekstraktlarının (50–200 µg/mL) HSF hücreleri üzerindeki toksisitesi üzerindeki etkisi MTT testi kullanılarak araştırılmıştır. 72 saat inkübasyondan sonra hücre canlılığında hafif düşüşler gözlemlense de sulu ve alkollü ekstrelerin 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır [17]. Literatürde elde edilen MTT testi verileri bu tez çalışmasında elde edilen verilerle kıyaslandığında elde edilen sonuçların literatür verileriyle desteklenebildiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tez çalışmasında KOHSK ekstraktının hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi için CRL-2076 hücreleri kullanıldığında KOHSK ekstraktının 50-200 µg/ml konsantrasyonlarının 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında KOHSK ekstraktının *in vitro* anti-aging etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmak amacıyla gen düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. KOHSK ekstraktının yaşlanma karşıtı aktivite ile ilişkilendirilebilecek COL1A1, ELN ve HAS3 enzimi kodlayan genlerin gen düzeyinde ifadelerine etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla COL1A1, ELN ve HAS3 geninin ifadesinde anlamlı bir değişikliğe yol açmıştır.

Yapılan RT-qPCR çalışmasında 100 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla COL1A1 geninin ifadesinin %1,2, ELN geninin ifadesinin %1,4 ve HAS3 geninin ifadesinin %1,4 oranında arttığı belirlenmiştir. 200 µg/ml KOHSK ekstraktı uygulanan hücrelerde ise COL1A1 geninin ifadesinin %1,3, ELN geninin ifadesinin %2,7 ve HAS3 geninin ifadesinin %1,7 oranında arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu veriler doğrultusunda KOHSK ekstraktı, yaşlanma karşıtı kozmetik ürünlerde kullanılmak üzere güvenilir ve etkili bir ajan olarak değerlendirilebilir. Bu tez çalışmasında yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde KOHSK ekstraktının yaşlanma karşıtı aktivite gösterme potansiyeline sahip olduğu ve yaşlanma karşıtı etken hammadde olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. KOHSK ekstraktının *in vitro* olarak belirlenen yaşlanma karşıtı aktivitesini *in vivo* olarak doğrulamak için gönüllü kişiler üzerinde etkinlik testlerinin yürütülmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKÇA

[1] Ö. S. Babaoğlu Mehmet, Gürel Ekrem, "Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları)," *Selçuklu Üniversitesi*, p. Bölüm1, 2002.

[2] H. S. Chawla, *Introduction to plant biotechnology*. 2011. doi: 10.1201/9781315275369.

[3] F. Constabel and J. P. Shyluk, "Initiation, Nutrition, and Maintenance of Plant Cell and Tissue Cultures," *Plant Cell Tissue Cult.*, no. 1983, pp. 3–15, 1994, doi: 10.1007/978-94-017-2681-8_1.

[4] A. Barbulova, F. Apone, and G. Colucci, "Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients," *Cosmetics*, vol. 1, no. 2. MDPI AG, pp. 94–104, Jun. 01, 2014. doi: 10.3390/cosmetics1020094.

[5] P. D. İ. Kocaçalışkan, *Bitki kültürleri (Organ, doku, hücre)*. 2008.

[6] R. Eibl, P. Meier, I. Stutz, D. Schildberger, T. Hühn, and D. Eibl, "Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 20, pp. 8661–8675, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-9279-8.

[7] Ş. Topcu and H. Çölgeçen, "Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi," *Türk Bilim. Derlemeler Derg.*, vol. 8, no. 2, pp. 09–29, 2015.

[8] I. Smetanska, "Production of secondary metabolites using plant cell cultures," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 111, no. July, pp. 187–228, 2008, doi: 10.1007/978-3-540-70536-9.

[9] A. Barbulova, G. Colucci, and F. Apone, "New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients," *Cosmetics*, vol. 2, no. 2, pp. 82–92, 2015, doi: 10.3390/cosmetics2020082.

[10] G. Krasteva, V. Georgiev, and A. Pavlov, "Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods," *Eng. Life Sci.*, vol. 21, no. 3–4, pp. 68–76, 2021, doi: 10.1002/elsc.202000078.

[11] S. Trehan, B. Michniak-Kohn, and K. Beri, "Plant stem cells in cosmetics: Current trends and future directions," *Futur. Sci. OA*, vol. 3, no. 4, 2017, doi:

10.4155/fsoa-2017-0026.

[12] C. Schürch, P. Blum, and F. Zülli, “Potential of plant cells in culture for cosmetic application,” *Phytochem. Rev.*, vol. 7, no. 3, pp. 599–605, 2008, doi: 10.1007/s11101-007-9082-0.

[13] C. Staiger, “Comfrey root: From tradition to modern clinical trials,” *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 163, no. 3–4, pp. 58–64, 2013, doi: 10.1007/s10354-012-0162-4.

[14] R. Zsuzsanna, B.-S. Assessor, and D. Csupor, “Assessment report on Symphytum officinale L., radix,” *Eur. Med. Agency*, vol. 44, no. May, pp. 1–27, 2015, [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2015/06/WC500187600.pdf

[15] V. L. Savic *et al.*, “Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root,” *Phyther. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 1117–1122, 2015, doi: 10.1002/ptr.5356.

[16] K. Mulkijanyan *et al.*, “Burn Healing Compositions from Caucasian Species of Comfrey (Symphytum L.),” *Pharmacochemistry*, vol. 3, 2009.

[17] I. Sowa *et al.*, “Proliferative and antioxidant activity of Symphytum officinale root extract,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 32, no. 5, pp. 605–609, 2018, doi: 10.1080/14786419.2017.1326492.

[18] B. Salehi *et al.*, “Symphytum species: A comprehensive review on chemical composition, food applications and phytopharmacology,” *Molecules*, vol. 24, no. 12, pp. 1–33, 2019, doi: 10.3390/molecules24122272.

[19] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, and R. Wolf, “Structure and function of the epidermis related to barrier properties,” *Clin. Dermatol.*, vol. 30, no. 3, pp. 257–262, 2012, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.

[20] A. C. Weihermann, M. Lorencini, C. A. Brohem, and C. M. de Carvalho, “Elastin structure and its involvement in skin photoageing,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 241–247, 2017, doi: 10.1111/ics.12372.

[21] E. Papakonstantinou, M. Roth, and G. Karakiulakis, “Hyaluronic acid: A key

molecule in skin aging," *Dermatoendocrinol.*, vol. 4, no. 3, pp. 37–41, 2012, doi: 10.4161/derm.21923.

[22] H. Yetkin, A. M. Ceyhan, and M. Yıldırım, "Deri yaşlanması ve tedavisi," *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.*, vol. 16, no. 2, pp. 32–38, 2009, doi: 10.17343/sdutfd.42025.

[23] L. Duque, K. Bravo, and E. Osorio, "A holistic anti-aging approach applied in selected cultivated medicinal plants: A view of photoprotection of the skin by different mechanisms," *Ind. Crops Prod.*, vol. 97, pp. 431–439, 2017, doi: 10.1016/j.indcrop.2016.12.059.

[24] Z. Mei Xiong, M. O'Donovan, L. Sun, J. Young Choi, M. Ren, and K. Cao, "Anti-Aging Potentials of Methylene Blue for Human Skin Longevity," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02419-3.

[25] H. Y. Jung, J. C. Shin, S. M. Park, N. R. Kim, W. Kwak, and B. H. Choi, "Pinus densiflora extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression," *Toxicol. Reports*, vol. 1, pp. 658–666, 2014, doi: 10.1016/j.toxrep.2014.08.010.

[26] H. Lee, Y. Hong, S. H. Kwon, J. Park, and J. Park, "Anti-aging effects of Piper cambodianum P. Fourn. extract on normal human dermal fibroblast cells and a wound-healing model in mice," *Clin. Interv. Aging*, vol. 11, pp. 1017–1026, 2016, doi: 10.2147/CIA.S107734.

[27] M. Miastkowska and E. Sikora, "Anti-aging properties of plant stem cell extracts," *Cosmetics*, vol. 5, no. 4, 2018, doi: 10.3390/cosmetics5040055.

[28] J. C. Neal Stewart, *Plant biotechnology and genetics: Principles, techniques and applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.

[29] A. Fehér, "Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1849, no. 4, pp. 385–402, 2015, doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.07.005.

[30] B. Duchefa, "Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemicals," 2012.

[31] E. F. George, M. A. Hall, and G. J. De Klerk, "The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients," *Plant Propag. by Tissue Cult. 3rd Ed.*, vol. 1, pp. 65–113, 2008, doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3_3.

[32] B. E. Algül, F. E. Tekintaş, and G. Günver Dalkılıç, “Bitki büyüme düzenleyïcilerïnïn kullanımı ve içsel hormonlar bïyosentezini arttırıcı uygulamalar,” *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.*, vol. 13, no. 2, pp. 87–87, 2016, doi: 10.25308/aduziraat.294100.

[33] A. M. Kumlay and T. Eryiğit, “Bitkilerde büyüme ve gelişmesini düzenleyici maddeler: Bitki hormonları,” *Iğdır Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, vol. 1, no. 2, pp. 47–56, 2011.

[34] S. Te-chato, A. Hilae, and K. In-peuy, “Effects of cytokinin types and concentrations on growth and development of cell suspension culture of oil palm,” *J. Agric. Technol.*, vol. 4, no. 2, pp. 157–163, 2008.

[35] T. Efferth, “Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures,” *Engineering*, vol. 5, no. 1, pp. 50–59, 2019, doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006.

[36] E. F. George, *Plant propagation by tissue culture*. 2008.

[37] T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid groth and bio assays with tobacco tissue cultures,” *Physiol. Plant.*, vol. 15, pp. 474–497, 1962.

[38] R. O. Y. U. Schenk and A. C. Hildebrandt, “Medium and tecniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures,” *Can. J. Bot.*, vol. 50, no. 12, 1972.

[39] O. L. Gamborg, R. A. Miller, and K. Ojima, “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 50, no. 1, pp. 151–158, 1968, doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.

[40] R. Verpoorte and J. Memelink, “Engineering secondary metabolite production in plants,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 2, pp. 181–187, 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00308-7.

[41] C. Sloby, T. B. G. Egziabher, S. Edwards, G. Kahl, and N. Okafor, *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology SECOND EDITION*, vol. 53, no. 9. 2020. doi: 10.1002/9783527809080.cataz06805.

[42] N. Okafor, *Modern Industrial*, vol. 3, no. 12. 2007. [Online]. Available: http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/book_reviews/MTNOV07/MTN07_12.cfm

[43] R. Harhaun, O. Kunik, D. Saribekova, and G. Lazzara, “Biologically active properties of plant extracts in cosmetic emulsions,” *Microchem. J.*, vol. 154, no. December 2019, p. 104543, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2019.104543.

[44] U. S.-G. Martyna Moruś, Monika Baran, Magdalena Rost-Roszkowska, “Plant stem cells as innovation in cosmetics,” *Acta Pol. Pharm.*, vol. 71, no. 5, pp. 701–707, 2014.

[45] T. A. Osbaldeston, *Dioscorides de materia medica, being an herbal with many other medicinal materials*. 2000.

[46] N. Nastić, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, J. Švarc-Gajić, and A. Segura-Carretero, “Comparative assessment of phytochemical profiles of Comfrey (Symphytum officinale L.) root extracts obtained by different extraction techniques,” *Molecules*, vol. 25, no. 4, 2020, doi: 10.3390/molecules25040837.

[47] M. Nadeem *et al.*, “Applied sciences therapeutic potential of rosmarinic acid : A comprehensive review,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 3139, 2019.

[48] H. Singh, J. Du, P. Singh, and T. H. Yi, “Role of green silver nanoparticles synthesized from Symphytum officinale leaf extract in protection against UVB-induced photoaging,” *J. Nanostructure Chem.*, vol. 8, no. 3, pp. 359–368, 2018, doi: 10.1007/s40097-018-0281-6.

[49] J. Seigner *et al.*, “A symphytum officinale root extract exerts anti-inflammatory properties by affecting two distinct steps of NF-κB signaling,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. APR, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00289.

[50] N. Kuş, S. H. Bayari, and R. Fausto, “Thermal decomposition of allantoin as probed by matrix isolation FTIR spectroscopy,” *Tetrahedron*, vol. 65, no. 47, pp. 9719–9727, 2009, doi: 10.1016/j.tet.2009.09.088.

[51] Y. C. Fu, L. H. A. Ferng, and P. Y. Huang, “Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bulbil of the Dioscorea species,” *Food Chem.*, vol. 94, no. 4, pp. 541–549, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.12.006.

[52] G. D. Kim, Y. S. Park, Y. H. Jin, and C. S. Park, “Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 5, pp. 2083–2092, 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6395-

6.

[53] H. Ekiert, I. Kwiecień, and A. Szopa, “Rosmarinic acid production in plant in vitro cultures.,” *Polish J. Cosmetol.*, vol. 16, no. 1, pp. 49–58, 2013.

[54] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A. R. Gohari, and M. P. Hamedani, “Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family,” *Pharmacogn. Mag.*, vol. 8, no. 29, pp. 37–41, 2012, doi: 10.4103/0973-1296.93316.

[55] M. Petersen, “Rosmarinic acid: New aspects,” *Phytochem. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 207–227, 2013, doi: 10.1007/s11101-013-9282-8.

[56] A. Trifan *et al.*, “Is comfrey root more than toxic pyrrolizidine alkaloids? Salvianolic acids among antioxidant polyphenols in comfrey (Symphytum officinale L.) roots,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 112, no. December 2017, pp. 178–187, 2018, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.051.

[57] J. H. C. Ho and C. Y. Hong, “Salvianolic acids: Small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–5, 2011, doi: 10.1186/1423-0127-18-30.

[58] L. Ma, L. Tang, and Q. Yi, “Salvianolic acids: Potential source of natural drugs for the treatment of fibrosis disease and cancer,” *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. FEB, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00097.

[59] Z. N. Xiang and Z. X. Ning, “Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 7, pp. 1189–1203, 2008, doi: 10.1016/j.lwt.2007.08.006.

[60] M. Naveed *et al.*, “Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 97, no. October 2017, pp. 67–74, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064.

[61] Y. Sato *et al.*, “In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid,” *Int. J. Pharm.*, vol. 403, no. 1–2, pp. 136–138, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.09.035.

[62] I. Gülçin, “Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid),” *Toxicology*, vol. 217, no. 2–3, pp. 213–220, 2006, doi:

10.1016/j.tox.2005.09.011.

[63] M. R. Olthof, P. C. H. Hollman, and M. B. Katan, “Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans,” *J. Nutr.*, vol. 131, no. 1, pp. 66–71, 2001, doi: 10.1093/jn/131.1.66.

[64] T. Stegemann, L. H. Kruse, M. Brütt, and D. Ober, “Specific Distribution of Pyrrolizidine Alkaloids in Floral Parts of Comfrey (Symphytum officinale) and its Implications for Flower Ecology,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 45, no. 2, pp. 128–135, 2019, doi: 10.1007/s10886-018-0990-9.

[65] A. W. Brown *et al.*, “The comparative toxicity of a reduced, crude comfrey (Symphytum officinale) alkaloid extract and the pure, comfrey-derived pyrrolizidine alkaloids, lycopsamine and intermedine in chicks (Gallus gallus domesticus),” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 36, no. 5, pp. 716–725, 2016, doi: 10.1002/jat.3205.

[66] S.-J. Kang *et al.*, “Evaluation of the skin moisturizing effects and underlying mechanisms of pomegranate concentrate solution and dried pomegranate concentrate powder,” *J. Korean Med.*, vol. 37, no. 2, pp. 12–22, 2016, doi: 10.13048/jkm.16017.

[67] C. Gomes, A. C. Silva, A. C. Marques, J. S. Lobo, and M. H. Amaral, “Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines,” *Cosmetics*, vol. 7, no. 2, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3390/COSMETICS7020033.

[68] M. A. C. & T. Q. & J. J. V. & G. J. Fisher1, “Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging,” *J. Cell Commun. Signal.*, no. 12, pp. 35–43, 2018, doi: 10.1016/0002-9378(66)90404-2.

[69] D. J. Tobin, “Introduction to skin aging,” *J. Tissue Viability*, vol. 26, no. 1, pp. 37–46, 2017, doi: 10.1016/j.jtv.2016.03.002.

[70] M. I. Avila Rodríguez, L. G. Rodríguez Barroso, and M. L. Sánchez, “Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications,” *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 17, no. 1, pp. 20–26, 2018, doi: 10.1111/jocd.12450.

[71] Y. Oishi, Z. W. Fu, Y. Ohnuki, H. Kato, and T. Noguchi, “Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: Effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and

tissue inhibitors of metalloproteinases," *Br. J. Dermatol.*, vol. 147, no. 5, pp. 859–868, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04949.x.

[72] J. A. Foster, "Elastin," *Encycl. Biol. Chem. Second Ed.*, vol. 70, no. 04, pp. 192–193, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00170-5.

[73] N. R. Mustafa, W. De Winter, F. Van Iren, and R. Verpoorte, "Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures," *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 6, pp. 715–742, 2011, doi: 10.1038/nprot.2010.144.

[74] P. Growth *et al.*, "Phyto Technology Laboratories ®," pp. 341–343, 2007.

[75] P. Growth *et al.*, "Plant Growth Regulators Plant Growth Regulators Are for Laboratory Use, Plant Tissue Culture Media Preparation, and Plant Research Purposes Only. They Are Not for Use As Plant Growth Regulators on Developed Plants. They Are Not for Drug or Household Use," *PhytoTechnology Lab.*, 2016.

[76] J. M. Becker, G. A. Caldwell, and E. A. Zachgo, *A Laboratory Course*, United Kin. Academic Press. ınc, 1990.

[77] E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 4, pp. 875–877, 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.102.

[78] R. A. Khan, M. R. Khan, S. Sahreen, and M. Ahmed, "Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of Sonchus asper (L.) Hill," *Chem. Cent. J.*, vol. 6, no. 1, p. 12, 2012, doi: 10.1186/1752-153X-6-12.

[79] V. Boyd, O. M. Cholewa, and K. K. Papas, "Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans.," *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, vol. 2, no. 2, pp. 66–84, 2008, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814586%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2931281

[80] Laboratory Procedures for Plant Cell Lines, "Viability test with Fluorescein diacetate (FDA)," p. 90105.

[81] S. Albayrak, O. Sağdiç, A. Aksoy, and A. Kelimeler, "Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler The assays used for assessing antioxidant capacities of herbal products and foods,"

Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg., vol. 26, no. 4, pp. 401–409, 2010, [Online]. Available: http://dergipark.gov.tr/download/article-file/236232

[82] S. A. Seyhan, "DPPH•Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi," *Batman Univ. J. Life Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 125–135, 2019.

[83] A. A. Adedapo, F. O. Jimoh, A. J. Afolayan, and P. J. Masika, "Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of Celtis africana," *Rec. Nat. Prod.*, vol. 3, no. 1, pp. 23–31, 2009.

[84] E. Büyüktuncel, "Main spectrophotometric methods for the determination of total phenolic content and antioxidant capacity," *Marmara Pharm. J.*, vol. 17, no. 2, pp. 93–103, 2013, doi: 10.12991/201317377.

[85] O. Tokur and A. Aksoy, "In Vitro Sitotoksisite Testleri Orhan TOKUR * , Abdurrahman AKSOY," *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Derg.*, vol. 6, no. 1, pp. 112–118, 2017.

[86] K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, "Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1601, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.

[87] G. Fotakis and J. A. Timbrell, "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicol. Lett.*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177, 2006, doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.

[88] A. Van Tonder, A. M. Joubert, and A. D. Cromarty, "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays," *BMC Res. Notes*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s13104-015-1000-8.

[89] T. Mosmann, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, pp. 55–63, 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[90] P. Bornstein and H. Sage, "Regulation of Collagen Gene Expression," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 37, no. C, pp. 67–106, 1989, doi: 10.1016/S0079-6603(08)60695-9.

[91] C. M. Kielty, "Elastic fibres in health and disease," *Expert Rev. Mol. Med.*, vol.

8, no. 19, pp. 1–23, 2006, doi: 10.1017/S146239940600007X.

[92] Y. Ota, H. Yoshida, Y. Endo, T. Sayo, and Y. Takahashi, “A Connecting Link between Hyaluronan Synthase 3-Mediated Hyaluronan Production and Epidermal Function,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 5, 2022, doi: 10.3390/ijms23052424.

[93] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, “Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method,” *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.73.

[94] H. Tanaka, Y. Machida, H. Tanaka, N. Mukai, and M. Misawa, “Accumulation of glutamine by suspension cultures of Symphytum officinale,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 38, no. 5, pp. 987–992, 1974, doi: 10.1080/00021369.1974.10861279.

[95] E. C. C. Haafl, D. A., A. Abou-Mandour, W. Blaschek, G. Franz, “The influence of phytohormones on growth, organ differentiation and fructan production in callus of Symphytum officinale L.,” *Plant Cell Rep.*, vol. 10, pp. 421–424, 1991.

[96] H. J. Huizing, E. C. Pfauth, T. M. Malingré, and J. H. Sietsma, “Regeneration of plants from tissue- and cell suspension cultures of Symphytum officinale L. and effect of in vitro culture on pyrrolizidine alkaloid production,” *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 2, no. 3, pp. 227–238, 1983, doi: 10.1007/BF00033561.

[97] S. Vântu, “Indirect Organogenesis of Symphytum officinale L .,” no. 4, pp. 67–72, 2020.

[98] F. Ustun Alkan, C. Anlas, O. Ustuner, T. Bakırel, and A. Bilge Sari, “Antioxidant and proliferative effects of aqueous and ethanolic extracts of Symphytum officinale on 3T3 Swiss albino mouse fibroblast cell line,” *Pelagia Res. Libr. Asian J. Plant Sci. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 62–68, 2014, [Online]. Available: www.pelagiaresearchlibrary.com

A
FOLIN-CIOCALTEU DENEYİ

Tablo A.1 Folin-Ciocalteu deneyi gallik asit absorbans değerleri

	Gallik asit standartı (%80 metanol)						
	Blank	**100 µM**	**200 µM**	**300 µM**	**400 µM**	**500 µM**	**600 µM**
1. Deney	0,049	0,131	0,21	0,298	0,367	0,434	0,537
	0,043	0,136	0,212	0,31	0,397	0,451	0,522
	0,049	0,135	0,201	0,297	0,362	0,436	0,526
2. Deney	0,049	0,125	0,21	0,271	0,354	0,43	0,502
	0,049	0,124	0,202	0,277	0,347	0,431	0,501
	0,052	0,127	0,209	0,275	0,345	0,426	0,493
Ortalama absorbans değerleri	**0,049**	**0,130**	**0,207**	**0,288**	**0,362**	**0,435**	**0,514**

Tablo A.2 Folin-Ciocalteu deneyi KOHSK liyofilizat ekstraktları absorbans değerleri

	KOHSK ekstraktları (10 mg/ml)				
	%100 dH_2O	**%10 EtOH**	**%50 EtOH**	**%70 EtOH**	**%96 EtOH**
1. Deney	0,631	0,692	0,903	1,037	0,212
	0,659	0,679	0,88	1,045	0,225
	0,692	0,7	0,926	1,073	0,216
2. Deney	0,554	0,625	0,772	0,936	0,169
	0,523	0,606	0,805	0,93	0,173
	0,581	0,577	0,773	0,958	0,174
Ortalama absorbans değerleri	**0,607**	**0,647**	**0,843**	**0,997**	**0,195**

B
DPPH DENEYİ

Tablo B.1 DPPH deneyi troloks absorbans değerleri

	Troloks standartları (%96 etanol)							
	Kontrol	**1 µg/ml**	**2 µg/ml**	**4 µg/ml**	**8 µg/ml**	**10 µg/ml**	**12 µg/ml**	**15 µg/ml**
1. Deney	0,78	0,727	0,677	0,597	0,44	0,31	0,237	0,109
	0,775	0,719	0,675	0,59	0,407	0,358	0,257	0,116
	0,77	0,722	0,679	0,587	0,401	0,348	0,24	0,099
2. Deney	0,811	0,748	0,689	0,606	0,411	0,338	0,2	0,112
	0,81	0,748	0,7	0,605	0,401	0,325	0,21	0,111
	0,814	0,756	0,697	0,614	0,408	0,282	0,208	0,101
Ortalama absorbans değerleri	**0,793**	**0,737**	**0,686**	**0,600**	**0,411**	**0,327**	**0,225**	**0,108**

Tablo B.2 DPPH deneyi KOHSK ekstraktı absorbans değerleri

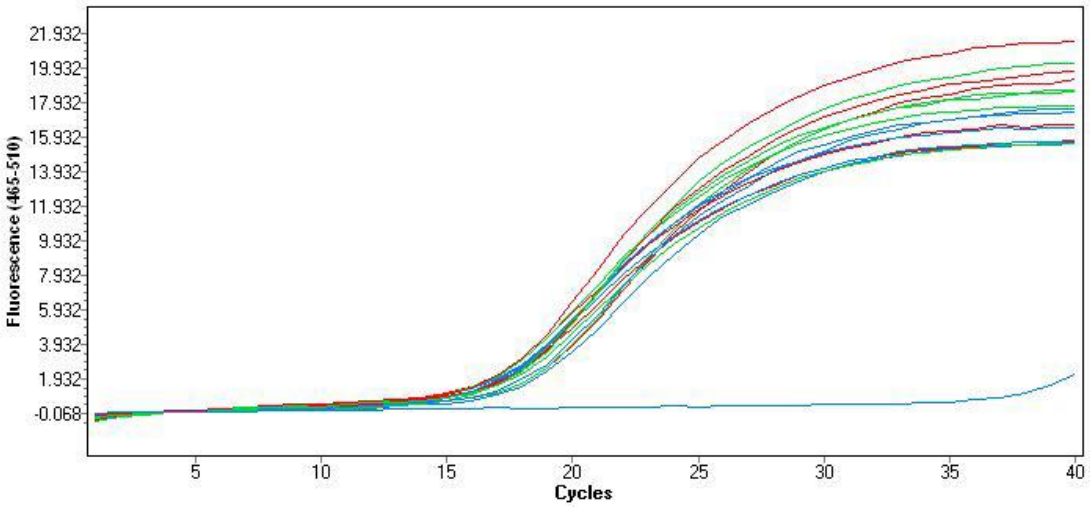
	KOHSK ekstraktı (%70 etanol)				
	Kontrol	**31,25 µg/ml**	**62,5 µg/ml**	**125 µg/ml**	**250 µg/ml**
1. Deney	0,777	0,65	0,466	0,178	0,206
	0,786	0,656	0,496	0,186	0,193
	0,764	0,622	0,464	0,185	0,192
2. Deney	0,803	0,645	0,491	0,237	0,195
	0,826	0,659	0,481	0,233	0,197
	0,782	0,626	0,483	0,238	0,195
Ortalama absorbans değerleri	**0,790**	**0,643**	**0,480**	**0,210**	**0,196**

C
MTT DENEYİ

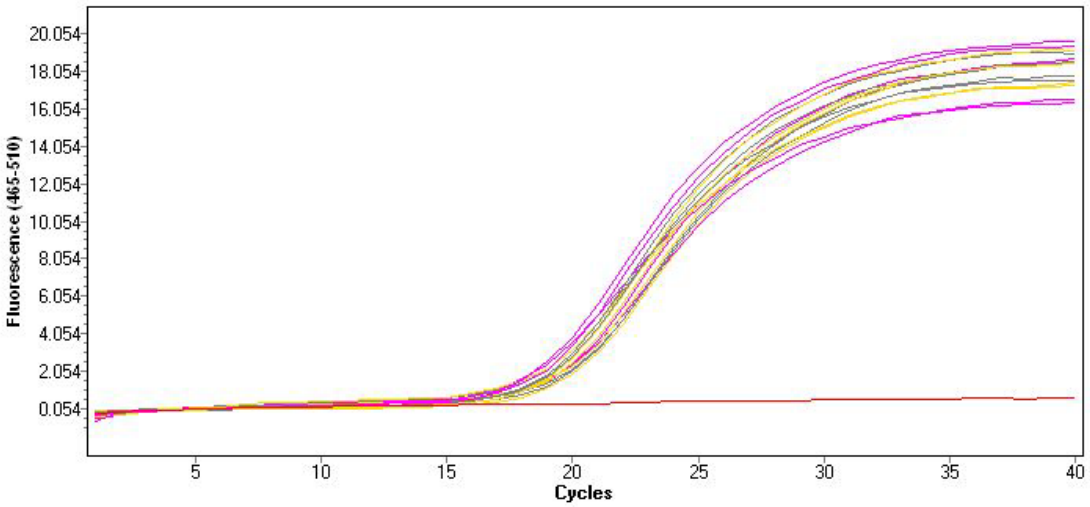
Tablo C.1 MTT deneyi KOHSK ekstraktı absorbans değerleri

	KOHSK ekstraktı (%70 etanol)					
	Kontrol	**Çözücü Kontrol**	**25 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**	**200 µg/ml**
1. Deney	0,307	0,328	0,326	0,34	0,337	0,357
	0,301	0,32	0,317	0,316	0,336	0,349
	0,311	0,318	0,333	0,343	0,327	0,33
	0,312	0,308	0,314	0,328	0,326	0,352
2. Deney	0,501	0,522	0,563	0,564	0,52	0,55
	0,521	0,525	0,539	0,531	0,514	0,543
	0,514	0,517	0,543	0,558	0,51	0,552
	0,517	0,515	0,524	0,525	0,514	0,55
Ortalama absorbans değerleri	**0,411**	**0,419**	**0,432**	**0,438**	**0,423**	**0,448**
% Canlılık	**97,9**	**100,0**	**103,2**	**104,5**	**100,9**	**106,9**

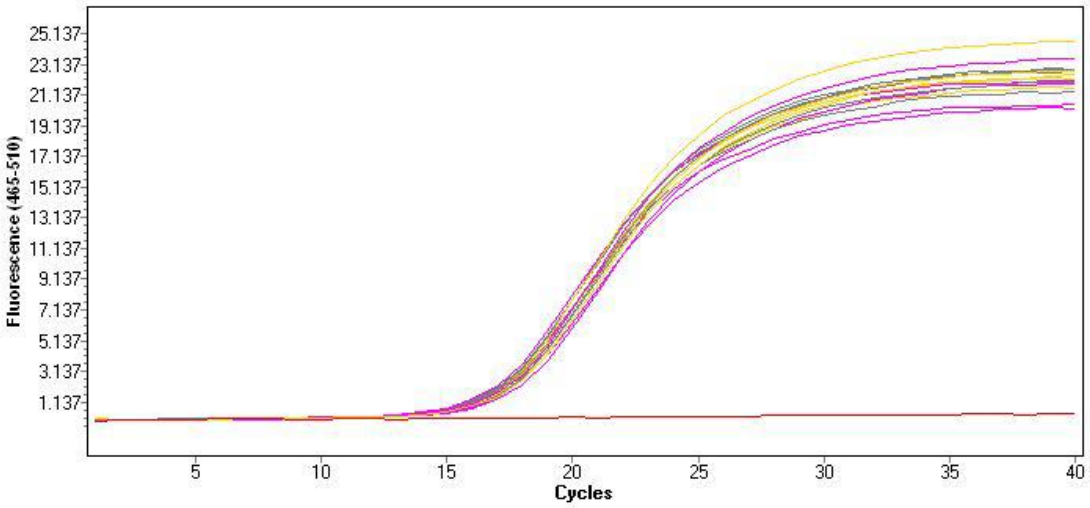
D
RT-qPCR CT DEĞERLERİ



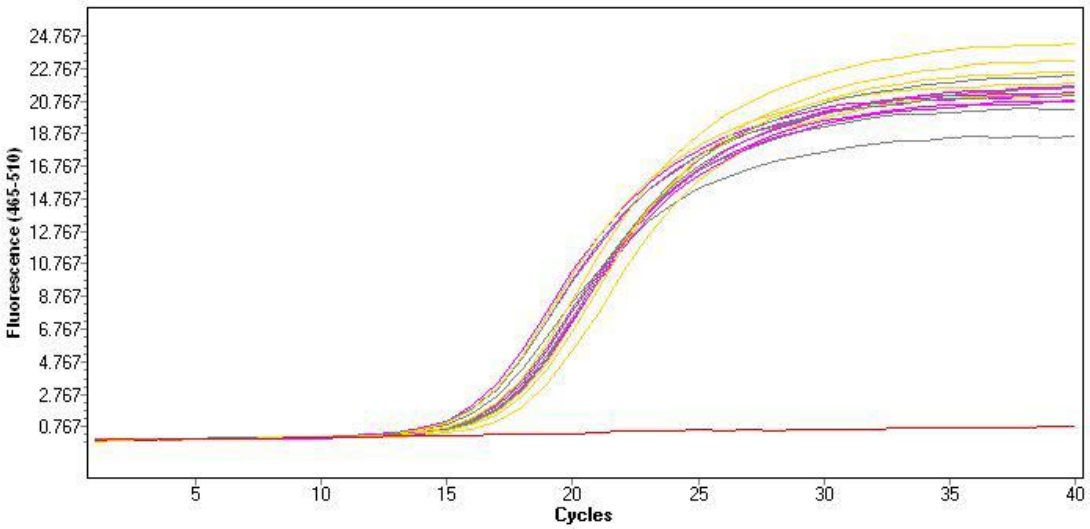
Şekil D.1 ActnB genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil D.2 COL1A1genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil D.3 ELN genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil D.4 HAS3 genine ait amplifikasyon eğrileri

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Ayşenur Çallı, Yıldız Bodurlar, Şenay Vural Korkut ‟*Symphytum officinale* L. Hücre Süspansiyon Kültürü Ekstraktının Toplam Fenolik Miktarının ve Antioksidan Özelliğinin Belirlenmesi'' 10. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Özet Kitabı, 18 Aralık 2021, Online. E-ISBN: 978-605-71081-8-0