Betülin Molekülünün Bazı Bakterilerle Biyotransformasyonu ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Ş. Gamze Kahraman Akkaya

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Eylül 2018

Biotransformation of Betulin with Some Bacteria and Investigation of Its Apoptotic Effects

Ş.Gamze Kahraman Akkaya

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

September 2018

Betülin Molekülünün Bazı Bakterilerle Biyotransformasyonu ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Ş.Gamze Kahraman Akkaya

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. İsmail KIRAN
İkinci Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

‘‘ Bu Tez TÜBİTAK tarafından 114Z380 kod nolu proje çerçevesinde desteklenmiştir.’’

Eylül 2018

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ş. Gamze Kahraman Akkaya'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Betülin Molekülünün Bazı Bakterilerle Biyotransformasyonu ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İsmail Kıran

İkinci Danışman : Doç. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. İsmail Kıran

Üye : Prof. Dr. Şükrü Beydemir

Üye : Doç. Dr. Müjgan Özkütük

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. İsmail KIRAN ve Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ danışmanlığında hazırlamış olduğum "Betülin Molekülünün Bazı Bakterilerle Biyotransformasyonu ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi." başlıklı YÜKSEK LİSANStezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.03/09/2018

Ş.Gamze Kahraman Akkaya

İmza

ÖZET

Son yıllarda ilaç bulma ve geliştirme çalışmalarında, biyolojik etkinliği bilinen bir molekülden yola çıkılarak kimyasal veya biyoteknolojik yöntemlerle türevlendirme ile daha yüksek biyolojik aktiviteye ve daha az yan etkiye sahip ilaçların elde edilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu çalışmada farklı biyolojik aktivite gösterdiği bilinen betülin molekülünün bakteriyel kültürler ile biyotransformasyontepkimeleri sonucu türevlerinin elde edilmesi, betülin ve elde edilmesi muhtemel türevlerin antimikrobiyal ve A549, HepG2 ile 5RP7 kanser hücrelerine karşı apoptotik etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Betülinin 7 farklı bakteri (*Staphylococcusaureus*ATCC 6538, *Proteusvulgaris*NRRL B-123, *Bacillussubtilis*NRRL B-4378, *Streptomycesgriseolus*NRRL B-1062,*Escherichia coli*ATCC 8739, *Staphylococcusaureus*ATCC 43300 ve *Bacillusvelezensis*NRRL B-14580) ile gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimelerinden saf metabolit üretilemedi. Antikanser aktivite çalışmalarında, betülin molekülünün A549, HepG2 ve 5RP7 hücre dizilerine karşı sırasıyla 207.7, 125.0 ve 28.3 µg/mL İK_{50} değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. SI değerleri ise sırasıyla 30, 50 ve 223 olarak belirlenmiştir. Bu durum betülinin aktivitesininA549 ve HepG2 hücrelerine karşı seçici olmadığı ve sağlıklı hücrelere karşı sitotoksisitesinin etkinliğini sınırlandırdığını, ancak 5RP7 (28.33±1.53 µg/mL) hücresine karşı seçici olarak sitotoksik etkinlik gösterdiğini söylemek mümkündür. Ayrıca bunun etkisinin apoptotik mekanizmaya dayandığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Betülin, biyotransformasyon, biyolojik aktivite,apoptotik etki, bakteri.

SUMMARY

In recent years, research Studies based on derivatisation of a biologically active molecules through chemical and Biotechnological methods to develop more active drug ingredients with less side effects have gained importance in finding and developing new drug canditate molecules studies.

In this study it was aimed at obtaining derivatives of betuline which is known to exhibit a variety of Biological properties through biotransformation Reactions with bacterial strains and investigating the antimicrobial activities and apoptotic effects against A549, HepG2 and 5RP7 cancer cell of betuline and its possible metabolites. Biotransformation reactions of betuline by 7 bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Proteus vulgaris* NRRL B-123, *Bacillus subtilis* NRRL B-4378, *Streptomyces griseolus* NRRL B-1062, *Escherichia coli*ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Bacillus velezensis* NRRL B-14580) produced no pure metabolite. In *in vitro* anticancer activity studies, betuline was found to exert anticancer activity against A549, HepG2 and 5RP7 cell lines with an IC50 value of 207.7, 125.0 and 28.3 µg/mLwhereas SI values were found to be 30, 50 and 223, respectively. This indicated that betuline activities against A549 and HepG2 cell lines were nonselective and limited its cyctotoxic activity against healthy cells but it is possible to say that it exerted selective activity against 5RP7 cell (28.33±1.53 µg/mL). In addition, it was shown that its effect is based on apoptotic mechanism.

Keywords: Betulin, biotransformation, biological activity, apoptotic effects, bacteria.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans çalışmalarım boyunca, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarımda bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan kıymetli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Sayın İsmail KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını ve imkanlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Sayın Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye,

Çalışmalarımda ve her konuda ilgi alaka ve yardımlarını esirgemeyen, bilgilerini paylaşmak ve öğretmekten asla çekinmeyen değerli hocam Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü Araş. Gör. Dr. Özge ÖZŞEN BATUR'a,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşım Ceren ELMACI'ya,

Hayatım boyunca beni maddi manevi her konuda destekleyen, bana güvenlerini her zaman hissettiren ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip canım aileme, bu çalışma sırasında kaybettiğim, benim bu yüksek lisansı yapmamda çok büyük emeği olan canım anneannem Şaziye DUYGUN'a,

Akademik hayatımda bana sonsuz destek veren hayat arkadaşım Serdar AKKAYA'ya,

Tez çalışmamı 114Z380 nolu proje kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ş.Gamze KAHRAMAN AKKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....vi

SUMMARY……...vii

TEŞEKKÜR…….....viii

İÇİNDEKİLER …….……....ix

ŞEKİLLER DİZİNİ……..xii

ÇİZELGELER DİZİNİ……xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……...xv

1. **GİRİŞ VE AMAÇ**……1

2. **LİTERATÜR ARAŞTIRMASI**……..2

2.1. Biyotransformasyon Tanımı……..2

2.2. Biyotransformasyon Teknikleri……2

2.2.1. Durağan hücreler ile biyotransformasyon……..3

2.2.2. İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon……..3

2.2.3. Sporlar ile biyotransformasyon……...4

2.2.4. Serbest ve immobilize hücreler ile biyotransformasyon……4

2.2.5. Büyüyen/ çoğalan hücreler ile biyotransformasyon……4

2.3. Triterpenler……4

2.3.1. Triterpenlerin biyosentezi……7

2.3.2. Triterpenlerin biyolojik aktiviteleri……10

2.4. . Betülin……12

Sayfa

2.4.1. Betülinin biyotransformasyon tepkimeleri…….13

2.4.2. Betülinin biyolojik aktiviteleri……....15

3. **MATERYAL VE YÖNTEM**…….…….17

3.1. Genel Deneysel Bilgiler ……17

3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar . ……...17

3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları..... 19

3.3.1. Mikroorganizmaların üretimi ve çoğaltılması..... 19

3.3.1.1. Mueller hinton agar besiyeri bileşenleri..... 19

3.3.1.2. Mueller hinton broth besiyeri bileşenleri..... 20

3.3.2. Biyotransformasyon tepkimesinin gerçekleştirilmesi..... 20

3.4. Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Analizi 21

3.5. Sitotoksisite Testleri 21

3.5.1. Hücrelere uygun besiyerinin hazırlanması..... 21

3.5.2. Hücrelerin çoğaltılması..... 22

3.5.3. Hücrelerin plakalara ekilmesi 22

3.5.4. Hücrelere XTT sitotoksisite testinin uygulanması 23

3.5.5. MTT ölçümü..... 24

3.6. DNA Sentez Analizi 24

3.7. Apoptotik Etki Deneyleri 25

3.7.1. Annexin V FITC: erken faz apoptozun belirlenmesi 25

3.7.2. Kaspaz-3 antikor apoptoz: erken faz apoptozun belirlenmesi..... 25

3.7.3. Hücrelerin JC-1 ile boyanması 26

3.7.4. Hücre siklusu ölçümü..... 26

Sayfa

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 28

4.1. Betülinin Biyotransformasyon Çalışmaları 28

4.2. Sitotoksisite Çalışmaları 29

4.3. Genotoksisite Çalışmaları 30

4.4. DNA Sentez Analizi Çalışmaları 33

4.5. Betülinin Apoptotik Etki Deneyleri 36

4.6. Betülinin Kaspaz 3 Aktivite Sonuçları 40

4.7. Membran Polarizasyon/ Depolarizasyonunun Belirlenmesi 43

4.8. Hücre Siklusu Analizi 44

5. **SONUÇ VE ÖNERİLER** 47

5.1. Sonuçlar 47

KAYNAKLAR DİZİNİ 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Biyotransformasyon teknikleri 3

2.2. Triterpenlerin sınıflandırılması 5

2.3. Triterpenlere örnek moleküller 6

2.4. İzopren birimi biyosentezi 8

2.5. Pentasiklik triterpen biyosentezi 9

2.6. Huş ağaçları resimleri 12

2.7. Betülin molekülünün yapısı 13

2.8a. Betülin biyotransformasyon türevleri. 14

2.8b. Betülin biyotransformasyon türevleri 15

3.1. Bakterilerin hazırlığı ve preinkübasyon aşaması 20

3.2. Substrat ilavesi, inkübasyon, filtrasyon ve ekstraksiyon aşamaları 21

4.1. Betüline ait 3. Gün (A), 5. Gün (B) ve 7. Gün (C) ön deneme sonuç ITK'ları 29

4.2. Betüline ait AMES MPF TA 98/100 testi sonuçları (---Zemin çizgisi * 2) 33

4.3.Betülin ve sisplatininA549 hücreleri üzerindeki DNA sentez Inhibisyon etkileri 35

4.4. Betülin ve sisplatinin HepG2 hücreleri üzerindeki DNA sentez inhibisyon etkileri 35

4.5. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerindeki DNA sentez inhibisyon etkileri 36

4.6. Betülin ve sisplatinin değişik derişimlerinde A549 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: geç apoptotik hücreler, Q3:Canlı hücreler, Q4:Erken apoptotik hücreler 39

4.7. Betülin ve sisplatinin değişik derişimlerinde HepG2 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: geç apoptotik hücreler, Q3:Canlı hücreler, Q4: Erken apoptotik hücreler 39

4.8. Betülin ve sisplatinin İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ derişimlerinde 5RP7 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: Geç apoptotik hücreler Q3:Canlı hücreler, Q4: Erken apoptotik hücreler 39

4.9. Betülin ve sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki (500, 125, 207.7 ve 21.5 µg/mL) aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizİ. Q3: Kaspaz 3 pozitif hücreler, Q4: Kaspaz 3 negatif hücreler 42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.10. Betülin ve sisplatinin HepG2 hücreleri üzerindeki (409.2, 500, 125 ve 38.4 µg/mL) Aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizi. Q3: Kaspaz 3 pozitif hücreler, Q4: Kaspaz 3 negatif hücreler……..42

4.11. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerinde aktif Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizi. P4: Kaspaz 3 negatif hücreler, P5: Kaspaz 3 pozitif hücreler……42

4.12. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerindeki (µg/mL) mitokondriyal Membran polarize/depolarize etkilerinin akım sitometri kuadran analizi. P1: mitokondriyal membran polarize hücreler, P2: mitokondriyal membran depolarize hücreler……..44

4.13. 5RP7 hücreleri betülin ve sisplatinin İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ dozları ile 24 saat bekletildikten sonra hücre siklusu dağılımı analizi. Her örnek için 10.000 hücre analiz edilmiştir. Mavi renk debris, yeşil renk agregatları ve kırmızı renk G1 ve G2 fazlarındaki Hücre yüzdelerini gösterir……..45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Triterpenlerin biyolojik aktivitesi.....11

2.2. Betülinin biyolojik etkileri…….....16

3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler……....18

3.2. Kullanılan bakteriler……18

4.1. Bileşiklere ait İK50 ve SI değerleri ……..30

4.2. Bileşiklerin Ames MPF genotoksisite testi sonuçları……..32

4.3. Betülin ve sisplatin uygulanan A549 ve HepG2 hücreleri Anneksin V-FITC/propidyum iyodür akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri……...37

4.4. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücreleri Anneksin V-FITC/propidyum iyodür akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri……...38

4.5. Betülin ve sisplatin (A549 hücreleri için 500, 125, 207.7 ve 21.5 µg/mL ve HepG2 hücreleri için 409.2, 500, 125 ve 38.4 µg/mL) uygulanan A549 ve HepG2 hücrelerinin aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri…..40

4.6. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücrelerinin aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri……...41

4.7. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücrelerinin aktif JC-1 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri……43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
^{o}C	Santigrad derece
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
A549	İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi
CO_2	Karbon dioksit
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standart Enstitüsü
DMEM	Dulbecco'nun minimum temel besi ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EtOH	Etil alkol
EMEM	Eagle'ın minimum esansiyel besi ortamı
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
HepG2	İnsan hepatoselüler karaciğer karsinoma hücre dizisi
$İK_{50}$	İnhibitör derişim 50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
İTK	İnce tabaka kromatografisi
MeOH	Metil alkol
MHA	Mueller hinton agar (katı) besi ortamı
MHB	Mueller hinton broth (sıvı) besi ortamı
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu 3-[4,5-
MTT	Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid
NA	Nutrient agar (katı) besi ortamı
$NaBH_4$	Sodyum borhidrür
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
SI	Selektivite indeksi
THF	Tetrahidrofuran
XTT	2,3-Bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolum-5-karboksianilit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni ilaçların keşfi, ölümcül hastalıklarla mücadelede ve yaşam süresinin daha kaliteli bir hayata dönüştürülebilmesi, günümüzde küresel ekonomide ilaç ekonomisini en yüksek araştırma-geliştirme potansiyeline sahip endüstrisi haline getirmiştir. Bu yüzden yeni ilaç moleküllerin tespiti ve geliştirilmesine yönelik bilimsel çalışmaların sayısı hızla artmıştır. Günümüzde ticari olarak üretilen ve kullanılan ilaç adaylarının saptanmasına yönelik çalışmalar, üç şekilde sunulmaktadır. Bunlar; deniz organizmaları, kara hayvanları, kara bitkileri ve mikroorganizmaların metabolitlerinin oluşturduğu doğal kaynaklı bileşikleri temel alan çalışmalar, reseptör veya enzim-substrat teorisine dayalı "kombinatoryal kimya" teknolojisi ile üretilen ve sayıları milyonları denk gelen sentetik kimyasal maddeleri temel alan çalışmalar ile rekombinant teknolojisi ile üretilen biyoteknolojik ilaçlardır. Bu yaklaşımlardan ilaç aday molekülü tespiti ve geliştirilmesinde en yaygın olarak kullanılanı, Reseptör veya Enzim-substrat teorisine dayalı "kombinatoryal kimya" teknolojisidir. Ayrıca son yıllarda biyolojik etkinliği bilinen bir molekülden yola çıkarak türevlendirme işlemi ile daha yüksek biyolojik aktivite ve daha az yan etkiye sahip ilaçların elde edilmesine yönelik çalışmalar da önem kazanmıştır. İlaç geliştirme uzun yıllar gerektiren pahalı bir süreçtir. Yapılan çalışmalar yaklaşık 10,000 tane ilaç molekülünden yalnızca 10 tanesinin klinik aşamada test için kullanılabilir hale gelebildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada farklı biyolojik aktivite gösterdiği bilinen betülin molekülünün bakteriyel kültürler ile biyotransformasyon tepkimeleri sonucu türevlerinin elde edilmesi, betülin ve elde edilmesi muhtemel türevlerin A549, HepG2 ile 5RP7 kanser hücrelerine karşı apoptotik etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

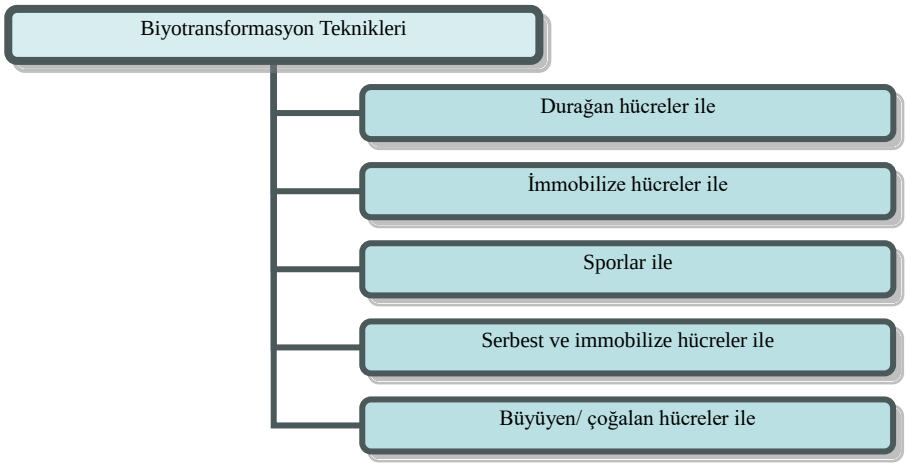
2.1. Biyotransformasyon Tanımı

Biyotranformasyon, canlı sistem enzimlerinden ya da bu sistemlerden elde edilen izole enzimlerin (biyolojik katalizörleri) kullanımıyla bir maddeden başka bir maddeye biyolojik yollardan doğal dönüşümü olarak tanımlanır (Hanson, 1995; Telefoncu ve Kaşıkara, 2010). İlk deneysel ve bilimsel anlamlı biyotransformasyonlardan biri Pasteur tarafından 1858'de gerçekleştirilen *Penicillium glaucum* kullanılarak *D*-enantiyomerin seçici parçalanmasıyla, *D*-*L*-ammonium tartarat'tan *L*-ammonyum tartarat elde edilişidir (Telefoncu, 1995).

Her geçen gün biyotransformasyon tepkimelerinin maddelerin üretiminde kullanılması artmaktadır. Başlıca kullanıldığı alanlar; antibiyotik üretimi, ilaç etken maddeleri, gıda katkı maddeleri ve esans maddeleri üretimi gibi alanlardır. Atık suların temizlenmesi ve geri kazanımı gibi çevre sorunlarının çözümünde de kullanılan bir tekniktir. Biyotransformasyon tekniği, enzimler tarafından gerçekleştirilen bir ya da birden fazla tepkimeleri içerir (Faber, 2004).

2.2. Biyotransformasyon Teknikleri

Biyotransformasyon tepkimeleri toplamda beş farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Bunlar (Şekil 2.1);



Şekil 2.1. Biyotransformasyon teknikleri

2.2.1. Durağan hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizma ideal besi ortamında üretilir, santrifüj ve filtrasyon gibi çeşitli fiziksel yöntemlerle ayrılır. Ayrılma işleminden sonra biyotransformasyon için kullanılan besi ortamında dağıtılıp substrat ilavesi gerçekleştirilir. Hücre canlılığını koruyabilmesi için bir miktar glukoz eklenir. Bu yöntemin en büyük üstünlüğü biyotransformasyon süresince ortamdaki hücre sayısının sabit kalması ve ürün izolasyonunun kolaylığıdır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2.2.İmmobilize hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar, substratın ve ürünün geçişine izin sağlayacak şekilde bir polimer matrikste immobilize hale getirilerek gerçekleştirilir. Bu polimer matrikslere, nişasta, kappa-karragenan ve poliakrilamid örnek verilebilir. İmmobilize hücreler sürekli ortamdan uzaklaştırılıp tekrar kullanılabilir. Bu kullanım yöntemin daha avantajlı olmasını sağlar (Rajaguru vd., 2000; Armstrong ve Yamazaki, 1986).

2.2.3. Sporlar ile biyotransformasyon

Mikroorganizmalar spor oluşumu için uygun koşullarda üretilir, sporlar misellerden ayrılarak soğuk ortamda saklanır. Biyotransformasyon yapılacağı dönemde bu sporlardan faydalanılır. Sporların depolanma kolaylığı ve tekrar kullanılabiliyor olması bu tekniğin avantajıdır (Rajaguru vd., 2000; Kıvanç ve Kaplan, 2001)

2.2.4.Serbest ve immobilize enzimler ile biyotransformasyon

İmmobilize hücrelerin biyotransformasyonda kullanılması çok daha ekonomiktir. Fakat buna rağmen, çok basit yapıda ki bir hücrede binlerce enzim bulunduğundan ötürü oluşması istenmeyen yan reaksiyonlara ve ürünlere sebep olabilir. Bundan dolayı bu yöntemin kullanımı tercih edilmez. Bu yöntem yerine pahalı olsa da tek tip enzim türü içeren serbest enzim sistemleri kullanılarak bu sorun çözülmektedir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

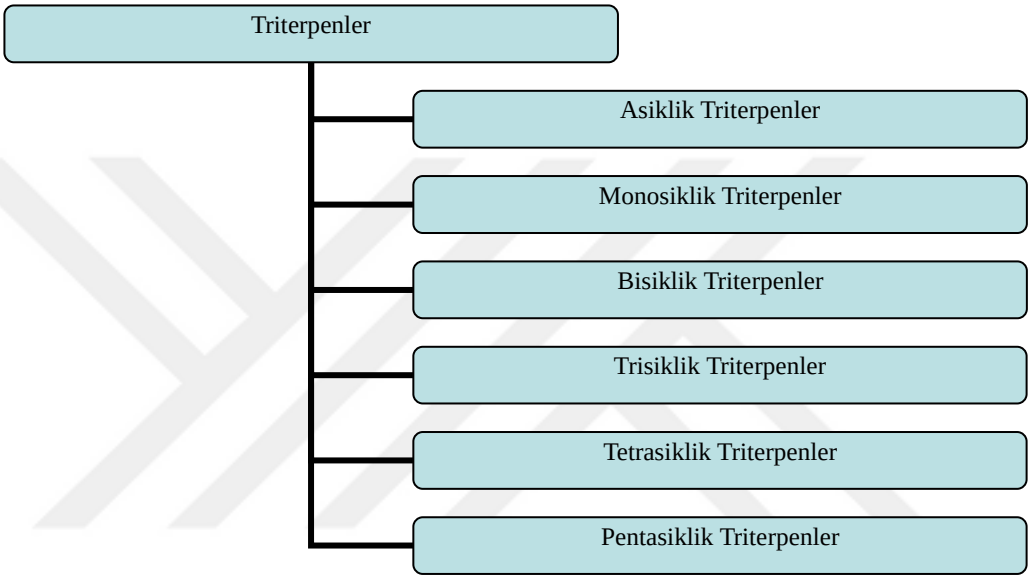
2.2.5. Büyüyen/ çoğalan hücreler ile biyotransformasyon

Mikroorganizma ideal besiyerinde çalkamalı sistemde üretilir ve üretilen hücreler üzerine belirlenen derişimlerde biyotransformasyona uğratılacak substrat eklenir. Bu yöntemin avantajı hem basit olması hem de yüksek verim elde edilebilirliğidir (Roberts, vd., 1992).

2.3. Triterpenler

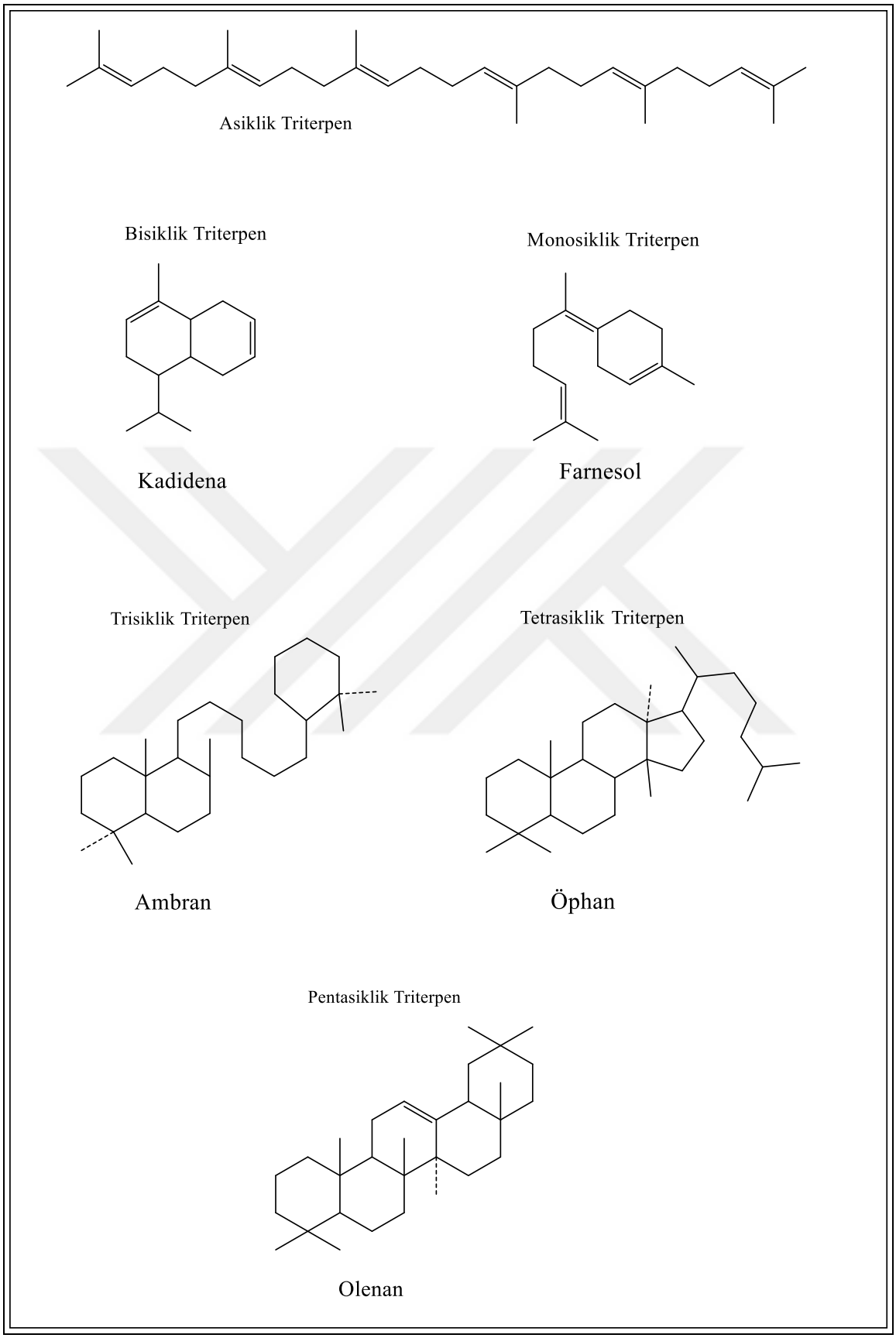
Triterpenler altı izopren biriminden oluşan 30 C'lu iskelete sahip yapılardan oluşmaktadır. Monoterpen ve seskiterpenlere göre daha karışık bir siklik yapıya sahiptirler. Yüksek erime noktalı ve kristal yapıdadırlar, bazı hayvanlar ve bitkilerden elde edilebilirler. Bitkilerden elde edilen triterpenler apolar çözücülerle yapılmış ekstrelerde ve

yağlarda bulunur. Bunlardan bazıları olan α-amirin, β-amirin, ursolik asit ve oleanolik asit yaygın bir şekilde bitki yapraklarında ve meyve üzerindeki mumsu tabakada bulunurlar. Mumsu tabakada bulunan triterpenlerin mikrobiyal saldırılara karşı koruyucu ve böcekleri uzaklaştırıcı fonksiyonları olduğu düşünülmektedir (Cseke, 2006). Triterpenlerin bir kısmı doğada da bulunurlar. Çok sayıda farklı iskelete sahip olan triterpenler sahip oldukları halka sayısına göre sınıflandırılabilir. Bunlar (Şekil 2.2);



Şekil 2.2. Triterpenlerin sınıflandırılması

Yukarıda belirtilen gruplar içinde ayırımlar, halkaların içerdikleri üye sayısına göre yapılabilir. Bu tür bir sınıflandırmada tetrasiklik ve pentasiklik triterpenlerin gruplandırılması önemlidir. Çünkü doğadan elde edilen birçok triterpen bu grupların üyesidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Triterpenlere örnek moleküller

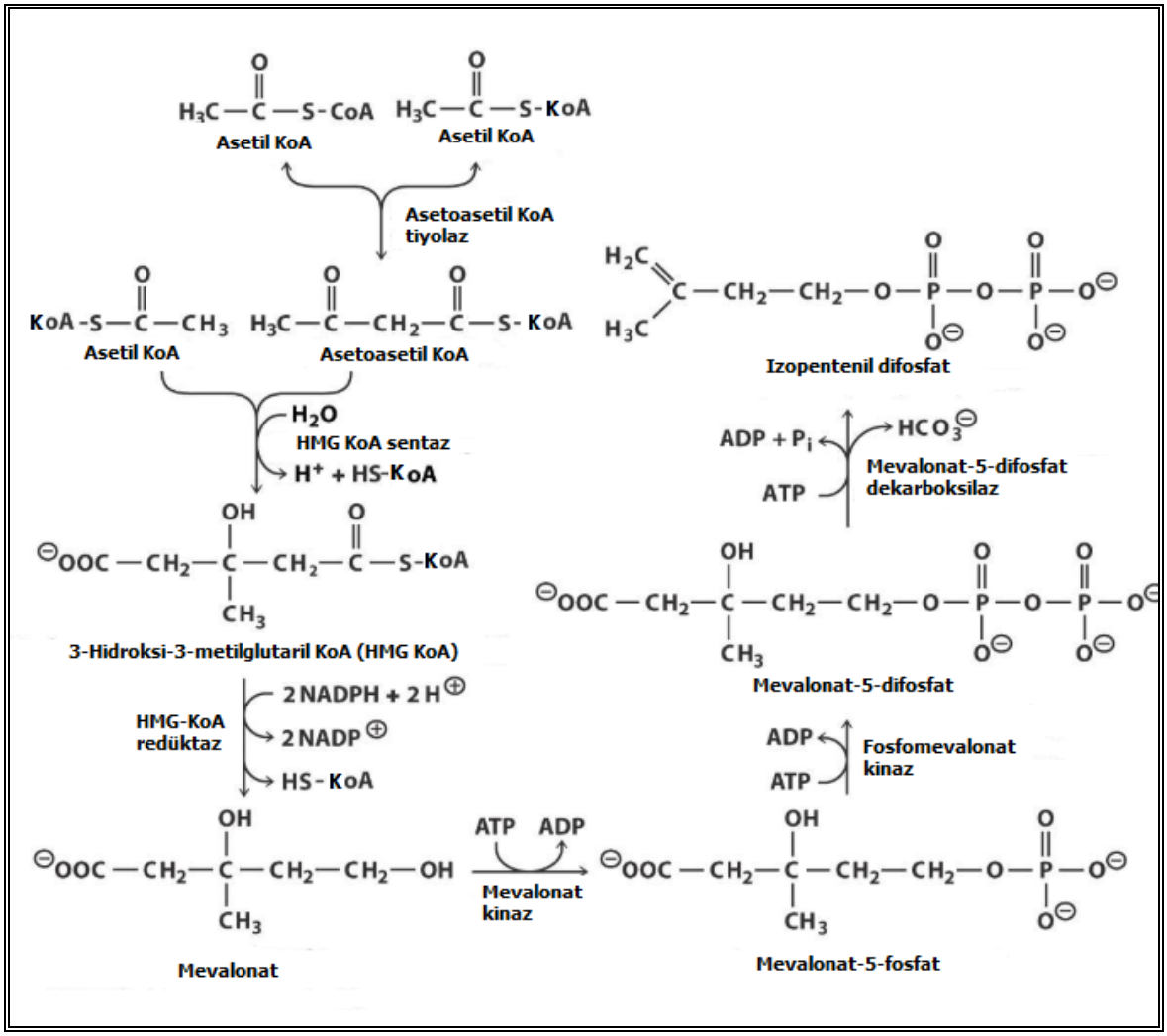
2.3.1. Triterpenlerin Biyosentezi

Terpenoid bileşikler izopren gruplarının birbirleriyle birleşmesinden oluşurlar. Terpenoidlerin izopren gruplarından oluştuğunu ilk fark eden kişi Otto Wallach'dır ve "İzopren Kuralını" ileri sürmüştür. Bu kuralı biraz daha geliştiren Leopold Ruzicka "İzopren Biyo-oluşum Kuralı" hipotezini oluşturmuştur (Teisseire, 1994). Ruzicka'nın kuralı terpenoidlerin oluşumunun izopren grupları tarafından oluşturulan öncü gruplar üzerinden yürüdüğünü anlatmaktadır.

Terpenlerin biyosentezi mevalonik asit yolu ile başlar. Bu biyosentezin basamakları tüm bitki, hayvan ve bakterilerde aynı şekilde olmaktadır. Öncelikle yağların oksidasyonundan ya da iki asetilkoenzim-A molekülünün tiyolaz enziminin katalizörlüğünde kondenzasyonundan asetilkoenzim-A oluşur. Başka bir asetilkoenzim-A molekülü ile aldol tipi bir kondenzasyon ve enzim ile hidrolitik parçalanma sonucu, (S)-3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA oluşur (Akay, 2002).

Bu molekülün tiyoester grubunun NADPH ile indirgenmesi ve spesifik redüktaz enziminin katalizörlüğünde *(R)*-mevalonik asit oluşur. İndirgenme basamağı tek yönlü, geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. *(R)*-Mevalonik asit, ATP ile fosforilasyon ve dekarboksilasyonla izopentanilpirofosfat'a (3-metilbut-3-enilpirofosfat) dönüştürülür. (Akay, 2002).

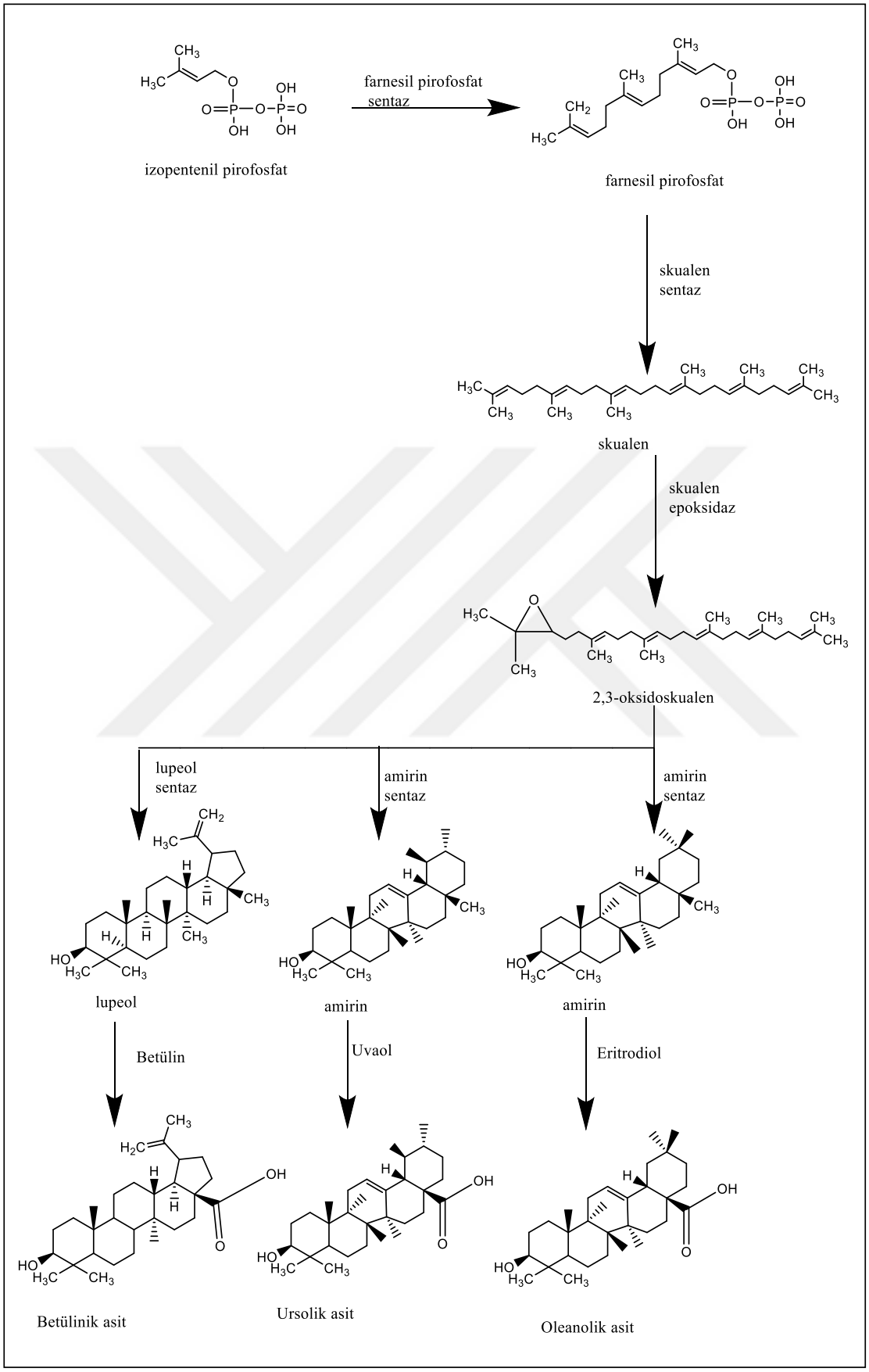
Bu basamakta izomerizasyon dimetilallilpirofosfat'ı verir. Bundan sonra bir çeşit kondenzasyon-polimerleşme ile izopentenilpirofosfat terpenlere dönüştürülür. Bu bileşikteki reaktif alillik pirofosfat grubunun çift bağla nükleofilik yer değiştirme ve proton kaybıyla trans-geranilpirofosfat ve bunun hidrolizinden de monoterpenler meydana gelir seskiterpenlerin oluşumu farnesol üzerinden, diterpenlerin oluşumu geranilgeraniol üzerinden ve triterpenlerin oluşumu skualen üzerinden gerçekleşmektedir (Nelson, 2005). İzopren biriminin biyosentezi Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. İzopren birimi biyosentezi (Mann,1994)

Triterpenlerin biyosentezi, skualen molekülünün katyonik saldırıya uğramasıyla başlar ve farklı yollara sahip siklizasyonlar ile devam eder. Siklizasyonları gerçekleştiren enzimler triterpen sentazlardır. Triterpen biyosentezi temelinde skualen bulunsa da, skualen türevleri de triterpen oluşumunda kullanılır. Bu türevlere; 2,3-oksidoskualen, trans-skualen, bis-oksidoskualen molekülleri örnek olarak gösterilebilir. Skualen molekülü 6 izopren biriminin birleşmesi ile oluşan 6 çift bağa sahip 30 karbonlu moleküldür. Çok sayıda çift bağa ve karbon sayısına sahip olması türevlenme olasılığını arttırır.

Bundan kaynaklı olarak triterpen moleküllerinin sayısı fazladır. Bu çalışmada kullanılan Betulin molekülü pentasiklik triterpen yapısında bulunmaktadır. Şekil 2.5 ’de pentasiklik triterpenlerin biyosentezi verilmiştir.



Şekil 2.5. Pentasiklik triterpen biyosentezi

2.3.2. Triterpenlerin biyolojik aktiviteleri

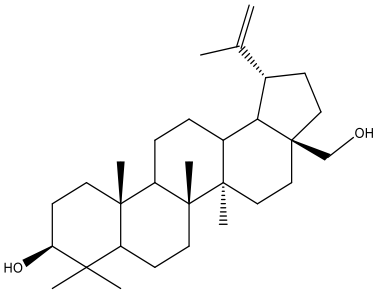
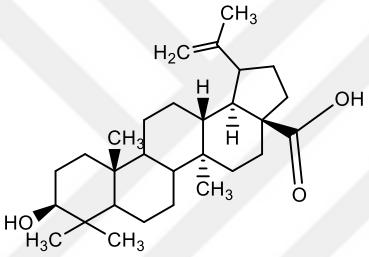
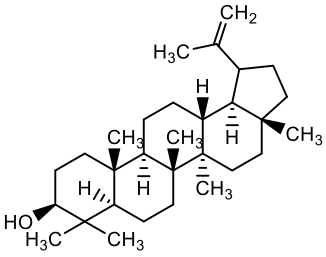
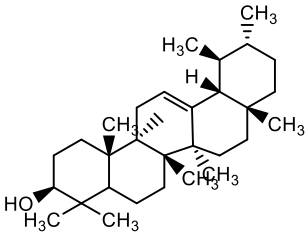
Bitki ve hayvanlardan izole edilen triterpenler önemli biyolojik ve farmakolojik aktivite gösterdiklerinden, son dönemlerde bilimsel araştırmalara konu olmuşlardır. Bu çalışmalarda kimyasal ve/veya biyoteknolojik yollarla türevlendirme ile yeni moleküllerin elde edilmesi, elde edilen bu türevlerin başlangıç maddelerine oranla biyolojik aktivitesinin artırılması hedeflenmektedir. Triterpenler ile gerçekleştirilen bazı biyolojik aktivite çalışmaları şunlardır;

- Antimikrobiyal aktivite
- Antiviral aktivite
- Antikanser aktivite
- Antibakteriyel aktivite
- Sitotoksisite

Bu çalışmalar sonucunda yapıları değiştirilen triterpenlerden bazıları önemli biyolojik aktivite göstermişlerdir.

Birçok triterpen serbest bazıları ise özel birleşik formlardan oluşur. Pentasiklik triterpenler çok yaygındır ve bulunması çok kolaydır. Bu triterpenler geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir ve ilaçlarda etkilerinin iyi olduğu araştırmalarda görülmüştür. Pentasiklik triterpenlerde betülin doğada en yaygın bulunan bileşiktir ve betülinik asit biyosentezinin öncüsüdür. Betülinik asit geleceği olan bir bileşiktir ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek etki gösterdiği bilinmektedir. Pentasiklik triterpen yapısına sahip diğer önemli bileşikte lupan'dır. Lupan bileşiğinin anti-inflamatuar, antikanser etkisi üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır ve yapılan deneylerde anti-inflamatuar etki gösterdiği ortaya konmuştur (Szakiel vd., 1995) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Triterpenlerin biyolojik aktivitesi

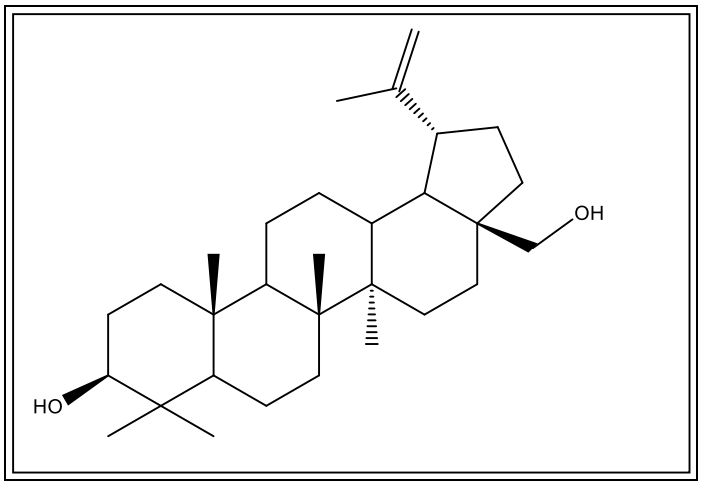
Triterpen		Biyolojik Aktivite	Kaynakça
Betülin		❖ Antimikrobiyal aktivite ❖ Antiviral aktivite ❖ Antikanser aktivite ❖ Sitotoksik etki ❖ Antifungal aktivite	-Cota vd.,2003 -Pavlova vd., 2003 -Thi Mai vd.,2011 -Po-wei vd., 2012
Betülinik asit		❖ Antitümör aktivite ❖ Antiviral aktivite ❖ Antibakteriyel aktivite ❖ Antiinflamatuar aktivite	-Jiří Patočka, 2003 -Safayhi vd., 1997
Lupeol		❖ Antiinflamatuar aktivite	-Jiří Patočka, 2003
Amirin		❖ Antimikrobiyal aktivite ❖ Antifungal aktivite ❖ Antiinflamatuar aktivite	-Vazquez vd.,2012

2.4. Betülin

Betülin, organik yapıya sahip pentasiklik bir triterpendir. Doğal bir ürün olup, huş ağaçlarının kabuğundan izole edilir (Miura vd., 1999; Liu vd., 2011; Grishko vd., 2014). (Şekil 2.6).

Şekil 2.6. Huş ağaçları resimleri

Geniş kimyasal çeşitlilik gösterir ve biyolojik özelliğe sahiptir. Uzun zaman hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan birçok bilimsel çalışmada bazı kanser türlerine karşı sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuş ve etki mekanizması çalışılmıştır. Dolayısıyla betülin molekülü antikanser ilaçların bulunması çalışmalarına konu olmuş olup, çıkış molekülü olarak kullanılarak yeni kanser ilaçların keşfedilmesinde kullanılmaktadır (Miura vd., 1999; Liu vd., 2011; Grishko vd., 2014). Şekil 2.7'de betülinin molekül yapısı verilmiştir.

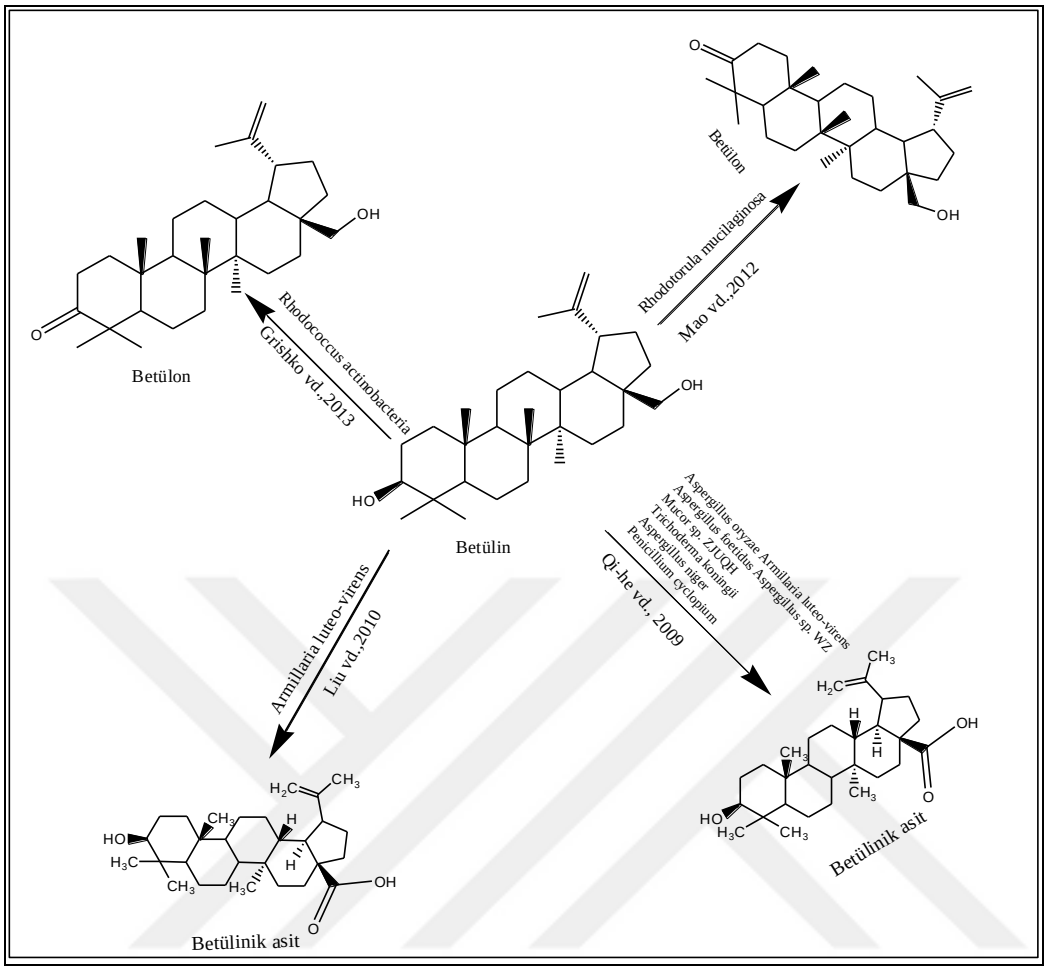


Şekil 2.7. Betülin molekülünün yapısı

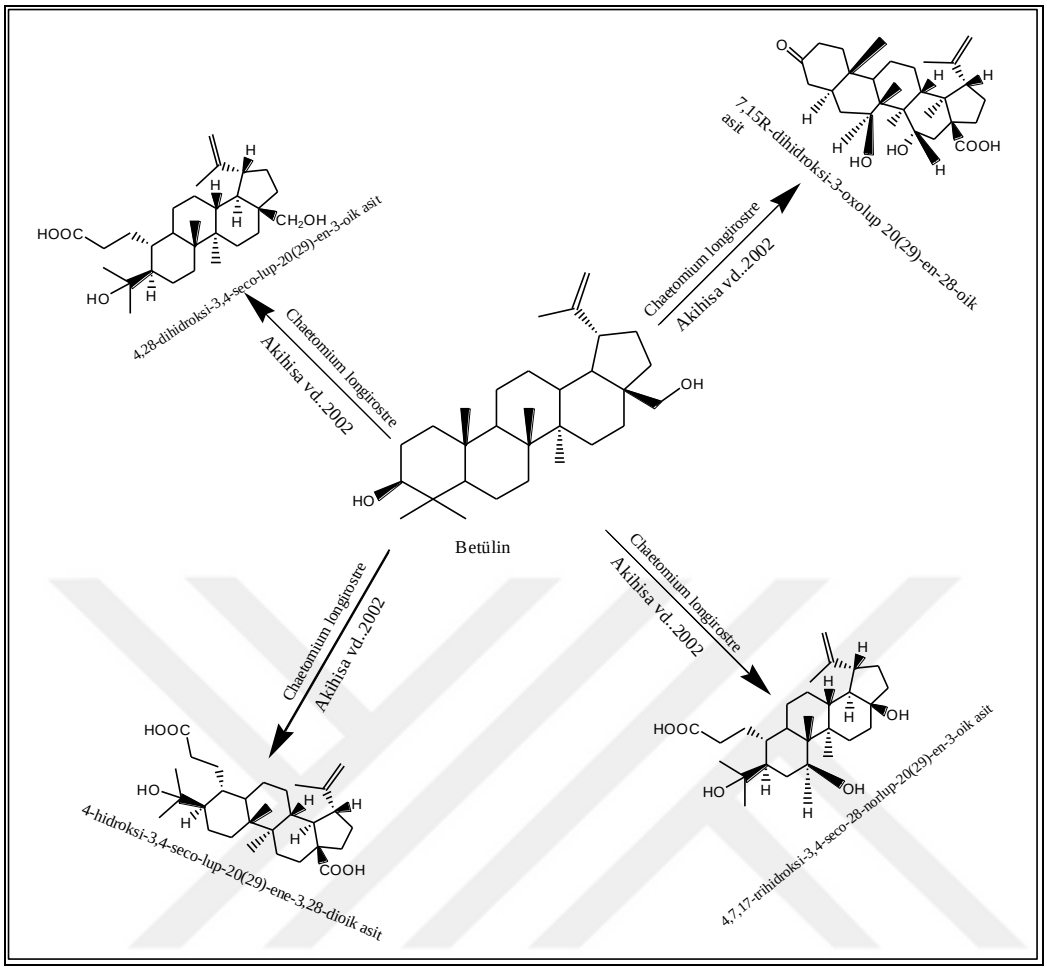
2.4.1. Betülinin biyotransformasyon tepkimeleri

Betülin molekülü ile gerçekleştirilen literatür çalışmaları Şekil 2.8'da gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde betülin molekülünün mantar, izole enzim ve bakteriler kullanılarak gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri sonucunda genellikle betülon ve betülinik asit türevlerine dönüştüğü görülmektedir.

Ayrıca betülin ile yapılan ve olumlu sonuç alınamayan biyotransformasyon tepkimeleri de bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde betülin molekülü 28 farklı fungal kültür ile biyotransformasyona tabi tutulmuş, biyotransformasyon sonucu elde edilen ekstraktlarda çok sayıda bileşik içeren karışımlar elde edilmiştir. Fakat kolon kromatografisi ve MPLC (orta basınçlı sıvı kromatografisi) teknikleri ile gerçekleştirilen saflaştırma çalışmaları sonucunda herhangi bir saf metabolit elde edilemediği belirtilmiştir (Özşen, 2018).



Şekil 2.8a. Betülin biyotransformasyon türevleri



Şekil 2.8b. Betülin biyotransformasyon türevleri

2.4.2. Betülinin biyolojik aktiviteleri

Pentasiklik triterpen yapısına sahip bir molekül olan betülinin pek çok kanser türüne karşı etki gösterdiği görülmüştür. Betülin molekülünün; antikanser, anti-HIV, antiviral, antiproliferatif ve apoptotik özellikleri gibi pek çok aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Alakurtti vd., 2006; Mai vd., 2011; Sultana ve Saify, 2013; Rastogi vd., 2015; Ali-Seyed vd., 2016). Betulin molekülü ile gerçekleştirilen mevcut biyolojik aktivite çalışmaları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Betülinin biyolojik etkileri

Yazar	Etki Türü	Substrat	Etki Ettiği Mikroorganizma ve Hücreler
Cota vd.,2003	Antimikrobiyal aktivite	Betulin	*Fusarium oxysporum*
Pavlova vd.,2003	Antiviral aktivite	Betulin	Herpes simplex tip1 İnfluenzaFPV/Rostock ECHO6 virüsleri
Laszczyk vd.,2006	Antikanser aktivite	Betulin	HepG2 hücrelerine ve Cilt kanserine karşı
Zhao vd.,2012	Antibakteriyal [Gram(+)]	Betulin	*B. subtilis* *S. aureus*
Sultana ve Saeed Saify, 2013	Antiviral aktivite Anti-inflamatuar aktivite Antitumor aktivite	Betulin	Human immunodeficiency virus Herpes simplex virus Epstein Barr virus Human melanoma Ve Human melignancies
Fotso vd.,2014	Antimikrobiyal etki	Betulin	*Candida albicans*
Corréa vd.,2014	Anti-enflamatuar etki Antimikrobiyal etki	Betulin	*Escherichia coli* *Candida albicans*
Yim vd., 2015	Apoptotoik Etki	Betulin	RCC4-çoklu ilaca dirençli insan renal karsinom hücreleri
Li vd., 2010	Antimikobakteriyal	Betulin	*M. tuberculosis* (H37Ra)
Álvarez vd., 2015	Sitotoksite Antiviral aktivite	Betulin	CC_{50} hücreleri Herpes Simplex (HSV1, HSV2)
Hajati vd., 2016	Antioksidan aktivite	Betulin Betulinik A.	*B. pendula* hücre süspansiyon kültürleri
Yoshida vd., 2016	Mutajenik etki (Ames Testi)	Betulin	*Salmonella typhimurium* kültürleri (TA98, TA100, TA102, and TA97a)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Genel Deneysel Bilgiler

Biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan besiyeri ve cam malzemelerin sterilizasyonu Systec VE 65 marka otoklav ile gerçekleştirildi. Küflerin aktive edilmesi ve biyotransformasyon çalışmalarında kullanılan derin kültür tekniği için Gerhardt THO 500 Laboshake çalkalamalı inkübatör kullanıldı. Mikrooganizmaların aktarılma ve steril koşullarda ekim işlemleri Herasafe steril kabininde gerçekleştirildi. Elde edilen ekstraktları buharlaştırıp çözücü fazından ayırma işlemleri ise Rotary Evaporatör Heidolph Hei-VAP Precision cihazı ile sağlandı. Kolon kromatografisi için Büchi Sepacore X10 MPLC Flash kromatografi sistemi kullanıldı. Saflaştırma esnasında gerçekleştirilen ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmaları içinse 0,25 mm kalınlığında silika jel plakaları (Merck silika jel GF254) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak etil asetat- hekzan (1:1) karışımı tercih edildi. Ön denemeden elde edilen spotlar, bileşenleri anisaldehit (0,5 mL), sülfürik asit (8 mL), metil alkol (85 mL), asetik asit (10 mL) olan reaktif ile renklendirdikten sonra ısıtılarak (110°C) belirgin hale getirildi.

3.2. Materyaller, Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar

Biyotransformasyon deneyleri esnasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler ise Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

• *n*-Hekzan	• Anisaldehit
• Aseton	• Potato dekstroz agar
• Susuz Sodyum Sülfat (Na_2SO_4)	• Piridin
• Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	• Glikoz
• Sülfürik asit (H_2SO_4)	• Pepton
• Yeast Ekstrakt	• Asetik asit
• Metanol (MeOH)	• Hidroklorik asit (HCl)
• Sodyum klorür (NaCl)	• Malt ekstrakt agar
• Etil asetat (EtOAc)	• *Asetik anhidrit*
• Agar agar	• Sodyum Hidroksit (NaOH)
• Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	• Etanol (EtOH)

Mikrobiyal biyotransformasyon ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarından sağlandı. Alınan kültürler +4°C'de muhafaza edildi. Çizelge 3.2.'te tez çalışmasında kullanılan 7 farklı bakterinin adları verilmişti

Çizelge 3.2. Kullanılan bakteriler

Staphylococcus aureus ATCC 6538
Proteus vulgaris NRRL B-123
Bacillus subtilis NRRL B-4378
Streptomyces griseolus NRRL B-1062
Escherichia coli ATCC 8739
Staphylococcus aureus ATCC 43300
Bacillus velezensis NRRL B-14580

3.3. Biyotransformasyon Çalışmaları

3.3.1. Mikroorganizmaların üretimi ve çoğaltılması

Kültür koleksiyonlarından alınan bakteriler Mueller hinton agar (MHA) (Sigma M-9552) besiyerinde üretildi. Daha sonra hazırlanan bakteriler Mueller hinton broth (MHB) (Merck 1.10293) sıvı besiyerlerine aktarılarak çoğaltıldı.

Seçilen bakteri kültürleri -83°C dereceden çıkartılarak, 34 gr/L distile suda çözülüp 121°C derecede 10 dk otoklavlanarak steril edilen ve oda sıcaklığına soğutularak hazırlanan MHA (Mueller Hinton Agar) yüzeyine bir öze ucu ile aktarılarak çizgi ekimi yapıldı ve 20-24 saat 37°C'de büyümeleri sağlandı.

3.3.1.1. Mueller hinton agar besiyeri bileşenleri

Et ekstraktı	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	12,0 g

Seçilen bakteri kültürleri -83°C dereceden çıkartılarak, 34 gr/L distile suda çözülüp 121°C derecede 10 dk otoklavlanarak steril edilen ve oda sıcaklığına soğutularak hazırlanan MHA (Mueller Hinton Agar) yüzeyine bir öze ucu ile aktarılarak çizgi ekimi yapıldı ve 20-24 saat 37°C'de büyümeleri sağlandı.

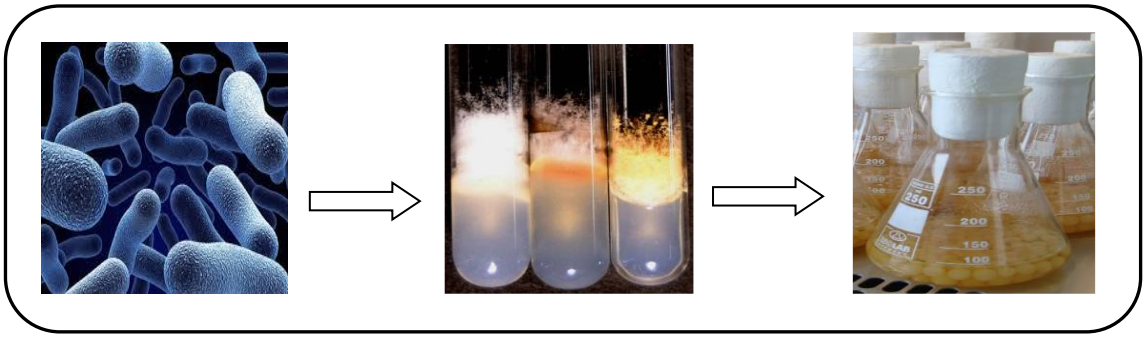
3.3.1.2. Mueller hinton broth besiyeri bileşenleri

Et ekstraktı	5,0 g
Kazein hidrolizatı	17,5 g
Nişasta	1,5 g

Ticari olarak satın alınan besiyeri litrede 21 g olacak şekilde tartılıp 1000 mL saf suda çözüldü. Otoklavda 1.1 atmosfer basıncında, 121°C'de 60 dakika süre ile steril edildi. MHB besiyeri bakterilerin biyotransformasyon tepkimeleri için sıvı besiyeri olarak kullanıldı.

3.3.2 Biyotransformasyon tepkimesinin gerçekleştirilmesi

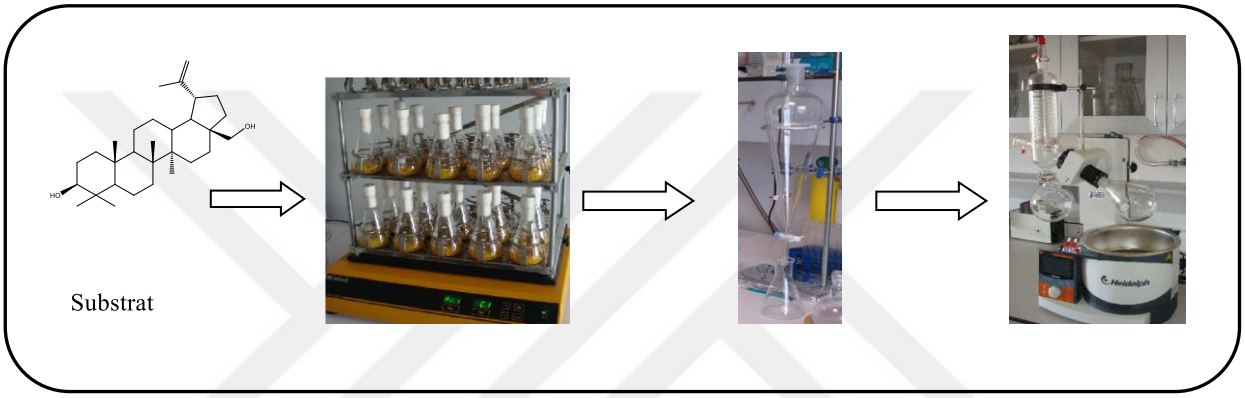
Katı MHA yüzeyi üzerinde büyütülen mikroorganizmalar, mikroorganizma yoğunluğu Mac Farland No: 0.5 olacak şekilde ayarlanarak 100 µL'si, içerisinde 100 mL steril MHB (Mueller Hinton Broth) çözeltisi içeren 250 mL'lik erlenlere aktarıldı. Bu erlenler 20-24 saat boyunca 37°C derecede çalkalayıcılı inkübatörde bekletildi. Daha sonra bu erlenlere asetonda çözülerek hazırlanmış betulin çözeltisinden (15 µg/mL) 1 mL ilave edildi ve 30-35°C'de dairesel çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bakterilerin hazırlığı ve preinkübasyon aşaması

3.4. Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Analizi

30-35°C'de dairesel çalkalayıcıda bekletilen erlenlerden 3., 5. ve 7.günlerde 10 mL örnek alınarak 6,000 g, 10 dk santrifüjlendi. Ardından biyokütleden ayrılan süpernatan kısım alınarak 20 mL etil asetat ile 2 defa ekstrakte edildi. Organik faz evaporatörde uçuruldu ve İTK ile metabolit varlığı tespiti yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Substrat ilavesi, inkübasyon, filtrasyon ve ekstraksiyon aşamaları

3.5. Sitotoksisite Testleri

Betülinin antikanser etkisinin araştırılmasında, HepG2 (insan hepatoselüler karaciğer karsinoma-ATCC® HB-8065™), A549 (insan akciğer adenokarsinoma-ATCC® CCL-185) ve 5RP7 (sıçan embriyonik fibroblast) hücre dizileri kullanıldı (ATCC, ABD). Antikanser aktivitenin selektivitesi ise NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücre dizisi (ATCC® CRL-1658™) üzerinde değerlendirildi (ATCC, ABD).

3.5.1. Hücrelere uygun besiyerinin hazırlanması

HepG2 İnsan hepatoselüler karaciğer karsinoma hücre dizisi için, son derişiminde %10 Fötal Buzağı Serumu (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya), %89 Eagle'ın Minimum Esansiyel Medyumunu (EMEM)

(Sigma-Aldrich, Almanya) ve 2 g/L $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

A549 İnsan akciğer adenokarsinoma hücre dizisi için ise son derişimde %10 FBS (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya) ve %89 RPMI-1640 Medyum (Sigma-Aldrich, Almanya), 2 g/L $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

NIH/3T3 fare embryonik fibroblast hücre dizisi ve 5RP7 H-ras onkogen aktif fare fibroblast hücreleri için, son derişimde %10 FBS (Sigma-Aldrich, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, Almanya), %89 Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Medyumunu (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 2 g/L $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan besiyeri kullanıldı ve pH 7.4'e ayarlandı.

3.5.2. Hücrelerin çoğaltılması

Deneylerde kullanılan hücrelerinin çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapıldı. Hücreler kültür şişesine 5 mL fosfat tamponu ilave edilerek yıkandı ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür şişesine tripsin EDTA çözeltisi (1×) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk bekletildi (%5 CO_2, %5 nem ve 37°C). İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 mL besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edildi ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alındı. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı.

3.5.3. Hücrelerin plakalara ekilmesi

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalandı ve steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atıldı. Kültür şişesine Tripsin-EDTA çözeltisi (1×) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dk bekletildi. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine besiyeri ilave edilerek pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu çalkalandıktan sonra 10 µL alınarak 10 µL tripan

mavisi (Biorad, ABD) ile boyandı ve 10 µL'si otomatik hücre sayma cihazında (Biorad, ABD) sayıldı. Hücre süspansiyonu $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5.4. Hücrelere XTT sitotoksisite testinin uygulanması

Tetrazolium tuzları olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolum-5-karboksianilit tuzu) ve MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür) canlı hücrelerdeki metabolik aktivitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Tetrazolium tuzlarını metabolizma ve solunum zinciri intakt hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşmektedir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz sarı renkli tetrazolyum tuzunu elektron kenetli reaktif varlığında çözünür turuncu renkli formazana dönüştürmektedir (Berridge vd., 2005).

Betülinin 3,9-500 µg/mL arasında 8 seri dilüsyonu (3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL) negatif ve pozitif kontroller ile birlikte plakalara uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO_2, %95 nem ve 37°C). Son DMSO derişimi <%0,1 olacak şekilde ayarlandı. Negatif kontrol olarak DMSO %0,1, pozitif kontrol olarak ise sisplatin kullanıldı (Altıntop vd., 2012). 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atıldı. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre kültür plakasına 200 µL/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ilave edildi. XTT1 ve XTT2 çözeltileri (Xenometrix, İsviçre) 1:100 oranında karıştırılarak hücre kültür plakasına 50 µL/kuyucuk olacak şekilde ilave edildi. Ardından 3 saat inkübasyona bırakıldı (%5 CO_2, %95 nem ve 37°C). 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakalar 5 dk hafifçe çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda (Biotek, ABD) 480 nm' de optik yoğunluk (OD) değerleri okundu.

Test maddelerinin her bir derişimi için % inhibisyon değerleri hesaplandı. % inhibisyon değerlerine karşılık derişimleri ile doz-cevap eğrisi çizilerek maddelerin inhibitör derişim 50 ($İK_{50}$) değerleri hesaplandı ve maddelerin sitotoksik özellikleri yorumlandı. Tüm deneyler 4 tekrarlı ve 3 farklı zamanda tekrar edilerek yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi.

% İnhibisyon= 100-[($OD_{test\ maddesi}$- $OD_{kör}$/$OD_{çözücü\ kontrol}$- $OD_{kör}$) x 100]

Betülin bileşiğinin selektivitesi önceki çalışmalar ile belirtilen formül yardımıyla hesaplandı (Popiołkiewicz vd., 2005). $İK_{50}$ değeri 500 µg/mL büyük değerler 500 olarak alındı.

Selektivite İndeksi (Sİ) = ($İK_{50\ NIH/3T3}$/ $İK_{50\ HepG2/5RP7/A549}$) x 100

3.5.5. MTT ölçümü

Betülinin in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla, deney için yeterli sayıya ulaşan 5RP7 hücreleri Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^3 hücre gelecek şekilde ekilerek ve aynı zamanda hücrelere 3,9-500 µg/mL derişimlerinde betülin ve pozitif kontrol (Sisplatin) eklenerek 37 ºC' de inkübe edildi. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave edilerek, hücreler 37 ºC' de 2 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda, hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µL DMSO eklenip 10 dakika daha inkübe edildi. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi.

3.6. DNA Sentez Analizi

XTT metodu ile belirlenen betülin dozlarına bağlı olarak, DNA sentez analizi Cell Proliferation ELISA, BrdU (kolorimetrik) kit kullanılarak ölçüldü. Bu immunehistokimyasal boyamaya dayalı bir yöntem olup, spesifik bir anti-BrdU kullanılarak hücre siklusunun S-fazı süresince timidin yerine bromodeoksiuridinin (BrdU) nükleer DNA'ya katılımının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Böylece, bu metot karsinojenik hücrelerde DNA sentezinin inhibisyonu oranının kolorimetrik olarak ölçülmesini sağlamaktadır (Malikova vd, 2008). Hücrelerin $2x10^3$ yoğunlukta olacak şekilde 96'lık düz tabanlı mikroplakalara ekilmesinden sonra, çeşitli derişimlerde (20, 50, 100, 200 ve 500 µg/mL) betülin ve pozitif kontrol (Sisplatin)(tümör hücrelerine ilave

edilerek, mikroplakalar 37ºC'de 24 saat boyunca %5 CO_2 ve %95 nem taşıyan ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, 2 saat süresince hücreler 10 µL BrdU çözeltisi ile işaretlendi ve sonra karıştırıldı. Anti-BrdU-POD (100 µL) ilave edilerek 90 dakika inkübasyona bırakıldı ve 1xPBS çözeltisi ile yıkama yapıldıktan sonra örneklerin absorbans değerleri 492 nm'de okundu. Deneyler iki kez tekrar edildi ve ayrıca her dozdaki bileşik için ikili kuyucuklar kullanıldı.

3.7. Apoptotik Etki Deneyleri

3.7.1. Annexin V FITC: Erken faz apoptozun belirlenmesi

Betülin derişimlerine bağlı olarak 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerin apoptotik etkileri akım sitometrede BD, Pharmingen Akım sitometri kiti ile üretici firmanın önerilerine göre belirlendi. Özetle, hücreler, 800 rpm de 4 dakika santrifüj edildikten sonra 1×PBS ile 2 kez yıkandı ve 2-3 × 10^6 hücre/mL de olacak şekilde 1×Annexin-V bağlanma çözeltisinde süspanse edildikten sonra hücre solüsyonundan 100 µL alınarak tüplere aktarıldı. Daha sonra her bir tüpe, 5 µL Annexin-V FITC ve 10 µL propidyum iyodür çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µL 1×Annexin-V bağlanma çözeltisi ilave edildi ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde akım sitometre (BD FACSCaliburTM) ile analiz edildi. Erken ve geç apoptotik hücre miktarı pozitif kontrole (Sisplatin) göre hesaplandı (Akalın Çiftçi vd, 2013).

3.7.2. Kaspaz-3 Antikor Apoptoz:Erken faz apoptozun belirlenmesi

Betülin derişimlerine bağlı olarak hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrasında Kaspaz 3 aktiviteleri akım sitometrede BD, Pharmingen Akım sitometri kiti ile üretici firmanın önerilerine göre belirlenmiştir.

Özetle, hücreler belirlenen doz ve zamanda maddeler ile inkübe edildi. Soğuk 1×PBS ile iki kez hücreler yıkandı. Daha sonra bu hücreler BD Cytofix/Cytoperm solusyonu ile süspanse edildi (1x10^6 hücre/0.5 mL olacak şekilde) ve 20 dk. buz üzerinde bekletildi. Santrifüj edildikten sonra hücreler, BD Cytofix/Cytoperm solüsyonu atıldı ve

hücreler iki kez BD Perm/Wash™ buffer ile ($1x10^6$ hücre/0.5 mL) yıkandı. Daha sonra hücreler yeniden BD Perm/Wash™ buffer ve antikor ile süspanse edildi ve 30 dk oda ısısında bekletildi. Her bir test için 1 mL BD Perm/Wash™ buffer içinde yıkandı ve 0.5 mL BD Perm/Wash™ buffer içinde süspanse edilerek flow sitometre ile analiz edilsi. Kaspaz 3 aktif hücre miktarı pozitif kontrole (Sisplatin) göre hesaplandı.

3.7.3. Hücrelerin JC-1 ile boyanması (Mitokondrial membran bütünlüğünün saptanması

IK_{50} derişimlerine bağlı olarak betulinin 5RP7 hücreleri üzerindeki mitokondriyal membran bütünlüğünün saptanması flow sitometride BD, Pharmingen Flow sitometri kiti ile üretici firmanın önerilerine göre belirlenecektir. Bu amaç doğrultusunda, hücreler optimal bir yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekildi ($1x10^6$/mL hücreyi geçmemelidir). Daha sonra hücreler betülin ile uygun derişim ve zamanda inkübe edildi. Muameleden sonra her bir hücre süspansiyonu 15 mL lik polistiren santrifüj tüpüne alındı ve hücreler 400 g. de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi süpernatant uzaklaştırıldı. 0.5 mL taze hazırlanmış çalışma solüsyonu her bir pellete ilave edildi ve vortekslendi. 37 ºCde hücreleri 10-15 dk. JC-1 çalışma solüsyonunda bekletildi ve hücreler iki kez yıkandı. 1. yıkamada 2 mL 1X assay buffer eklendi ve hassas bir şekilde hücreler süspanse edildi. Daha sonra 400 g. de hücreler 5 dk. santrifüj edildi ve dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı. 2. yıkamada 1 mL 1X assay buffer ilave edildi ve vortekslendi. 400 g. de 5 dk. hücreler santrifüj edildikten sonra her bir hücre pelleti 0,5 mL lik 1X Assay buffer'da süspanse edildi ve vortekslendi. Son olarak da hücre akım sitometre ile analiz edildi. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanıldı ve sonuçlar bu pozitif kontrole göre kıyaslandı.

3.7.4. Hücre siklusu ölçümü

Betülinin IK_{50} derişimlerine bağlı olarak A549 ve HCA-7 Colony 29 hücreleri üzerindeki hücre siklusuna etkileri üretici firmanının önerilerine göre gerçekleştirildi. Özetle, hücreler sitratlı tampon çözeltisinde süspanse edildi.

Hücreler 400 g. de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve pellet üzerine 250 µl solüsyon A ilave edildi. Daha sonra 200 µl solüsyon B eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Sonra 200 µL solüsyon C eklendi. Sonra +4 °C da 10 dk. korunarak BD Bioscience's MODFID software kullanılarak akım sitometri ile analiz edildiler.

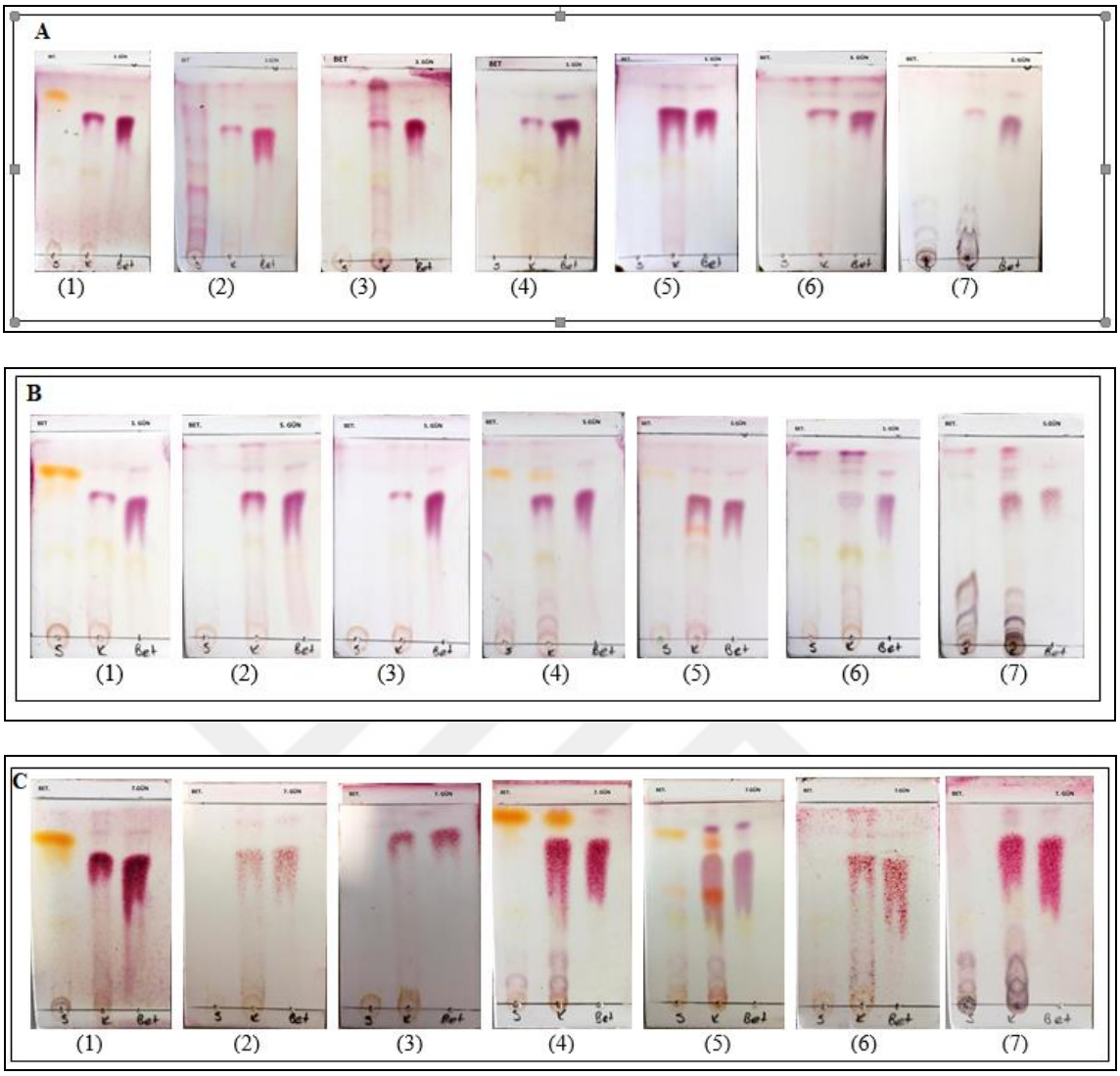
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Betülinin biyotransformasyon çalışmaları

Betülin molekülünün 7 farklı bakteri ile preparatif ölçekte gerçekleştirilen biyodönüşüm tepkimeleri sonucu elde edilen ekstrelerden saf metabolit izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Çalışmamızda kullanılan bakteri suşları şunlardır;

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 **(1)**
- *Proteus vulgaris* NRRL B-123 **(2)**
- *Bacillus subtilis* NRRL B-4378 **(3)**
- *Streptomyces griseolus* NRRL B-1062 **(4)**
- *Escherichia coli* ATCC 8739 **(5)**
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 **(6)**
- *Bacillus velezensis* NRRL B-14580 **(7)**

7 Farklı bakteri kültürü ile preparatif ölçekte gerçekleştirile biyotransformasyon tepkimeleri sonrası ortamdan 3., 5. ve 7. günlerde alınan örneklerin ITK'ları aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Betüline ait 3. Gün (A), 5. Gün (B) ve 7. Gün (C) ön deneme sonuç ITK'ları

4.2. Sitotoksisite çalışmaları

Sitotoksisite testleri, ilaç adaylarının hücrelerin temel fonksiyonlarına etkilerini belirleyerek hücresel hasarın değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu testler hücre sayısına, morfolojisine ve metabolik aktivitesine dayanarak ilaç adaylarının toksisitesi ve güvenilirliği hakkında ön bilgi sağlamaktadır (Pohjala vd, 2007). Sitotoksik etkilerin belirlenmesi ve mekanizmasının aydınlatılmasında mitokondriyal aktivite tayini (MTT/XTT) sık kullanılan bir yöntemdir (Langdon vd, 2010).

Amerikan Kanser Birliği'nin hazırladığı rapora göre, gelişmekte olan ülkelerde en sık teşhis edilen kanserler erkeklerde akciğer, hepatoselüler ve mide iken kadınlarda meme, serviks ve akciğer kanseri olarak sıralanmaktadır.

Erkeklerde akciğer kanseri; kanser ilişkili ölümlerin en başında yer alırken ikinci sırayı ise hepatoselüler karsinoma almaktadır. Kadınlarda ise akciğer kanserinin ikinci, hepatoselüler karsinomanın ise beşinci sırada olduğu tespit edilmiştir (American Cancer Society, 2015). Ayrıca son yıllarda hepatoselüler karsinomanın görülme sıklığının arttığı saptanmıştır (Attwa ve El-Etreby, 2015). Bu noktada ortak paydada tüm dünyada her iki cinsiyet açısından da akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinoma oldukça önem taşımaktadır. Bu sebeple de çalışmamızda sonuç bileşiklerinin A549 insan akciğer adenokarsinoma ve HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücre dizileri üzerindeki antikanser etkileri XTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve İK$_{50}$ değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Bileşiklere ait İK$_{50}$ ve SI değerleri

Bileşik	**İK$_{50}$ değerleri (µg/mL)**				**SI değerleri**		
	NIH/3T3	**A549**	**HEPG2**	**5RP7**	**A549**	**HEPG2**	**5RP7**
Betülin	62.5 ± 9.6	207.7± 18.1	125 ± 15.1	28.33±1.53	30	50	223
Sisplatin	500 ± 5.6	21.5± 0.6	38.4 ± 1.1	7.33±0.58	2326	1302	6821

Çalışma sonuçlarına göre, betülin molekülünün A549 ve HepG2 hücre dizilerine karşı; sırasıyla 207.7 µg/mL ve 125 µg/mL İK$_{50}$ değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Betülin ile ilgili elde edilen bu değerler literatürde A549 ve HepG2 kanser hücrelerine karşı gerçekleştirilen sınırlı sayıda çalışma verisi karşılaştırıldığında (İK$_{50}$=5-15 µg/mL) farklılık göstermektedir (Yang vd, 2010; Li vd., 2010). Bu farklılıklar hücre hatlarının pasaj sayılarındaki ve inkübasyon zamanındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Her iki çalışma da bu etkilerinin doza bağımlı olduğu ortaya konulmuştur (Yang vd, 2010, Li vd, 2014). Bu çalışmalarda betülinin sağlıklı hücre dizisine karşı sitotoksisitesi değerlendirilmemiştir. Bulgularımıza göre, sağlıklı hücre dizisine karşı (NIH/3T3) ise İK$_{50}$ değerinin 62.5 µg/mL olduğu saptanmıştır. Bu noktada, Sİ değerleri sırasıyla 30 ve 50 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, betülin bileşiğin aktivitesinin A549 ve HepG2

hücrelerine karşı seçici olmadığı ve sağlıklı hücrelere karşı sitotoksisitesinin etkinliğini sınırlandırdığını söylemek mümkündür. Ancak 5RP7 (28.33±1.53 µg/mL) hücresine karşı seçici olarak sitotoksik etkinlik göstermiştir (Çizelge 4.1).

4.3. Genotoksisite çalışmaları

İlaç geliştirilme süreçlerinde, bileşiklerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde erken dönemde tercih edilen en avantajlı testler *in vitro* genotoksisite test yöntemleridir (Flückiger-Isler vd, 2004). Ames testi, ilaç geliştirilme sürecinde güvenilirlik taramalarının ana bileşeni olup potansiyel mutajen ve karsinojen bileşiklerin belirlenmesinde öncül bir test olarak uygulanmaktadır (Flückiger-Isler vd, 2004; Thybaud vd, 2007; Greene vd, 2010). Günümüzde, standart Ames testine alternatif olarak agar plakalar yerine küçük kuyucuklu plakalarda sıvı bir süspansiyon içinde gelişen bakterileri kullanan daha verimli Ames MPF testi geliştirilmiştir (Houck ve Kavlock, 2008).

Ames MPF genotoksisite testinde kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları TA98 ve TA100'dür. TA100 baz çifti substitüsyonlarının, TA98 ise çerçeve kayması mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu mutasyonlar histidin kaynağı olmadan histidin taşıyan organizmaların büyümesini durdurmaktadır. Maddelerin mutajenite potansiyeli, değişik derişimlerine bu organizmaların maruz bırakılmasının ardından üreme miktarlarının gözlenmesi ile değerlendirilmektedir. Bakteride histidin geninde baz değişimleri veya çerçeve kaymaları gibi mutajenik bir olay meydana gelmesi ile bakteri histidin olmayan ortamda da büyüme göstermekte ve buna bağlı olarak maddenin mutajenik olduğuna karar verilebilmektedir (Chandrasekaran vd, 2010; Kouvelis vd, 2011). Bileşiklerin metabolik aktivasyon ile mutajenite kazanabilme ihtimalleri göz önünde bulundurularak uygun ortam için sıçan karaciğerinden elde edilen S9 karaciğer mikrozomal enzim fraksiyonu eklenmektedir (Kouvelis vd, 2011).

Bulgularımıza göre, Ames MPF testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşları ile S9 enzim fraksiyonu varlığında pozitif kontroller olan 2-aminoantrasen ile TA98 ve TA100 ile S9 enzim fraksiyonu yokluğunda ise sırasıyla 4-nitro-o-kuinolin ve 2-nitrofluren ile 25' ten fazla pozitif kuyucuk gözlenmiştir. Negatif kontroller için *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 ile S9 enzim fraksiyon varlığında ve yokluğunda

pozitif kuyucukların sayısı 8’ den az olarak belirlenmiştir. Bu duruma göre sonuçlarımız Ames MPF testi için gereken validasyon kriterlerini sağlamıştır.

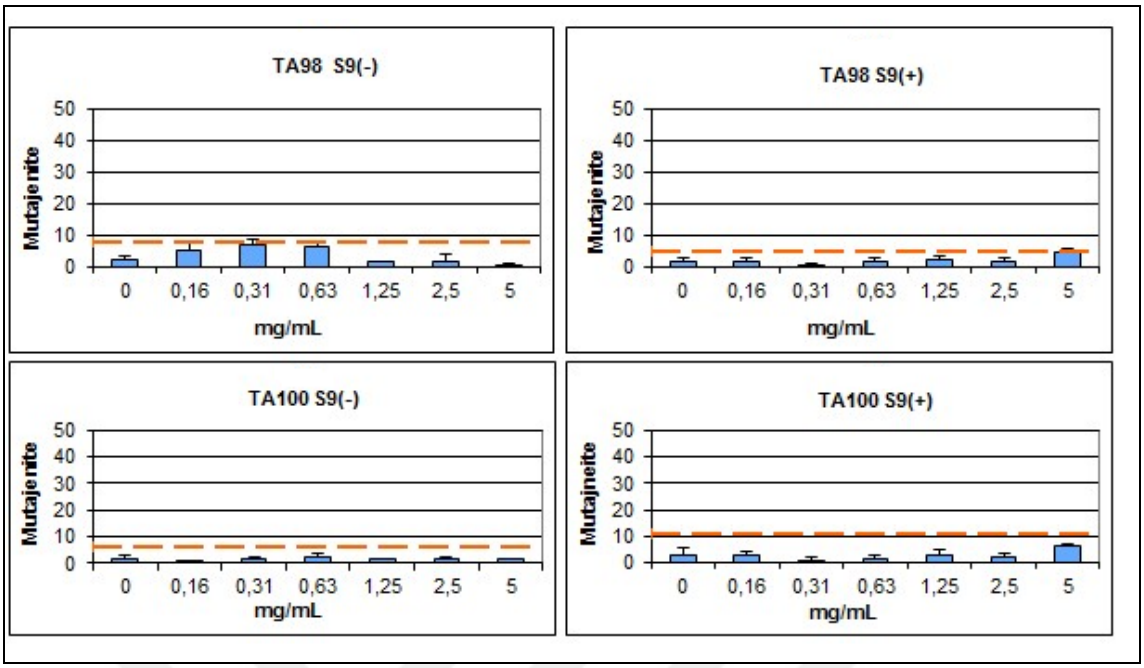
Çizelge 4.2. Bileşiklerin Ames MPF genotoksisite testi sonuçları

Bileşik	**Derişim (mg/mL)**	**Mutajenite**							
		Taban Çizgisi		TA 98		Taban Çizgisi		TA 100	
		S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-
Betülin	0,156	2,49	3,86	0,54	1,38	5,55	3,00	0,48	0,22
	0,3125			0,13	1,81*			0,18	0,56
	0,625			0,54	1,64*			0,24	0,78
	1,25			0,94	0,52			0,54	0,44
	2,5			0,54	0,52			0,42	0,56
	5			1,74*	0,17			1,08	0,44

*student-t testi ne göre p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir; *** student-t testi ne göre p<0,001 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Değerlendirme kriterlerine göre ise; zemin çizgisi ≤3 ise; zemin çizgisinin 2-3 katı olan belirgin artışlar zayıf mutajenite; 3 kattan büyük artışlar mutajen olarak sınıflandırılmıştır. Bu durumda, en az 2 ardışık dozun t-testine (p<0.05) göre istatistiksel olarak anlamlı artışa sahip olması veya en yüksek non-toksik derişimin anlamlı bir artışa sahip olması gerekmektedir. Zemin çizgisi >3 ise; zemin çizgisinin 1.5-2.5 katı anlamlı artışlar zayıf mutajen; 2.5 kattan büyük anlamlı artışlar ise mutajen olarak sınıflandırılmıştır. Bu durumda, en az 2 ardışık dozun t-testine (p<0.05) göre istatistiksel olarak anlamlı artışa sahip olması veya en yüksek non-toksik derişimin anlamlı bir artışa sahip olması gerekmektedir. Betüline ait taban çizgisi değerleri ve kaç katı artış gösterdikleri ile istatistiki değerlendirmeleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Betülin Şekil 4.2’de değerlendirme kriterlerine göre mutajenite açısından TA 98 ve TA 100 suşlarına karşı metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda zemin çizgisinin belirtilen katı artışlara hiç bir dozda ulaşmamış ve istatistiksel anlamlılıklar arasında ardışık dozlar arasında doz-cevap eğilimine rastlanmamıştır. Betülinin AMES testi sonuçlarına göre mutajenite göstermediği bulunmuştur.



Şekil 4.2. Betüline ait AMES MPF TA 98/100 testi sonuçları (---Zemin çizgisi * 2)

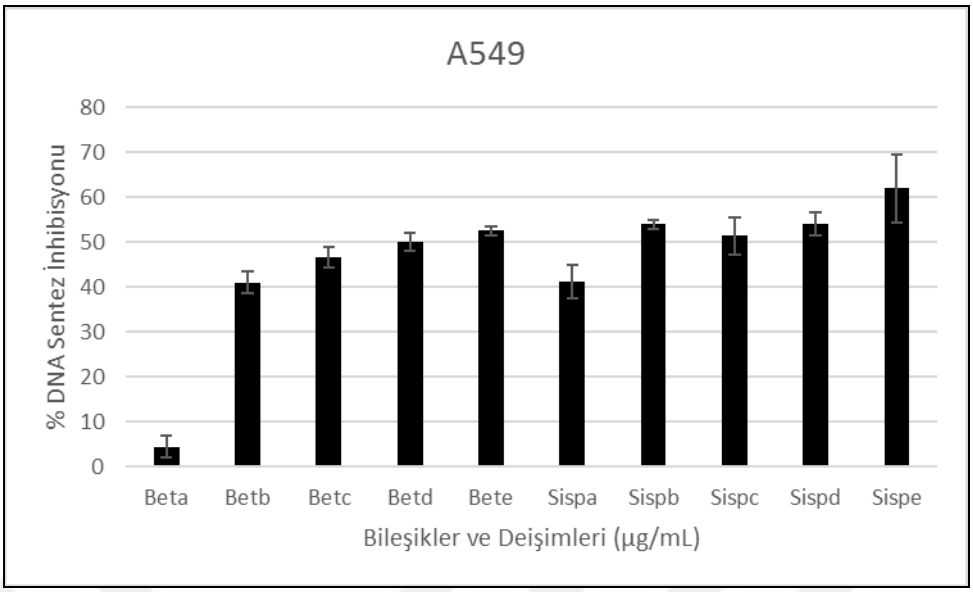
Sonuç olarak, test kriterlerine göre betülin bileşiğinin ilaç geliştirilme safhasının en önemli izlem testlerinden olan Ames testi ile geliştirilme basamağından geri çekilmenin en önemli etkeni olan mutajenite göstermedikleri saptanmıştır. Betülin bileşiği Ames testine göre kendileri veya metabolik aktivasyon yoluyla olan ürünleri TA 98 ve TA 100 suşlarına karşı non-mutajen yani negatif olarak belirlenmişlerdir. Kayda değer biyolojik aktiviteye sahip olan bileşikler için Ames test sonucu negatif olması sebebi ile ilerleyen araştırmalara geçmeleri için bir engel olmadığı vurgulanabilir.

4.4. DNA sentez analizi çalışmaları

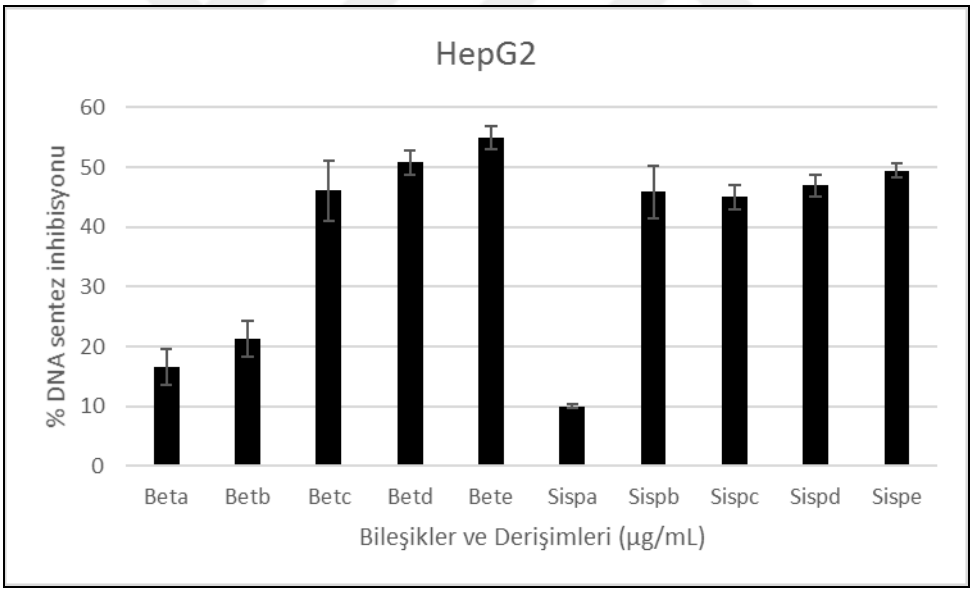
Hücre proliferasyonu ELİSA, BRDU (kolorimetrik) deneyi DNA sentezini gerçekleştirerek replike olan hücrelerdeki proliferasyonunun ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu deney BRDU'nun bu hücrelere girişinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu proje kapsamında betülinin DNA Sentez inhibisyon aktivitesi 24 saat için değerlendirilmiştir. A549 ve HepG2 hücre hatları, bileşiklerin İK$_{50}$ değerlerine bağlı olarak belirlenen 5 farklı derişim değeri ile inkübe edilmiş ve sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Betülinin, A549 ve HepG2 hücreleri üzerinde DNA sentez inhibisyonu aktiviteleri Şekiller 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir. Ayrıca betülinin 5RP7 hücreleri üzerinde

DNA sentezi inhibisyonu üzerine olan etkileri, betülinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ değerlerine bağlı olarak iki farklı derişim değerinde çalışılmış ve elde edilen aktiviteler Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Bu çalışmada da sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

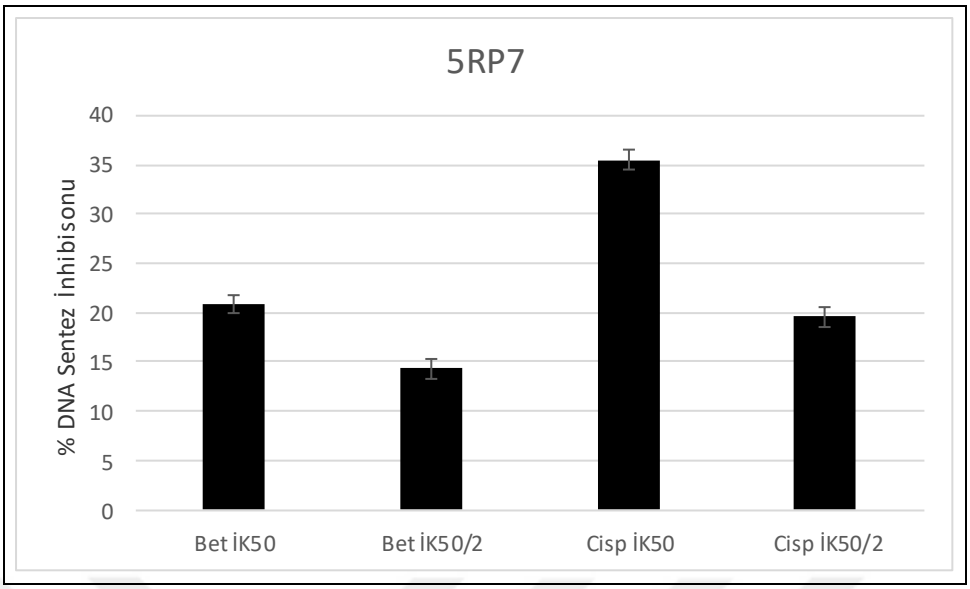
Betülinin beş farklı dozda (20, 50, 100, 200 ve 500 µg/mL) A549 ve HepG2 hücreleri ile 24 saat inkübe edilmesi sonrasında hücre proliferasyonu deneyinden elde edilen veriler, bu bileşiğin DNA sentezi inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir. Betülin'in 20, 50, 100, 200 ve 500 µg/mL derişimlerinde A549 hücrelerinde DNA sentezi inhibisyonu sırasıyla 4.5, 41, 47, 50 ve 53 olarak hesaplanmış ve sisplatinden (41.2, 53.97, 51.41, 54.10 or 61.95) daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.3). Diğer taraftan betülinin'nin 20, 50, 100, 200 and 500 µg/mL derişimlerinde HepG2 hücrelerinde DNA sentezi inhibisyonu sırasıyla 17, 22, 46, 51 ve 55 olarak bulunmuştur. Bu değerler sisplatinde ise 10.04, 45.88, 45.06, 46.91 ve 49.38 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4). Bu sonuçlara bakıldığında betülin doza bağımlı bir DNA sentezi inhibisyonuna neden olsa da etkileri 50 µg/mL ve daha yüksek dozlarda sisplatine kıyasla daha yüksektir. Ayrıca, betülinin ve Sisplatinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ (Betülin için 28 ve 14 µg/mL ve sisplatin için 7 ve 3.6 µg/mL) dozunda 5RP7 hücreleri ile 24 saat inkübe edilmesi sonrasında hücre proliferasyonu deneyinden elde edilen veriler, betülinin DNA sentezi inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5). Betülin'nin 28 ve 14 µg/mL derişimlerinde 5RP7 hücrelerinde DNA sentezi inhibisyonu sırasıyla 21 ve 14 olarak bulunmuştur. Bu değerler sisplatinden (35.49, 19.59) daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Betülin ve sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki DNA sentez inhibisyon etkileri



Şekil 4.4. Betülin ve sisplatinin HepG2 hücreleri üzerindeki DNA sentez inhibisyon etkileri



Şekil 4.5. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerindeki DNA sentez İnhibisyon etkileri

Her üç hücre hattı üzerindeki DNA sentez inhibisyon etkileri kıyaslandığında betülin, HepG2 hücreleri üzerine daha fazla etki göstermiştir. Betülinin yüksek antiproliferatif etki göstermesi bizi daha ileri mekanizma çalışmaları yapmamıza yönlendirmiştir.

4.5. Betülinin apoptotik etki deneyleri

Kanser tedavisinde kullanılan kemoteröpatik ajanların genel amacı, kanserli doku hücrelerini programlı hücre ölümüne (apoptoz) sürüklemektir. Apoptoz, son yıllarda kanser tedavisi için daha etkili terapötik ajanları araştırmaya yönelik yapılan çalışmaların hedefi olmuştur (Ricci ve Zong, 2006). Apoptoz, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan morfolojik olarak farklı bir çeşit hücre ölümüdür. Apoptozun belirlenmesi amacıyla çalışmamızda Annexin V FITC ve Kaspaz 3 deneylerini gerçekleştirilmiştir.

Apoptotik hücrelerde fosfatidilserin hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine taşınır. Bu değişim Annexin V FITC metodu ile akım sitometride belirlenmiştir. Bu apoptotik yolak, hücresel organeller ve iskeletin hızlıca bozulmasına aracılık eden kaspazlar olarak adlandırılan proteolitik enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Bunlar arasında

en önemlisi ve en iyi tanımlanmış olanı Kaspaz-3'dür. Kaspaz-3 çoğu hücresel anahtar proteinin spesifik olarak ayrılmasını katalize eden ölüm proteazlarını aktive eder (Mosieniak vd., 2006; Thayyullathil vd., 2008) Bu nedenle çalışmamızda Kaspaz-3 aktivasyonu akım sitometri ile belirlenmiştir.

A549 hücreleri üzerinde akım sitometrik analiz sonucunda betülin ve sisplatinin sırasıyla 207.7 ve 21.5 µg/mL derişimlerinde erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla %9.6 ve 8.0 olarak belirlenirken, nekrotik etkileri sırasıyla % 4.4 ve 4.1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. Betülin ve sisplatin uygulanan A549 ve HepG2 hücreleri Anneksin V-FITC/propidyum iyodür akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri.

Gruplar	% Erken and geç apoptotik hücreler		% Canlılık	
	A549	**HepG2**	**A549**	**HepG2**
Kontrol	5.0	4.5	93.8	88.5
Betülin uygulanan hücreler	9.6	12.1	86.0	86.5
Sisplatin uygulanan hücreler	8.0	32.3	87.9	55.5

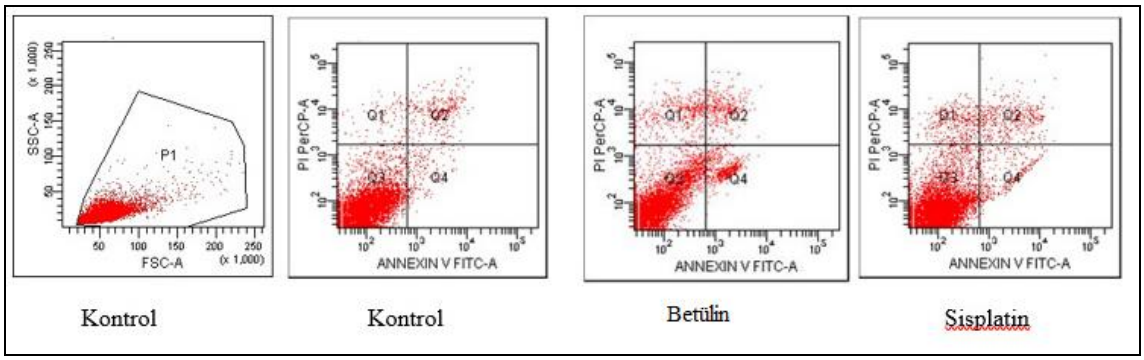
Diğer taraftan betülin ve sisplatinin sırasıyla 125 ve 38.4 µg/mL derişimlerinde HepG2 hücreleri üzerinde erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla %12.1 ve 32.3 olarak belirlenirken, nekrotik etkileri sırasıyla %1.5 ve 12.2 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.4. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücreleri Anneksin V-FITC/propidyum iyodür akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri.

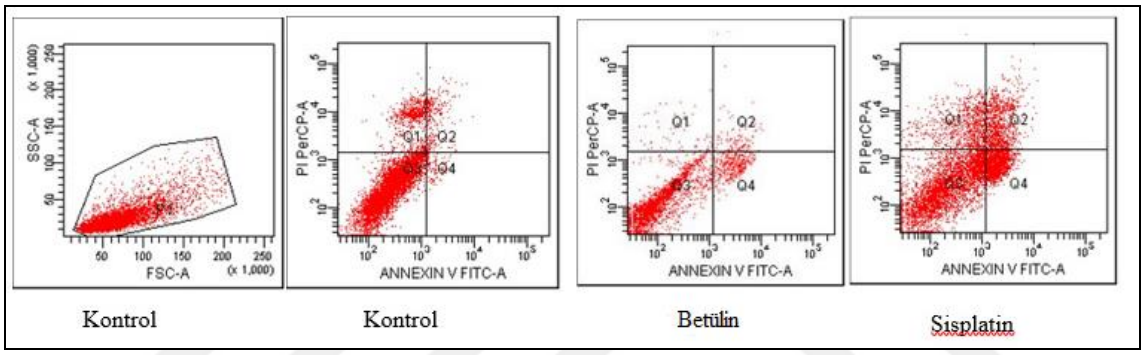
Gruplar	**5RP7**		
	% Erken apoptotik hücreler	% Geç apoptotik hücreler	% Canlılık
Kontrol	5,9	2,4	90,2
Betülin $İK_{50/2}$ dozu uygulanan hücreler	26,7	27,0	38,8
Betülin $İK_{50}$ uygulanan hücreler	65,4	20,0	12,5
Sisplatin $İK5_{0/2}$ uygulanan hücreler	6,2	4,8	87,9
Sisplatin $İK_{50}$ uygulanan hücreler	10,4	5,6	82,4

Ayrıca, 5RP7 hücreleri üzerinde akım sitometrik analiz sonucunda betülinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ derişimlerinde erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla % 85.5 ve 53.7 olarak belirlenirken, nekrotik etkileri sırasıyla % 2.0 ve 7.6 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.8). Sisplatinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ derişimlerinde erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla % 16.0 ve 11.0 olarak belirlenirken, nekrotik etkileri sırasıyla % 1.6 ve 1.1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.8).

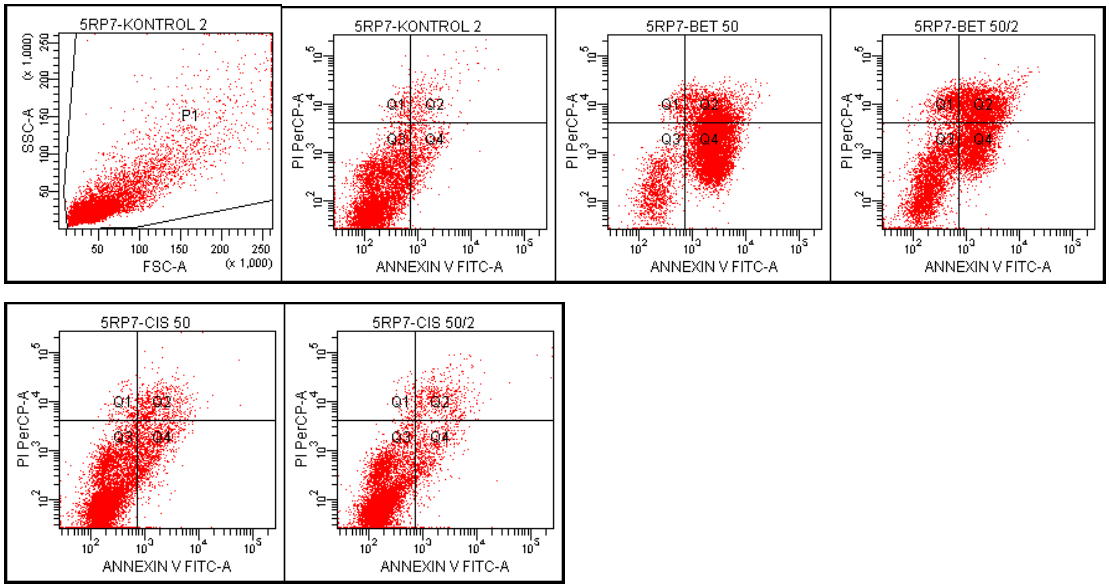
Bu sonuçlar, betülinin 5RP7 hücrelerinde sisplatine oranla daha fazla apoptoza neden olduğunu ve bu etkinin doza bağlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.6. Betülin ve sisplatinin değişik derişimlerinde A549 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: geç apoptotik hücreler, Q3:Canlı hücreler, Q4: Erken apoptotik hücreler.



Şekil 4.7. Betülin ve sisplatinin değişik derişimlerinde HepG2 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: geç apoptotik hücreler, Q3:Canlı hücreler, Q4: Erken apoptotik hücreler.



Şekil 4.8. Betülin ve sisplatinin İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ derişimlerinde 5RP7 hücreleri üzerindeki akım sitometrik analizleri. Q1: Nekrotik hücreler, Q2: Geç apoptotik hücreler, Q3:Canlı hücreler, Q4: Erken apoptotik hücreler.

4.6. Betülinin kaspaz 3 aktivite sonuçları

Kaspaz 3 aktivasyonunu araştırmak için A549, HepG2 ve 5RP7 hücreleri, 24 saat için betülin ve sisplatin ile inkübe edilmişlerdir (A549 hücreleri için 207.7 ve 21.5 µg/mL ve HepG2 hücreleri için 125 ve 38.4 µg/mL ve betülin için 28.33 and 14.17 µg/ml) (Çizelge 4.5 ve Şekiller 4.9, 4.10).

Çizelge 4.5. Betülin ve sisplatin (A549 hücreleri için 500, 125, 207.7 ve 21.5 µg/mL ve HepG2 hücreleri için 409.2, 500, 125 ve 38.4 µg/mL) uygulanan A549 ve HepG2 hücrelerinin aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri

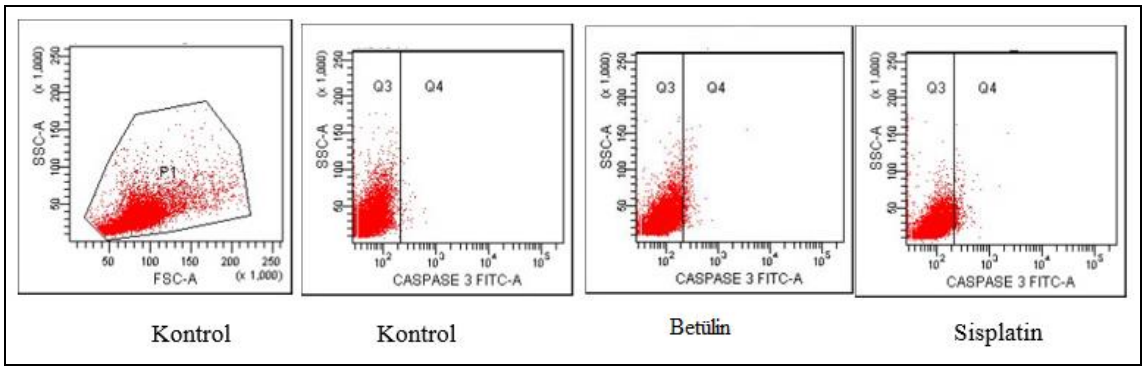
Gruplar	% Kaspaz 3 pozitif (+) hücreler		% Kaspaz 3 negatif (-) hücreler	
	A549	**HepG2**	**A549**	**HepG2**
Kontrol	0.4	0.9	99.6	98.2
Betülin uygulanan hücreler	2.3	28.7	97.7	65.5
Sisplatin uygulanan hücreler	3.1	4.1	96.9	95.9

Akım sitometri analizi sonrası kaspaz 3 pozitif hücre yüzdeleri betülin ve sisplatin için sırasıyla A549 hücreleri üzerinde %2.3 ve 3.1 olarak ve kaspaz 3 negatif hücre yüzdeleri sırasıyla %97.7 ve 96.9 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.9). Diğer taraftan HepG2 hücreleri üzerinde betülin ve sisplatin için kaspaz 3 pozitif hücre yüzdeleri sırasıyla HepG2 hücreleri üzerinde % 28.7 ve 4.1 olarak ve kaspaz 3 negatif hücre yüzdeleri sırasıyla % 65.5 ve 95.9 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.10).

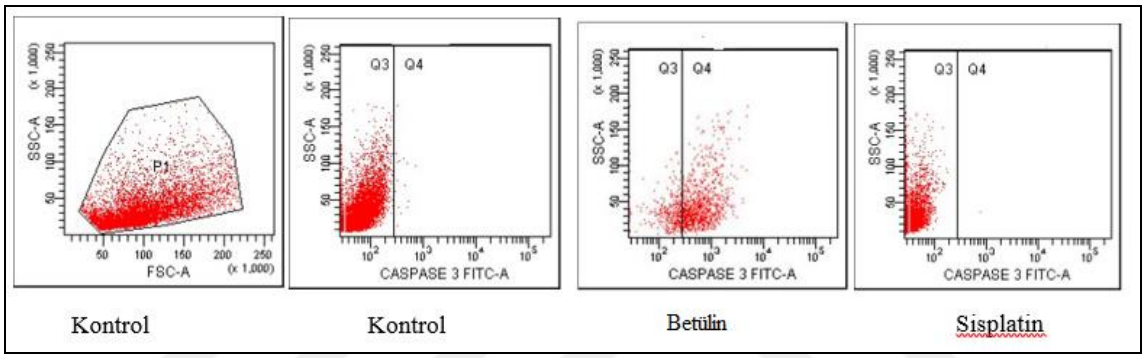
Çizelge 4.6. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücrelerinin aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri

Gruplar	**5RP7**	
	% Kaspaz 3 pozitif (+) hücreler	% Kaspaz 3 negatif (-) hücreler
Kontrol	0.5	99.6
Betülin İK$_{50/2}$ uygulanan hücreler	19.7	79.6
Betülin İK$_{50}$ uygulanan hücreler	13.3	86.4
Sisplatin İK$_{50/2}$ uygulanan hücreler	0.8	99.2
Sisplatin İK$_{50}$ uygulanan hücreler	1.5	98.5

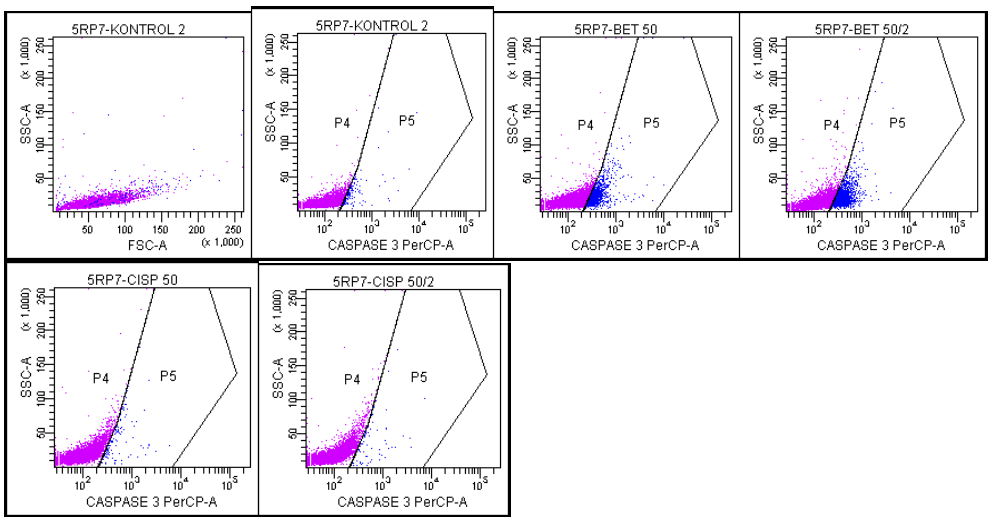
Ayrıca, kaspaz 3 aktivasyonunu araştırmak için 5RP7 hücreleri, 24 saat için betülin ve sisplatin ile İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ dozlarında (Betülin için 28.33 and 14.17 µg/mL ve sisplatin için 7.33 ve 3.67 µg/mL) inkübe edilmişlerdir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11). Akım sitometri analizi sonrası Kaspaz 3 pozitif hücre yüzdeleri betülinin İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ dozlarında 5RP7 hücreleri üzerinde % 13.3 ve 19.7 olarak ve kaspaz 3 negatif hücre yüzdeleri sırasıyla % 86.4 ve 79.6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11). Diğer taraftan sisplatinin İK$_{50}$ ve İK$_{50/2}$ dozlarında 5RP7 hücreleri üzerinde % 1.5 ve 0.8 olarak ve kaspaz 3 negatif hücre yüzdeleri sırasıyla % 98.5 ve 99.2 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.9. Betülin ve sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki (500, 125, 207.7 ve 21.5 µg/mL) aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizİ. Q3: Kaspaz 3 pozitif hücreler, Q4: Kaspaz 3 negatif hücreler



Şekil 4.10. Betülin ve sisplatinin HepG2 hücreleri üzerindeki (409.2, 500, 125 ve 38.4 µg/mL) aktif kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizi. Q3: Kaspaz 3 pozitif hücreler, Q4: Kaspaz 3 negatif hücreler.



Şekil 4.11. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerinde aktif Kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometri kuadran analizi. P4: Kaspaz 3 negatif hücreler, P5: Kaspaz 3 pozitif hücreler.

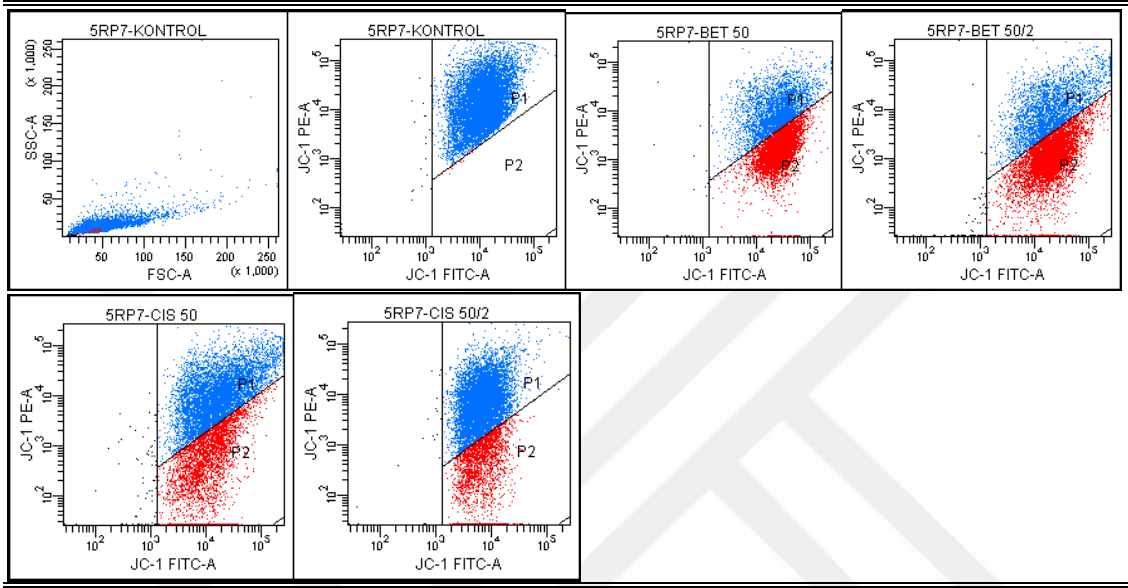
4.7. Membran polarizasyon/depolarizasyonun belirlenmesi

Mitokondriyal membran polarizasyon/depolarizasyonun belirlenmesi için 5RP7 hücreleri betülin ve sisplatinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ dozları ile 24 saat inkübe edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.12). Akım sitometri analizleri sonrası 5RP7 hücreleri üzerinde betülinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ derişimlerinde mitokondriyal membran depolarize hücre yüzdeleri sırasıyla % 65.0 ve 66.0 olarak bulunurken, bu bileşiklerin mitokondriyal membran polarize hücre yüzdeleri sırasıyla % 34.8 ve 32.5'dur. Sisplatinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ derişimlerinde mitokondriyal membran depolarize hücre yüzdeleri sırasıyla % 35.0 ve 22.8 olarak bulunurken, bu bileşiklerin mitokondriyal membran polarize hücre yüzdeleri sırasıyla % 64.4 ve 77.2 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. Betülin ve sisplatin uygulanan 5RP7 hücrelerinin aktif JC-1 aktivitesinin akım sitometri kuadran analiz yüzdeleri.

	5RP7	
	% Mitokondri Membranı polarize hücreler	% Mitokondri Membranı depolarize hücreler
Kontrol	99.4	0.3
Betülin $İK_{50/2}$ uygulanan hücreler	32.5	66.8
Betülin $İK_{50}$ uygulanan hücreler	34.8	65,0
Cisplatin $İK_{50/2}$ uygulanan hücreler	77.2	22.8
Cisplatin $İK_{50}$ uygulanan hücreler	64.4	35.0

Bu sonuçlara göre, betülin pozitif kontrol sisplatinden daha fazla miktarda mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olmuştur. Ancak bu etki doza bağımlı değildir.

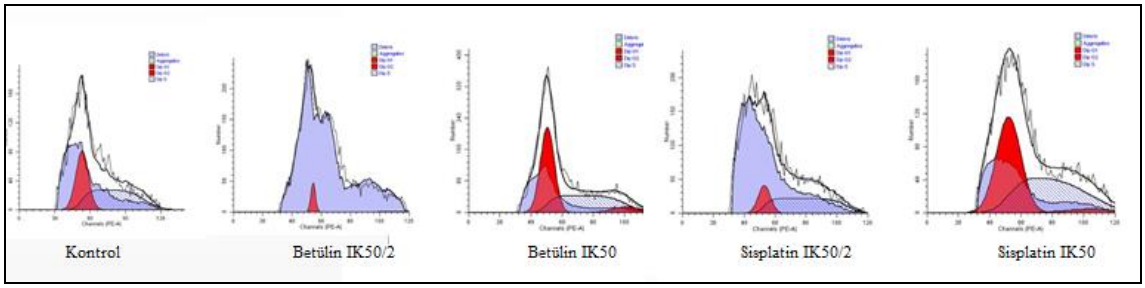


Şekil 4.12. Betülin ve sisplatinin 5RP7 hücreleri üzerindeki (µg/mL) mitokondriyal membran polarize/depolarize etkilerinin akım sitometri kuadran analizi. P1: mitokondriyal membran polarize hücreler, P2: mitokondriyal membran depolarize hücreler.

4.8. Hücre siklusu analizi

Hücre proliferasyonunun gelişimi üç majör kontrol noktasını içerir. Bunlar, G1/S, S and G2/M fazlarıdır (Ming et al. 2011). Çalışmamızda betülinin $İK_{50/2}$ dozunda %100 oranında bir G1 faz tutulumu gözlenmiştir. Ayıca $İK_{50}$ dozunda da % 49.5'lik bir G1 faz tutulumu bulunmaktadır. Bu değerler kontrol (% 42.7) ve sisplatine (25.9) kıyasla fazladır (Şekil 4.13). Elde edilen sonuçlar, betülinin proliferasyon üzerindeki inhibitör etkisinin hücre siklusu düzenlenme etkisi ile ilişkili olduğunu ve betülin 5RP7 hücrelerinin apoptozunu hücre siklusunun G0/G1 fazında indüklediğini gösterebilir (Takahaski et al. 2014). Apoptoz çoğunlukla prolifere olan hücrelerde bulunduğundan, geç G1 fazında hücrelerde rol alan moleküller apoptozun indüksiyonu için gereklidir. Hücre siklusu ve apoptoz arasındaki ilişki Kim ve ark. (2001) tarafından gösterilmiştir. Kaspaz 3 tümor

büyüme faktörü (TGFb1) ilavesi ile hücrelerde hücre siklusu tutulumu üzerinden RB, p21 ve p27'yi parçalamıştır ve TGF-b1 ile kaspaz-3 aktivasyonu hücre siklusu tutulumunun apoptosise dönüşümünü başlatabileceği görülmüştür (Alenzi, 2004).



Şekil 4.13. 5RP7 hücreleri betülin ve sisplatinin $İK_{50}$ ve $İK_{50/2}$ dozları ile 24 saat bekletildikten sonra hücre siklusu dağılımı analizi. Her örnek için 10.000 hücre analiz edilmiştir. Mavi renk debris, yeşil renk agregatları ve kırmızı renk G1 ve G2 fazlarındaki hücre yüzdelerini gösterir.

Sonuç olarak, bütün apoptotik deney sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, betülin her üç hücre hattında da apoptosisi indüklemiş gözükmektedir. Ancak, apoptosis indükleyici etkileri betülinin 5RP7 hücre hattında daha iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, betülin HepG2 hücrelerinin potansiyel bir DNA sentez inhibitörü olarak görülmektedir. Apoptotik etkisi ve DNA sentez inhibisyonu birbirinden bağımsız gözükmektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, HepG2 hücrelerinin 48 saatte 10 µg/mL derişimde betülin ile muamele edilmesinden sonra apoptozun Kaspaz 9 aracılıklı olarak indüklendiği gösterilmiştir (Yang vd., 2010). Ayrıca betülin bu dozda kaspaz 3'ü indüklemiş ve mitokondriyal membranda depolarizasyona neden olmuştur. Kaspaz 3 aktivasyonu florometrik metod ile mitokondriyal membranda depolarizasyonu ise floresan mikroskobi yöntemi gösterilmiştir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz değerler, literatürdeki çalışmalardaki kadar yüksek bulunmamıştır. Bu nedenle HepG2 hücrelerindeki apoptozun 24 saat inkübasyonda, yeterince kaspaz 3 aktivasyonu gösteremediğini ve hücre ölümü için farklı bir yolu da kullanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde betülinin A549 hücreleri üzerinde apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla akım sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. PI negatif ve Anneksin pozitif hücre yüzdeleri tespit edilmiş ve apoptotik etkilerinden dolayı ileri analizler gerçekleştirilmiştir

(Sung vd, 2009). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde betülin hem A549, HepG2 ve 5RP7 hücreleri üzerinde annexin V pozitif hücre yüzdelerine sahip bulunmuş ve ayrıca kaspaz 3 aktiviteleri A549 hücrelerinde daha fazla olmak üzere tespit edilmiştir. Ancak apoptoz indüklenen hücre yüzdeleri farklılık göstermektedir. Bu farklılıkların da hücrelerin pasaj sayılarındaki farklılıklarından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan literatür taramalarımızda betülinin 5RP7 üzerindeki apoptotik etkileri ile ilgili her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız özgündür.

Sonuç olarak, betülin 5RP7 hücreleri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkilere neden olmuştur. Bütün apoptotik deney sonuçlarını düşünerek, betülin 5RP7 hücre hattında apoptosisi indüklemiş gözükmektedir. Ancak, betülinin erken apoptozu indükleyici etkileri doza bağımlı iken, kaspaz 3 ve mitokondriyal membran depolarizasyon etkileri doza bağımlı değildir. Bu nedenle betülin *H*-ras aktif kanser türlerine karşı iyi bir antikanser ilaç adayı olarak düşünülebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

- Betülin molekülünün bakteriler ile gerçekleştirilen biyodönüşüm tepkimeleri sonucu saf metabolit elde edilememiştir.
- Betülin molekülünün antikanser etki çalışması, elde edilmesi muhtemel metabolitleri için karşılaştırma amaçlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen veriler, literatürdeki aynı çalışmalarla karşılaştırılmış ve bunun sonucunda değerler arasında farklılıklar olduğu bulunmuştur. Bu farklılıklar bize, hücre hatlarının pasaj sayılarındaki ve inkübasyon zamanındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.
- Önceki çalışmalarda betülinin sağlıklı hücre dizisine karşı sitotoksisitesi değerlendirilmemiştir. Bulgularımıza göre, sağlıklı hücre dizisine karşı (NIH/3T3) ise İK_{50} değerinin 62.5 µg/mL olduğu saptanmıştır. Çalışmamız bu noktada literatüre katkı sağlamıştır. Ayrıca, betülinin Sİ değerleri sırasıyla 30, 50 ve 223 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, yine betülinin antikanser aktivitesinin A549 ve HepG2 hücrelerine karşı seçici olmadığı ve sağlıklı hücrelere karşı sitotoksisitesinin etkinliğini sınırlandırdığı söylemek mümkündür. Ancak, betülin 5RP7 hücrelerine karşı seçici olarak sitotoksik etkilidir. Projede hedeflenen betüline ait antikanser aktivite tayini gerçekleştirilmiş ayrıca aktivitenin seçiciliği de ilk kez saptanarak yorumlanmıştır.
- Betülinin antikanser etkisinin apoptotik mekanizmaya dayandığı gösterilmiştir. A549 hücreleri üzerinde akım sitometrik analiz sonucunda betülin ve sisplatinin sırasıyla 207.7 ve 21.5 µg/mL derişimlerinde erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla %9.6 ve 8.0 olarak belirlenmiş, HepG2 hücreleri üzerinde ise erken ve geç apoptotik etkileri

sırasıyla %12.1 ve 32.3 olarak bulunmuştur. Ayrıca 5RP7 hücreleri üzerinde ise erken ve geç apoptotik etkileri sırasıyla İK50 değerinde % 65.4 ve %20 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında betülin 5RP7 hücrelerinde sisplatine kıyasla daha fazla apoptoza neden olmuştur. HepG2 hücreleri üzerinde betülin ve sisplatin için kaspaz 3 pozitif hücre yüzdeleri sırasıyla HepG2 hücreleri üzerinde %28.7 ve 4.1 olarak bulunmuştur. Bütün apoptotik deney sonuçları gözönünde bulundurulduğunda, betülin her üç hücre hattında da apoptosisi indüklemiş gözükmektedir.

- Betülinin antiproliferatif etkisinin literatürde belirtildiği gibi doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, betülin HepG2 hücrelerinin potansiyel bir DNA sentez inhibitörü olarak görülmektedir. Elde edilen deneysel veriler apoptotik etkisi ve DNA sentez inhibisyonunun birbirinden bağımsız olduğunu göstermiştir.
- Genotoksisite çalışmaları sonucunda, ilaç geliştirilme safhasının en önemli izlem testlerinden olan Ames test kriterlerine göre betülin bileşiğinin geliştirilme basamağından geri çekilmenin en önemli etkeni olan mutajenite göstermediği saptanmıştır. İlaç geliştirilme süreçlerinde, potansiyel mutajen ve karsinojen bileşiklerin belirlenmesinde öncül bir test olarak Ames testi ilaç güvenilirliği için erken safhadaki en önemli bileşen olarak sayılmaktadır (Flückiger-Isler vd, 2004; Thybaud vd, 2007; Greene vd, 2010). Çalışmamız betülin bileşiğinin genotoksisitesinin ortaya konması açısından da literatüre katkı sağlamıştır. Literatürde betüline ait biyolojik etkilerden bahsedilse de mutajeniteleri yeterince aydınlatılmamıştır. Ayrıca, bu çalışma ile betülinin mutajenitesi valide test yöntemi Ames ile belirlenerek hem literatüre katkı sağlanmış hem de ilaç geliştirilme süreçlerinin güvenilirlik araştırmasının en önemli bileşeni gerçekleştirilmiştir.
- Betülin 5RP7 hücrelerinin apoptozunu hücre siklusunun G0/G1 fazında indüklediği söylenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akalın Çiftçi, G., Temel, H.E., Ulusoylar Yıldırım, Ş., Kaplancıklı, Z.A., Altıntop, M.D. ve Genç, L. 2013, Apoptotic effects of some carbazole derivatives on lung carcinoma and glioma cell lines, Medicinal Chemistry Research, 22,8, 3751–3759.

Akihisa, T., Takamine, Y., Yoshizumi, K., Tokuda, H., Kimura, Y., Ukiya, M., Nakahara, T., Yokochi, T., Ichiishi, E., Nishino, H., 2002, Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products, Journal of Natural Products, 65, 3, 278-282.

Alakurtti, S., Maekelae, T., Koskimies, S., Yli-Kauhaluoma, J., 2006, Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29, 1, 1-13.

Alenzi, F.Q., 2004, Links between apoptosis proliferation and the cell cycle, British journal of biomedical science, 61,2, 99-102.

Ali-Seyed, M., Jantan, I., Vijayaraghavan, K., Bukhari, S. N. A., 2016, Betulinic acid: recent advances in chemical modifications, effective delivery, and molecular mechanisms of a promising anticancer therapy, Chemical Biology & Drug Design, 87, 4, 517-536..

Altıntop, M. D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Ilgın, S., Atli, Ö., Işcan, G., Kaplancikli,Z. A., 2012, Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 58,299-307.

Álvarez, Á. L., Habtemariam, S., Parra, F., 2015, Inhibitory effects of lupene-derived pentacyclic triterpenoids from *Bursera simaruba* on HSV-1 and HSV-2 in vitro replication, Natural Product Research, 29, 24, 2322-2327.

American Cancer Society, 2015, Global Cancer Facts and Figures 2015; American Cancer Society, Atlanta, 1-56 p

Armstrong, D. W., Yamazaki, H., 1986, Natural flavors production: A biotechnological approach, Trends in Biotechnology, 4, 10, 264-268.

Attwa, M. H., El-Etreby, S. A., 2015, Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma, World Journal of Hepatology, 7, 12, 1632-1651.

Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S., 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, Biotechnology Annual Review, 11, 127- 152.

Chandrasekaran, C.V., Sundarajan, K., David, K., Agarwal, A., 2010, In vitro efficacy and safety of poly-herbal formulations, Toxicology In Vitro, 24,3,885-97.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard, Second Edition, CLSI Document M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvani,USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], 2006,Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Sixteenth Informational Supplement, CLSI document M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvani,USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [formerly NCCLS], 2008, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard, Second Edition, CLSI Document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvani,USA.

Correa, G., Abreu, V.D.C., Martins, D., Takahashi, J.A., Fontoura, H.S., Cara, D.C., Alcântara, A.F.C. 2014, Antiinflamatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of Justicia acuminatissima (Acanthaceae), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6,*6, 75-81.

Cota, B. B., Oliveira, A. d. B. d., Souza-Filho, J. D. d., Braga, F. C., 2003, Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*, Fitoterapia, 74, 7-8, 729-731..

Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A., Brielmann H. L., 2006, Natural products from plants, 2.nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Dewick P. M., 2001, Medicinal natural products 'A Biosynthetic Approach', Second Edition, John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester

Faber, K., 2004, Biotransformations in Organic Chemistry, Fifth Edition, Springer-Verlag, Berlin, 454p.

Flückiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H.G., Engelhardt, G., 2004, Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 558,1–2, 181-197.

Fotso, G. W., Ntumy, A. N., Ngachussi, E., Dube, M., Mapitse, R., Kapche, G. D. W. F., Andrae-Marobela, K., Ngadjui, B. T., Abegaz, B. M., 2014, Epunctanone, a new benzophenone, and further secondary metabolites from *Garcinia epunctata* Stapf (Guttiferae), Helvetica Chimica Acta, 97, 7, 957-964.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Greene, N., Aleo, M.D., Louise-May, S., Price, D.A., Will, Y., 2010, Using An *in vitro* cytotoxicity assay to aid in compound selection for *in vivo* safety studies, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20, 17, 5308–5312.

Grishko, V. V., Nazarov, A. V., Tolmacheva, I. A., Tarasova, E. V., Ivshina, I. B., 2014, Chemical Conversions of Betulone Produced by Biotransformation, Chemistry of Natural Compounds, 50, 5, 857-861.

Grishko, V. V., Tarasova, E. V., Ivshina, I. B., 2013, Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66, Process Biochemistry, 48, 11, 1640-1644.

Hajati, R. J., Payamnoor, V., Bezdi, K. G., Chashmi, N. A., 2016, Optimization of callus induction and cell suspension culture of *Betula pendula* roth for improvedproduction of betulin, betulinic acid, and antioxidant activity, In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant, 52, 4, 400-407.

Hanson, J. R., 1995, An introduction to biotransformations in organic chemistry, Oxford, New York, Freeman/Spektrum, Bell&Bain Ltd., s.92.

Houck, K.A., Kavlock, R.J., 2008, Understanding mechanisms of toxicity: Insights from drug discovery research, Toxicology and Applied Pharmacology, 277,2, 163–178.

Kıvanç, M. ve Kaplan, M., 2001, Gıda katkı maddesi olarak kullanılan mentol'ün biyotransformasyon ile elde edilmesi, Anadolu Üniversitesi, Proje no 00 10 57, 60s.

Kouvelis, V.N., Wang, C., Skrobek, A., Pappas, K.M., Typas, M.A., Butt, T.M., 2011, Assessing the cytotoxic and mutagenic effects of secondary metabolites produced by several fungal biological control agents with the Ames assay and the VITOTOX(®) test, Mutation Research, 722,1,1-6.

Langdon, S. R., Mulgrew, J., Paolini, G. V., Hoorn, W. P. V., 2010, Predicting cytotoxicity from heterogeneous data sources with Bayesian learning, Journal of Cheminformatics, 2, 11, 1-18

Laszczyk, M., Jaeger, S., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A., Schempp, C. M., 2006, Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*), Planta Medica, 72, 15, 1389-1395.

Li, X.-D., Zhang, Y.-J., Han, J.-C., 2014, Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling, Tumor Biology, 35, 11, 11153-11158.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Li, Y., He, K., Huang, Y., Zheng, D., Gao, C., Cui, L., Jin, YH, 2010, Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells, Molecular Carcinogenesis, 49,7, 630-40.

Liu, J.-H., Yu, B.-Y., 2010, Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds, Current Organic Chemistry, 14, 14, 1400-1406.

Liu, J., Fu, M. L., Chen, Q. H., 2011, Biotransformation optimization of betulin into betulinic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100-6 cells, Journal of Applied Microbiology, 110, 1, 90-97.

Mai, H. D. T., Minh, H. N. T., Pham, V. C., Bui, K. N., Nguyen, V. H., Chau, V. M.,2011,LignansandotherconstituentsfromtherootsoftheVietnamesemedicinalplant *Pseuderanthemum palatiferum*, Planta Medica, 77, 9, 951-954.

Malikova, J., Swaczynova, J., Kolar, Z., 2008,Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids, Phytochemistry, 69,2, 418-426.

Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V., and Harborne, J. B., 1994, Natural products: their chemistry and biological significance, Longmann Sci. & Tech., Esse.

Mao, D.-B., Feng, Y.-Q., Bai, Y.-H., Xu, C.-P., 2012, Novel biotransformation of betulin to produce betulone by *Rhodotorula mucilaginosa*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 43, 6,825-829.

Ming-liang, F., Liu, J., Ya-chen, D., Yu, F., Ruo-si, F., Qi-he, C., Xiao-jie, L., 2011, Effect of ionic liquid-containing system on betulinic acid production from betulin biotransformation by cultured Armillaria luteo-virens Sacc cells, European Food Research, and Technology, 233, 507-515.

Miura, N., Matsumoto, Y., Miyairi, S., Nishiyama, S., Naganuma, A., 1999, Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells, Molecular Pharmacology, 56, 6,1324-1328.

Mosieniak, G., Sliwinska, M., Piwocka, K., 2006. "Curcumin abolishes apoptosis resistance of calcitriol-differentiated HL-60 cells", FEBS Letters, 580(19), 4653-4660.

Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Yolken, H. R., 1995, Manual of Clinical Microbiology, 6th, American Society for Microbiology Press, s.15-18.

Nelson, D. L., 2005, Biyokimyanın İlkeleri, (Çev.Editörü N. Kılıç), Palme Yayıncılık, 313, 771-816, 1152s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Olurinola, P. F., 1996, A laboratory manual of pharmaceutical microbiology, National Institute for Pharmaceutical Research and Development, s.69-105.

Özşen, Ö.,2017, Abiyetik Asit, Betulin, Hidroksi Diizoforon ve Oleik Asitin Biyotransformasyon Tepkimeleri ve Metabolitlerin İn Vitro Biyolojik Aktiviteleri, Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 103s.

Patocka, J., 2003, Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification, Journal of Applied Biomedicine, 1, 7 – 12, ISSN 1214-0287.

Pavlova, N. I., Savinova, O. V., Nikolaeva, S. N., Boreko, E. I., Flekhter, O. B., 2003, Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses, Fitoterapia, 74, 5, 489-492.

Pohjala, L., Tammela, P., Samanta, S. K., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P., 2007, Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays, Analytical Biochemistry, 362, 2,221-228.

Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J. S., Mazurek, A. P., 2005, In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides, Cancer Letters, 229, 1,67-75.

Po-wei, T., Kathlia, D.C.C.A., Chien-Chang, S., Consolacion, R.Y. 2012, Chemical constituents of Broussonetia luzonicus, *Pharmacognosy journal*, *4*,31, 1-4.

Pozharitskaya, O. N., Karlina, M. V., Shikov, A. N., Kosman, V. M., Makarov, V. G., Casals, E., Rosenholm, J. M., 2017, Pharmacokinetics and tissue disposition of nanosystem-entrapped betulin after endotracheal administration to rats, European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 42, 2, 327-332

Qi-he, C., Jing, L., Hai-feng, Z., Guo-qing, H., Ming-liang, F., 2009, The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi, Enzyme and Microbial Technology, 45, 3, 175-180.

Rajaguru, P., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., Subburam, V., 2000, Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system, Applied Microbiology and Biotechnology, 54, 2, 268-273.

Rastogi, S., Pandey, M. M., Rawat, A. K. S., 2015, Medicinal plants of the genus *Betula*-Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review, Journal of Ethnopharmacology, 159,62-83.

Ricci, M.S.,Zong, W.X., 2006,Chemotherapeuticapproaches for targetingcell deathpathways, Oncologist, 11,4, 342-357.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Roberts, S. M., Turner, N. J., Willets, A. J., Turner, M. K., 1995, Indroduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms, Cambdirge University Press, s.195.

Safayhi, H., Sailer, E.R., 1997, Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes, Planta Med. 63, 487—493.

Sinha, B. N., Bansal, S. K., Pattnaik, A. K., 2009, Phytochemical and antimicrobial activity of extracts, fractions and betulin, 7-methyl juglone obtained from *Diospyros paniculata*, Journal of Natural Remedies, 9, 1, 99-102.

Sultana, N., Saify, Z. S., 2013, Enzymatic biotransformation of terpenes as bioactive agents, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 28, 6, 1113-1128.

Sung, P. J., Hun, R. S., Ki, K. D., Gyun, L. J., Yook, L. Y., Sun, H. S., Won, K. S., Hill, P. J., 2009, Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry,Planta Medica, 75,2, 127-133.

Szakiel A., I.Wasiukiewicz, W.Janiszowska.,1995, Metabolism of [3-3H]oleanolic acid in the isolated Calendula officinalis leaf cells and transport of the synthesized glycosides to the cell wall and the extracellular space, Acta Biochim Pol 42:25-29.

Takahashi, K., Chiba, A., & Ando, A., 2014, Modifications of wave and plasma structures by a mechanical aperture in a helicon plasma thruster, *Plasma Sources Science and Technology*, *23*,6, 064005.

Teisseire P. J., 1994, Chimie des Substances Odorantes, Tercüme: Peter A. Cadby, VCH Publishers, New York.

Telefoncu, A., Pazarlıoğlu, N., 2010, Biyoteknoloji: Temel prensipler ve uygulamalar, İzmir Birleşik Matbaacılık, s.605.

Telefoncu, A., 1995, Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları Ege Üniversitesi Basımevi, 152.

Thayyullathil, F., Chathoth, S., Hago, A., 2008, Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and –independent apoptosis in L929 cells, Free Radical Biology and Medicine, 45,10, 1403-1412.

Thi Mai, H.D., Thi Minh, H.N., Pham, V.C., Nga Bui, K., Nguyen, V.H., Chau, V.M., 2011, Lignans and Other Constituents from the Roots of the Vietnamese Medicinal Plant Pseuderanthemum palatiferum, Planta Medica, 77,9, 951–954.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Thybaud, V., Aardemab, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kirkland, D., Macgregor, J.T., Marzin, D., Ohyamaj, W., Schuler, M., Suzuki, H. ve Zeiger, E., 2007, Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 627,1, 41–58.

Vázquez, L.H., Palazon, J., Ocaña, A.N., 2012, The pentacyclic triterpenes α, β-amyrins: a review of sources and biological activities, phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health, ISBN 978-953-51-0296-0, Hard cover, 538 pages.

Yang, L., Taiyi, S. J., Chang, G., Qing, L., Ying-Hua, J., 2010, Caspase-9 activation critical for betulin-induced apoptosis of human hepatoma cells, Chemical Research in Chinese Universities, 26,5, 792-797.

Yim, N.-H., Jung, Y. P., Kim, A., Kim, T., Ma, J. Y., 2015, Induction of apoptotic cell death by betulin in multidrug-resistant human renal carcinoma cells, Oncology Reports, 34, 2, 1058-1064.

Yoshida, E. H., Tribuiani, N., Sabadim, G., Neto, M. D. A., Oshima-Franco, Y., Varanda, E. A., 2016, Evaluation of betulin mutagenicity by *Salmonella*/Microsome test, Advanced pharmaceutical bulletin, 6, 3, 443-447.

Zhao, C.C., Shao, J.H., Fan, J.D., 2012,A new triterpenoid with antimicrobial activity, Chemistry of Natural Compounds, 48,5, 717-718.