

# TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

Antikanser Gaziantep

PROJE ADI

Gaziantep Yöresine Özgü Bitkilerin Antikanser Özelliklerinin  
Araştırılması

BAŞVURU ID

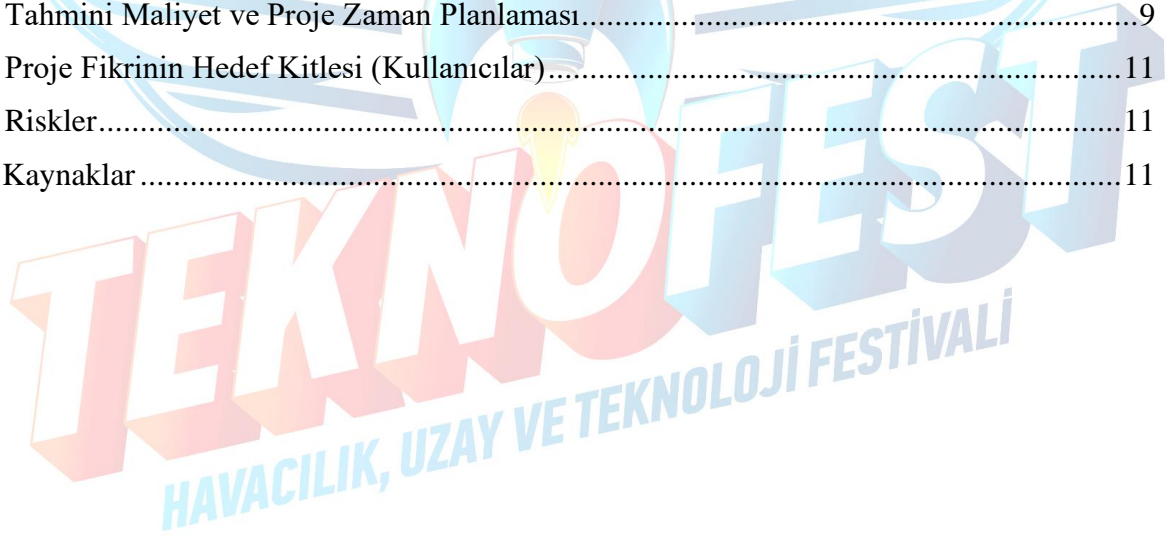
#30622

KATEGORİ

.....

## İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....	3
2. Problem/Sorun .....	3
3. Çözüm.....	4
4. Yöntem .....	5
4.1. Literatür Özeti.....	5
4.2. Bitkilerin Temini ve Ekstraksiyonu .....	5
4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi .....	6
4.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi .....	6
4.5. Serbest Radikal Yakalama Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	6
4.6. Hücre Hatları.....	6
4.7. Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	7
4.8. MTT Testi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....	7
4.9. Bitki Ekstraktlarının İçeriğinin Kromatografik Yöntemle Belirlenmesi.....	8
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü .....	8
6. Uygulanabilirlik .....	8
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	9
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar).....	11
9. Riskler.....	11
10. Kaynaklar .....	11



## 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Göğüs, kolon, yumurtalık kanserleri benzer yollarla gelişen epitel doku kanserleri olup en yaygın görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Yüksek vaka ve ölüm oranlarına sahip olan bu kanser türlerinin tedavisindeki başarı gelişmiş yöntemlere rağmen sınırlıdır. Kanser tedavisinde yaygın olarak kemoterapi ilaçları kullanılmaktadır. Kimyasal sentez ürünü kemoterapi ilaçlarının kanıtlanmış birçok ağır yan etkisi vardır ve en önemlisi de normal hücrelere zarar vermeleridir. Bu nedenle kanser hücrelerine spesifik, ucuz ilaçlara ihtiyaç vardır. Bitkilerde doğal olarak üretilen fenolik ve flavonoidler gibi antioksidan maddeler son yıllarda antikanser özellikleri ile dikkat çekmektedir. Ülkemizin zengin bitki çeşitliliği yeni antikanser ilaçların bulunması için bir kaynak olabilir. Sunduğumuz projede Gaziantep yöresinde halk tarafından şifalı bitkiler olarak bilinen zahter, menengiç ve meyan kökünün yaygın görülen göğüs, kolon, yumurtalık kanserlerine etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu bitkilerin bazı faydaları bilimsel olarak kanıtlanmış olsa da antikanser aktiviteleri neredeyse hiç araştırılmamıştır. Bu amaçla öncelikle bu bitkilerin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonları yapılır. Elde edilen ekstraktlardaki fenolik ve flavonoidlerin miktarı ile antioksidan aktiviteleri belirlenir. Bitki ekstraktlarının in vitro koşullarda normal ve kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkilerini incelemek için MTT testi yapılır. Son olarak kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösteren bitki ekstraktlarının kimyasal bileşimi belirlenir. Antikanser etki gösteren bitkilerden üretilecek ilaçlar, kimyasal sentez ürünü kemoterapi ilaçlarına alternatif olarak kanser hastalarına umut ışığı olacaktır.

## 2. Problem/Sorun

Göğüs, kolon ve yumurtalık kanserleri hem dünyada hem de ülkemizde yaygın görülmektedir. Göğüs kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kadınlara konulan kanser tanıları ve kanserle ilişkili ölümler arasında en sık rastlanandır. Kadınlarda görülen kanser vakalarının %25'inden ve kansere bağlı ölümlerin %15'inden sorumludur <sup>[1]</sup>. Kolon kanseri, gastrointestinal kanserler içinde en çok görülen kanser türüdür. Kadınlarda en sık görülen ikinci, erkeklerde üçüncü kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerde daha çok görülmekle birlikte, ölüm oranları az gelişmiş ülkelerde daha yüksektir <sup>[2]</sup>. Yumurtalık kanseri genellikle geç teşhis edilmesi nedeniyle en ölümcül jinekolojik kanser türüdür. Geleneksel kemoterapi ilaçlarına karşı bir direnç fenotipi edinilmesi nedeniyle tekrarlayan, ilerleyici bir hastalıktır. Dünya çapında kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin beşinci önde gelen nedenidir <sup>[3]</sup>.

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, kimyasal olarak türetilmiş ilaçlar ya da cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu geleneksel tedaviler ciddi yan etkilere sahiptir. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları, kan yoluyla vücuda dağılarak kanser hücrelerini öldüren ya da kanser hücrelerinin büyümesini durduran ilaçlardır. Kemoterapi ilaçlarının neredeyse tamamı normal hücrelere karşı önemli derecede toksisiteye sahiptir ve kanser hücrelerine etki ederken normal hücrelere de etki ederek çeşitli yan etkilere neden olur. Göğüs, kolon, yumurtalık kanserlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları da saçlar, kemik iliği ve kan, gastrointestinal sistem, kalp ve akciğerlerde ciddi yan etkilere sahiptir ve genellikle hastalığın seyrini hafifletmek amacıyla verilir <sup>[4]</sup>. Bu nedenle mevcut kemoterapi

ilaçlarına alternatif olacak, tedavide daha etkili, yan etkisiz ve hastanın yaşam kalitesinin arttıracak antikanser maddelerin keşfedilmesine ihtiyaç vardır.

### 3. Çözüm

Bitkiler yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve günümüzde bile yeni ilaçlar keşfetmek için zengin bir kaynaktır. Bitki sekonder metabolitleri olan fenolik ve flavonoidlerin diğer antioksidan molekül ve enzimlerle birlikte, antioksidan savunma sistemine katkı yaparak pek çok hastalığa karşı korunma sağladıkları düşünülmektedir. Meyve ve sebzeleri düzenli olarak tüketen insanların kanser ve kalp hastalıklarına yakalanma riskinin azalması bunu desteklemektedir. Diğer yandan, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ilaçların bir kısmının aktif bileşenleri de bitkilerden elde edilmektedir. Bu ilaçlar genellikle yan etkileri olmayan ve tedaviye yanıt verme olasılığı yüksek ilaçlardır <sup>[5]</sup>. Dolayısıyla göğüs, kolon ve yumurtalık kanserlerinin tedavisinde kullanılabilecek alternatif ilaçlar keşfetmek için bitkiler üzerinde araştırmalar yapılabilir.

Son yıllarda bitkilerin biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar hız kazandıysa da çoğu bitkinin biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları yeterince aydınlatılmamıştır. Yaklaşık olarak 300-500 bin bitki türünden sadece %15'i fitokimyasal özellikleri bakımından, %6'sı farmakolojik özellikleri bakımından çalışılmıştır. İçlerinde antikanser potansiyelde olan çoğu bitki kökenli ilacın henüz keşfedilmediğine inanılmaktadır <sup>[1]</sup>. Dolayısıyla bitkilerdeki fenolik ve flavonoidler kanserin önlenmesi ve ilerlemesine karşı terapötik uygulamalar için bir kaynak olabilir. Ülkemiz zengin florasıyla çok sayıda tıbbi ve aromatik bitkiye sahiptir. Gaziantep yöresinde doğal olarak yetişen zahter, menengiç ve meyan kökü, halk tarafından gıda olarak ve tıbbi amaçlarla yaygın tüketilen bitkilerdir.

*Thymbra spicata* L., Doğu Akdeniz ülkelerinde yetişen yabani bir tıbbi bitkidir. Ülkemizde yetişen iki farklı türünden *T. spicata* var. *spicata* Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde "Zahter" veya "Sater" olarak bilinir <sup>[6]</sup>. Zahter, ülkemizde baharat ve halk ilacı olarak sıklıkla kullanılan ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Literatürde antifungal, antimikrobiyal, antibakteriyel, antioksidan ve sitotoksik aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir <sup>[7]</sup>.

Menengiç (*Pistacia terebinthus*), Akdeniz Bölgesi'ne özgü bir bitki olup Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgesi'nin dağlık kırsal kesimlerinde ekolojik olarak yetişir <sup>[8]</sup>. Menengiç; mide ağrısı, ülser, diyabet, idrar ve solunum yolu hastalıkları, astım, ateş, iltihap tedavisi ile enfeksiyon giderici, kan basıncını düşürücü, sakinleştirici, böcek öldürücü olarak ve güneş çarpmasına karşı kullanılmaktadır <sup>[8, 9]</sup>. Antibakteriyel özellik gösterdiği, damar sertliği ve karaciğer hastalıklarında etkili olduğu belirlenmiş ve enzimatik aktiviteleri üzerine çalışmalar yapılmıştır <sup>[9]</sup>.

Meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde doğada yaygın bir şekilde yetişir. Dış satımını yaptığımız başlıca tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alır <sup>[10]</sup>. Karaciğer hastalıkları, solunum ve sindirim sorunları ile diyabette kullanılmaktadır <sup>[11]</sup>.

Gaziantep yöresinde yaygın bulunan bu bitkilerin sağlığa bazı faydaları bilimsel olarak kanıtlanmış olsa da antikanser aktiviteleri olup olmadığı yeterince bilinmemektedir. (Yapılan çalışmalardan Yöntem kısmında bahsedilmiştir.) Bu bitkilerin ülkemizde ve dünyada yaygın görülen göğüs, kolon, yumurtalık kanserlerinde antikanser aktiviteleri belirlenirse tedavide kullanılabilebilirler. Bu doğrultuda sunduğumuz projede öncelikle bitkilerin çeşitli çözücülerle



ekstraksiyonu yapılarak bitkilerdeki fenolik ve flavonoidler çözücüye geçirilir. Farklı çözücüler kullanarak aynı bitkiden farklı profillere sahip ekstraktlar elde edilir. Çözücüler buharlaştırılır ve bitki metabolitleri saflaştırılır. Saflaştırılan bitki ekstraktlarında kolorimetrik yöntemle fenolik ve flavonoid madde miktarı tayinleri yapılır ve serbest radikal yakalama aktiviteleri belirlenir. Serbest radikaller başta kanser olmak üzere birçok hastalığın oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır ve bitkilerdeki fenolik ve flavonoidler antioksidan özellikleri ile bu maddeleri yok eder. Ardından bitki ekstraktlarının in vitro koşullarda normal ve kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlenir. Normal hücrelere zarar vermeyen ama kanserli hücrelerde sitotoksik etki gösteren bitki ekstraktları tedavide kullanıma uygun olacaktır. Son olarak sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi analizi yapılarak etkili ekstraktların kimyasal bileşimi kalitatif ve kantitatif olarak belirlenir.

## 4. Yöntem

### 4.1. Literatür Özeti

Zahterin fenolikler bakımından zengin olduğu, antioksidan özellikte olduğu ve ilaç endüstrisinde kullanılabileceği belirtilmiştir [12]. Zahterin etanol ekstraktının antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik özelliklerinin araştırıldığı çalışmada MCF-7 hücre hattında 340 µg/mL IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu, PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde etkili olmadığı belirlenmiştir [13]. Başka bir çalışmada *T. spicata* su-alkol ekstraktının SK-Mes-1 akciğer kanseri hücre hattında IC<sub>50</sub> değeri 110 µg/mL olarak belirlenmiştir [14].

*P. terebinthus* (menengiç) ve diğer bazı maki türlerinin fenolik içeriğinin ticari antioksidan üretimine uygun olduğu belirlenmiştir [15]. Başta *P. lentiscus* olmak üzere farklı *Pistacia* türlerinin antikanser aktivitesi olduğu bilinmektedir [9]. Ancak ülkemizde yetişen menengiç türünün sitotoksik ve antikanser aktivitesi yeterince bilinmemektedir.

Meyan kökündeki fenolik, flavonoid ve diğer çeşitli metabolitlerin iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [16]. Meyan kökü ekstraktının T47D göğüs kanseri hücre hattında metastaz baskılayıcı NM23 geninin ifadesini arttırdığı [17]; HepG2 karaciğer kanseri hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği [18]; SW872, SW982, HS 39.T, HS 5.T, HL-60, M14WM, MCF-7, HT29 kanser hücre hatlarında proliferasyonu engellediği belirlenmiştir [19].

### 4.2. Bitkilerin Temini ve Ekstraksiyonu

Bitkiler yerel satıcılardan temin edilir ve gerekiyorsa kurutulur. Kurutma ile bitkilerdeki enzimler etkisiz hale getirilir. Kurutma işlemi oda sıcaklığında, güneş görmeyen yerde yapılır. Kurutulmuş bitkiler öğütülerek toz haline getirilir. İlgili literatürde genellikle klasik çözücü ekstraksiyonu kullanıldığı görülmüş ve bu yöntem seçilmiştir. Toz haline getirilen bitkiler 1:10 (w/v) oranında çözücü (metanol, etanol, aseton, etil asetat, kloroform) ile karıştırılarak 24 saat oda sıcaklığında çalkalamalı koşullarda ekstrakte edilir. Ardından örnekler filtre kağıdından (Whatman No.1) süzülür. Çözücüler 40°C'de vakumlu evaporatörde uçurularak örnekler konsantre edilir. Elde edilen ekstraktlar -20°C derin dondurucuda saklanır ve analizler için DMSO ile çözümlenerek kullanılır [5, 20].

### 4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu çözeltisi ile verdiği mavi rengin spektrofotometrede ölçümü ile saptanır. Analizlerde standart olarak gallik asit kullanılır. Deney tüplerine 1'er ml bitki ekstraktlarından konur ve üzerlerine 0,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilir. 3 dk inkübasyondan sonra nötralizasyon için 3 ml %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenir. Örnekler 2 saat inkübe edilir. UV spektrofotometre ile 760 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülür. Gallik asitle çizilen standart grafiğine göre toplam fenolik içerik, gram başına mg gallik asit eşdeğerleri olarak ifade edilir [21].

### 4.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı, kateşin eşdeğeri olarak belirlenir. 0,5 ml bitki ekstraktı saf suyla 4 ml'ye tamamlanır. Ardından 0,3 ml %5'lik NaNO<sub>2</sub> ve 0,3 ml %10'luk AlCl<sub>3</sub> çözeltileri ilave edilerek oda koşullarında 5 dk inkübe edilir. 2 ml 1 M NaOH eklenip karıştırılır. Elde edilen pembe renkli karışımların 510 nm dalga boyundaki absorbans değerleri UV spektrofotometrede ölçülür. Kateşinle çizilen standart grafiğine göre toplam flavonoid madde miktarı, gram başına µg kateşin eşdeğerleri olarak ifade edilir [5].

### 4.5. Serbest Radikal Yakalama Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının serbest radikalleri yakalama etkinliği, antioksidan aktivitelerini belirtir. Bu amaçla DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali kullanılır. 25 mg/l DPPH-metanol çözeltisi hazırlanır. 3,9 ml DPPH çözeltisi üzerine 100 µl bitki ekstraktı ilave edilir. Bitki ekstraktlarının derişimleri 1, 5, 25, 50 ve 100 mg/ml'dir. Karışım oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra absorbanslar 517 nm'de köre karşı UV spektrofotometrede okunur. Kontrol olarak, 4 ml DPPH çözeltisi kullanılır. DPPH çözeltisinin mor renginin açılması esasına dayanan bu analizde absorbans azalır ve geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesini gösterir. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanır [22].

$$\% \text{ Aktivite} = [(Kontrol_{ABS} - \text{Örnek}_{ABS}) / Kontrol_{ABS}] \times 100$$

### 4.6. Hücre Hatları

Bitki ekstraktlarının epitel doku kanserlerinde in vitro etkilerinin araştırılması için normal (sağlıklı) hücre hatları ile farklı özelliklerde kanser hücre hatları seçilir:

Normal kolon hücre hattı: CCD-18Co

Kolon kanseri hücre hatları: Caco-2 (primer kolorektal adenokarsinom hücre hattı), SW620 (metastatik kolorektal adenokarsinom hücre hattı)

Normal yumurtalık hücre hattı: OSE

Yumurtalık kanseri hücre hatları: A2780 (sisplatin ilacı direnci olmayan hücre hattı), OVCAR3 (sisplatin ilacına dirençli hücre hattı)

Normal göğüs hücre hattı: MCF-12F

Göğüs kanseri hücre hatları: MCF-7 (östrojen reseptörü pozitif hücre hattı), MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif hücre hattı)

CCD-18Co, Caco-2, MCF-12F, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları DMEM besi yerinde; SW620, A2780 ve OVCAR3 hücre hatları RPMI besi yerinde; OSE hücre hattı Prigrow besi yerinde kültüre edilir. Tüm besi yerleri %10 FBS, 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içerir. Tüm hücre hatları 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeriğine sahip bir inkübatörde kültüre edilir [2, 3, 23].

#### 4.7. Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre sayımı ve hücre canlılığının belirlenmesi için Tripan Blue yöntemi kullanılır. Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu %80-90 düzeyine ulaştığında besi yeri atılarak hücrelerin üzerine 4 ml tripsin-EDTA eklenir. Flasklar 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 4-6 dk inkübe edilir. Hücreler flask yüzeyinden kalktıktan sonra 4 ml besi yeri içeren santrifüj tüpüne aktarılır ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılıp hücrelerin üzerine 2 ml PBS (fosfat tamponlu tuz) çözeltisi eklenir. Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak, 50 µl tripan blue ile karıştırılır. Karışım 5 dk inkübe edilir. Karışımdan thoma lamına 10 µl aktarılarak sayım yapılır. Canlı hücreler parlak görünürken ölü hücreler maviye boyanır. Hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır [20].

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{Sayım sonucu} \times 10^4 \times 2$$

#### 4.8. MTT Testi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan MTT (3-(4,5)-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yönteminden yararlanılır. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat dehidrogenaz enziminin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazan tuzları oluşturmaya dayanır. Formazan oluşumu, yalnızca canlı hücrelerde görülür ve artan absorbans değeri yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. 96 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 200 µl besi yeri konur ve 7500 hücre ekilir. Hücreler 24 saat 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilir. 24 saat sonra besi yeri uzaklaştırılır ve DMSO'da çözülerek hazırlanan farklı derişimlerdeki (1-10-25-50-100-250-500-1000 µg/ml) bitki ekstraktları ilave edilir. Bu derişimlere literatür taraması yapılarak karar verilmiştir. Kontrol grubundaki hücreler %1 DMSO ile muamele edilir. Hücreler 24 ya da 48 saat inkübe edilir. Sürenin sonunda, her kuyucuğa 100 µL MTT çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılır. 4 saat sonunda formazan kristallerini çözmek için kuyuculardaki çözelti alınır ve 300 µl DMSO ilave edilir. 15 dk inkübasyondan sonra absorbanslar ELISA plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda belirlenir. Kontrol grubu okutularda elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınır ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edilir. Bitki ekstraktı uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlanır ve yüzde canlılık değerleri hesaplanır. Bu test üç kez tekrarlanır. MTT deneyleri sonucunda IC<sub>50</sub> değerleri Graphpad programı ile hesaplanır [22].



#### 4.9. Bitki Ekstraktlarının İçeriğinin Kromatografik Yöntemle Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarındaki fenolik ve flavonoid madde içeriğini belirlemek amacıyla LC-ESI-MS<sup>2</sup> ile kalitatif ve kantitatif analizi yapılır. Bitki ekstraktları 10 mg/ml derişimde HPLC dereceli metanolde çözülür. 0,45 µm PTFE membran filtreden geçirilir ve 10 µl örnek sisteme enjekte edilir. HPLC sistemi, vakumlu gaz giderici, otomatik örnekleyici, ikili pompa ve diyot dizisi dedektöründen oluşur. 150x3,0 mm ve 5 µm partikül boyutuna sahip ters faz C18 kolonu ile 4x3,0 mm koruyucu kartuş kullanılır. Mobil faz olarak su-formik asit çözeltisi (100:0.1, v/v) ile CH<sub>3</sub>CN kullanılır. Gradyan; a) başlangıç mobil fazı %10 CH<sub>3</sub>CN; b) 0±25 dk aralığında %10'dan %25'e lineer artan CH<sub>3</sub>CN; c) 25±30 dk aralığında %25 CH<sub>3</sub>CN; d) 30-40 dk aralığında %25'ten %50'ye lineer artan CH<sub>3</sub>CN; e) 40-42 dk aralığında %50'den %100'e lineer artan CH<sub>3</sub>CN; f) 42-47 dk aralığında %100 CH<sub>3</sub>CN şeklindedir. Sonraki 7 dk'da CH<sub>3</sub>CN yüzdesi başlangıç koşullarına döndürülür. Akış hızı 0,4 ml/dk'dır. HPLC sistemi elektrosprey arayüzü ile donatılmış bir iyon tuzağı kütle spektrometresine (ESI-MS) bağlanarak MS<sup>2</sup> kütle spektrometre analizi yapılır [24].

#### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Yaptığımız literatür taramasında Gaziantep yöresinde yetişen ve halk tarafından şifalı olduğu için tüketilen zahter, menengiç ve meyan kökü bitkilerinin antikanser aktivitelerinin yeterince araştırılmadığını gördük. Diğer yandan yapılan çalışmalarda bitki ekstraktlarının normal hücrelere etkisinin incelenmemesi önemli bir eksiklikti. Bitki ekstraktlarının ilaç olarak kullanılabilmesi için kanserli hücrelere seçici olarak etki etmesi ama normal hücrelere zarar vermemesi gerekir. Sunduğumuz projede bunu dikkate alarak normal ve kanser hücre hatları seçtik. Ayrıca seçtiğimiz kanser hücre hatlarını metastaz yapmış/yapmamış, ilaç dirençli olan/olmayan ve östrojen reseptörü pozitif/negatif olanlar arasından seçtik. Böylece bitki ekstraktlarının antikanser etkileri olduğu belirlenirse elde edilen sonuçlar hastalığın seyrinde ve tedavisinde dikkate alınan bu faktörler bakımından yorumlanabilir. İlave in vitro ve in vivo çalışmalar yapılabilir. Bütün bu aşamaların başarılı olması sonucunda Gaziantep yöremizde yaygın bulunan bu bitkilerden kanser ilacı üretilebilir. Projemiz bütün bunların ilk basamağını oluşturması bakımından yenilik sağlayacaktır.

#### 6. Uygulanabilirlik

Sunulan proje gerekli ekipmana sahip bir laboratuvarda deneyimli kişiler tarafından gerçekleştirilebilir. Bitki ekstraktlarının kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksik etki gösterdiği belirlenirse proje ticari bir ürüne dönüştürülebilir. Yapılacak ileri çalışmalarda öncelikle bitki ekstraktlarının etki mekanizması belirlenerek hastalığın seyrini nasıl etkilediği çözümlenebilir. Bunun için in vitro koşullarda bitki ekstraktlarının kanser yollarına etkisi araştırılabilir. Sonraki aşamada in vivo hayvan deneyleri yapılarak kanserli hayvanlarda doza bağımlı iyileşme süreci, başka ilaçlarla ve gıda ile etkileşimler incelenebilir. Son olarak insanlar üzerinde denemeler yapılabilir. Bütün bu aşamalar olumlu sonuçlandığı takdirde bu bitkilerden ucuz ve etkili kanser ilacı üretilebilir ve ülke ekonomisine katkı sağlanabilir.



Projede karşılaşılabilecek riskler; bitki ekstraktlarının göğüs, kolon, yumurtalık kanserlerinde etkisiz olması ya da normal hücrelerde sitotoksik etki göstermesi olabilir. Bu durumda; 1) kullanılan bitki ekstraktı derişimleri değiştirilebilir, 2) farklı çözücüler ile farklı bileşimlerde bitki ekstraktları elde edilip deneyler tekrar edilebilir, 3) farklı hücre hatları seçilerek deneyler tekrar edilebilir. Kullanılan analiz yöntemlerinin yetersiz kalması durumunda farklı bilimsel yöntemler uygulanabilir.

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Bu projenin gerekli teçhizat altyapısına sahip olan bir araştırma merkezinde gerçekleştirileceği düşünülerek sarf malzemeler dikkate alınmıştır. Projede kullanılacak sarf malzemelerin fiyatları aşağıdaki tabloda listelenmiştir:

Sarf Malzeme	Adet	Birim Fiyat	Toplam Fiyat
Zahter, menengiç, meyan kökü	1 paket	100,00 TL	100,00 TL
Metanol	1 Litre	256,20 TL	256,20 TL
Etanol	1 Litre	306,20 TL	306,20 TL
Aseton	1 Litre	636,84 TL	636,84 TL
Etil asetat	1 Litre	1354,20 TL	1354,20 TL
Kloroform	1 Litre	1451,80 TL	1451,80 TL
Whatman No.1 filtre kağıdı	1 paket	438,00 TL	438,00 TL
DMSO	50 ml	596,60 TL	596,60 TL
Folin-Ciocalteu çözeltisi	100 ml	623,45 TL	623,45 TL
Gallik asit	100 g	971,15 TL	971,15 TL
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	500 g	320,85 TL	320,85 TL
Kateşin analitik standart	10 mg	2781,60 TL	2781,60 TL
NaNO <sub>2</sub>	100 g	433,10 TL	433,10 TL
AlCl <sub>3</sub>	100 g	291,60 TL	291,60 TL
NaOH	500 g	318,45 TL	318,45 TL
DPPH	1 g	1232,20 TL	1232,20 TL
CCD-18Co hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
Caco-2 hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
SW620 hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
OSE hücre hattı	1 vial	15982,00 TL	15982,00 TL
A2780 hücre hattı	1 vial	11065,40 TL	11065,40 TL
OVCAR3 hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
MCF-12F hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
MCF7 hücre hattı	1 vial	7259,00 TL	7259,00 TL
DMEM 500 ml	24 adet	270,00 TL	6480,00 TL
RPMI 500 ml	12 adet	303,00 TL	3636,00 TL
Prigrow medium 500 ml	2 adet	1921,50 TL	3843,00 TL
FBS 500 ml	4 adet	4175,00 TL	16700,00 TL
L-glutamin	25 g	744,20 TL	744,20 TL

Penisilin-streptomisin	100 ml	341,60 TL	341,60 TL
Flask 175 cm <sup>2</sup> 50 adet	1 paket	4184,60 TL	4184,60 TL
Steril petri 500 adet	1 paket	1898,30 TL	1898,30 TL
Tripan blue	25 g	645,40 TL	645,40 TL
Tripsin-EDTA 500 ml	1 adet	630,75 TL	630,75 TL
PBS 500 ml	24 adet	230,25 TL	5526,00 TL
MTT formazan	1 g	1964,20 TL	1964,20 TL
96 kuyucuklu plaka 48 adet	1 paket	7088,20 TL	7088,20 TL
0,45 µm PTFE membran filtre	1 paket	2842,60 TL	2842,60 TL
150x3,0 mm, 5 µm ters faz C18 kolonu	1 adet	8857,20 TL	8857,20 TL
4x3,0 mm koruyucu kartuş	1 adet	2501,00 TL	2501,00 TL
CH <sub>3</sub> CN	2,5 L x 4 adet	3708,80 TL	14835,20 TL
Formik asit	2,5 L x 4 adet	1439,60 TL	5758,40 TL
Serolojik pipet 25 ml	5 paket	1561,60 TL	7808,00 TL
Serolojik pipet 5 ml	5 paket	1293,20 TL	6466,00 TL
Pipet ucu 1000 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
Pipet ucu 100 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
Pipet ucu 10 µl	1 paket	3525,80 TL	3525,80 TL
50 ml santrifüj tüpü	10 paket	172,66 TL	1726,60 TL
15 ml santrifüj tüpü	10 paket	73,14 TL	731,40 TL
1,5 ml santrifüj tüpü	2 paket	97,60 TL	195,20 TL
<b>Toplam :</b>			<b>197768,30 TL</b>

Projemiz 200000,00 TL altında bir fiyatla gerçekleştirilebilir. Bu bakımdan bilimsel bir araştırma projesi için oldukça düşük fiyatlıdır. Hücre hatları yurt içinde bu hücre hatları ile çalışmalar yapan bilim insanlarından temin edilerek maliyet çok daha fazla düşürülebilir.

Proje 12 aylık bir süreçte tamamlanabilir. Buna göre proje takvimi ve iş paketleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Aylar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. iş paketi: Sarf malzemelerin temini	X	X										
2. iş paketi: Bitkilerin temini ve ekstraksiyonu			X									
3. iş paketi: Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarının belirlenmesi				X								
4. iş paketi: Serbest radikal yakalama aktivitelerinin belirlenmesi					X							

5. iş paketi: Hücre hatlarının çoğaltılmaya başlanması ve canlılığının sürdürülmesi					X	X	X					
6. iş paketi: Hücre sayımı ve hücre canlılığının belirlenmesi ve MTT testi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi						X	X	X				
7. iş paketi: Bitki ekstraktlarının içeriğinin kromatografik yöntemle belirlenmesi									X	X	X	
8. iş paketi: Projenin sonuçlandırılması												X

İş paketleri “yöntemde” yer alan çalışmalara göre oluşturulmuş ve detaylı olarak anlatılmıştır.

### 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Projemizin hedef kitleleri kanser hastalarıdır. Projemiz sonucunda bitki ekstraktlarının potansiyel birer antikanser ilaç olduğu belirlenirse gerekli çalışmalar yapılarak farklı ilaç formları piyasaya sürülebilir. Bu bitki ekstraktları doğrudan tedavide kullanılabilmesi gibi diğer kemoterapi ilaçları ile etkileşimleri bulunmazsa tamamlayıcı tedavilerde de kullanılabilir. İleri teknolojik yöntemlerle hedef yönelimli ilaçların veya antikanser aktiviteyi arttırmak üzere salınımı kontrol eden nano-ilaçların geliştirilmesinde kullanılabilir ve etkinliği düşük dozlarda bile artırılabilir. Sonuç olarak tedavisi zor ve uzun süren, ayrıca psikolojik olarak da insanları fazlasıyla olumsuz etkileyen kanser hastalığının yan etkisiz tedavisi mümkün olabilir, tedavi maliyeti düşebilir ve tedavi süreci psikolojik olarak da kolaylaşabilir.

### 9. Riskler

Ortaya çıkabilecek riskler	B planı
Bitkilerin antikanser özelliklerinin belirlenmemesi	- Farklı çözücüler kullanılması - Farklı hücre hatları temin edilerek çalışmaların tekrarlanması
Kromatografik yöntemin yeterli veri sunmaması	- Farklı mobil fazlar ve gradyanlar kullanılması

### 10. Kaynaklar

- [1] Özkan vd. (2019). Kanser hücreleri üzerine *Origanum minutiflorum*'un Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. CBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(2), 74-80.
- [2] Dükel vd. (2019). Protein kinase C Inhibitors selectively modulate dynamics of cell adhesion molecules and cell death in human colon cancer cells. Cell adhesion & migration, 13(1), 83-97.

- [3] Tavsan, Z., & Kayali, H. A. (2019). Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 109004.
- [4] Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*, 54(2), 407-419.
- [5] Pekdemir vd. (2020). Elazığ'da Yetişen *Polygonum cognatum* Meissn (Madımak) Bitki Ekstraktlarının In vitro Biyolojik Aktiviteleri ve Bazı Fitokimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (18), 368-378.
- [6] Uysal vd. (2015). Comparative antibacterial, chemical and morphological study of essential oils of *Thymbra spicata* var. *spicata* leaves by solvent-free microwave extraction and hydro-distillation. *International Journal of Food Properties*, 18(11), 2349-2359.
- [7] Yılmaz vd. (2019). İki Kekik Türünün (*Thymbra spicata* var. *spicata* ve *Origanum onites*) Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 1(2), 296-306.
- [8] Hayoğlu vd. (2010). Menengicin Şekerleme Üretiminde Kullanım Olanakları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14(4), 57-62.
- [9] Bozorgi vd. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2013.
- [10] Mert vd. (2016). Hatay Yöresinde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Bazı Tıbbi Bitkilerin Ekonomik Önemleri ve Kullanımları. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 9(2), 59-61.
- [11] Doğan, Ö., & Avcı, A. (2018). Bitkilerle tedavi ve ilaç etkileşimleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Public Health-Special Topic*, 4(1), 49-54.
- [12] Tanrikulu vd. (2017). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and extracts of Lamiaceae family (*Ocimum basilicum* and *Thymbra spicata*) from Turkey. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3, Special Issue 2), 340-348.
- [13] Eryugur vd. (2017). A study on the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* ethanol extract. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 39(3), 531-538.
- [14] Sabzali vd. (2014). Investigation on the inhibitory effects of hydro-alcoholic extract of *Thymbra spicata* on the growth of lung cancer cell line SK-Mes-1.
- [15] Yaşar vd. (2016). Bazı maki türlerinin kimyasal içeriği ve fenolik ekstraktifleri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Forestry*, 17(2), 187-193.
- [16] Al-Snafi, A. E. (2018). *Glycyrrhiza glabra*: A phytochemical and pharmacological review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 8(6), 1-17.
- [17] Sadat Shandiz, vd. (2017). Evaluation of cytotoxicity activity and NM23 gene expression in T47D breast cancer cell line treated with *Glycyrrhiza glabra* extract. *Journal of Genetic Resources*, 3(1), 47-53.
- [18] Sidkey vd. (2017). Cytotoxic Effects of *Glycyrrhiza glabra* L., *Morus nigra* L. and *Urtica urens* L. Extract against the Human Hepatocarcinoma HepG2 and Mouse L20B Cell Lines. *Jornal of Biotechnology Research Center*, 11(1), 19-25.



- [19] Lombardi vd. (2017). In vitro screening for cytotoxic activity of herbal extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017.
- [20] Ali, M. M. (2017). Farklı *Thermopsis turcica* Ekstrelerinin Hepg2 Hücre Hatlarında Antikanser, Sitotoksik, Genotoksik Mekanizmalarının Gen Ekspresyon Analizleri Yöntemiyle Değerlendirilmesi.
- [21] Singleton vd. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Methods in enzymology (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- [22] Top, R. (2018). Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [23] Sancho vd. (2014). Inhibition of proliferation of breast cancer cells MCF7 and MDA-MB-231 by lipophilic extracts of papaya (*Carica papaya* L. var. *Maradol*) fruit. Food and Nutrition Sciences, 5(21), 2097.
- [24] Bender vd. (2018). Integration of in vitro and in silico perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations. PloS one, 13(6).

