

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

PROJE KATEGORİSİ

TAKIM ADI

Gamze Kosovalı-İbrahim Öztürki Kanser Araştırmaları

PROJE ADI

Endemik *Rhaponticoides iconiensis* Türünün Sitotoksik ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

BAŞVURU NUMARASI

32690

KATEGORİ

Biyoteknoloji İnovasyon

İçindekiler

Proje Özeti (Proje Tanımı):

Türkiye biyoçeşitlilik fitocoğrafik bölgenin kesişim noktasında bulunmasından dolayı zenginlik göstermektedir ve dünya bitki ticaretinde üçüncü ülke durumundadır. Günümüzde fitoterapi, 19. ve 20. yüzyıllarda kimya ve biyokimya bilimlerindeki gelişmeler ile paralel olarak ilaç sanayiine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri doğrultusunda analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuvarlarda tıbbın gereksinimlerine yanıt veren birçok ilaç geliştirilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan bütün yapay maddeler toksik olarak bilinmektedir ve sağlıklı hücelere ciddi zarar vermektedirler. Bu nedenle kanserden korunmak için ya da kemoterapi amacıyla doğal ürünlerin kullanımı kansere yakalanma sıklığını azaltabileceği ve bu doğrultuda tıbbi bitkilerin de kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara alternatif olabileceği bildirilmiştir. Bu doğrultuda çalışmamızda Türkiye'ye endemik ve biyolojik aktivitesi henüz aydınlatılmamış *Rhaponticoides iconiensis* türünün sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Endemik *Rhaponticoides iconiensis* bitkisi soxhlet ekstraksiyon yöntemi kullanılarak sulu ekstraktı elde edildi ve çözücü uzaklaştırılarak deneylerde kullanılmak üzere hazırlandı. Bitki ekstraktı meme kanseri (MCF7) ve fare fibroblast (L929) hücrelerine farklı dozlarda (50 µg/ml, 100µg/ml) uygulanarak 24 saat boyunca inkübe edildi. Değerlendirmeler için 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi kullanıldı. E.coli bakterisi kullanılarak bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivite tayini gerçekleştirildi. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanıp sonuçlar istatistiksel olarak GraphPad InStat programı ile analiz edildi ve grafikleri çizilerek değerlendirildi.

Çalışmamız sonucunda biyolojik etkileri henüz aydınlatılmamış endemik *Rhaponticoides iconiensis* türünün sulu ekstraktının meme kanseri hücre soyunda doza bağlı % canlılık oranını azaltarak sitotoksik, E.coli bakterileri üzerinde ise güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edildi. *Rhaponticoides iconiensis* türünün farklı in vitro uygulamalar ve in vivo teknikler ile desteklenerek farmakolojik uygulamalara bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Rhaponticoides iconiensis*, Meme Kanseri, *Escherichia coli*, Sitotoksisite, Antimikrobiyal.

1. Problem/Sorun:

Endemik, sınırlı yayılışa sahip bitki gruplarını ifade etmektedir (Erik ve Tarıkahya, 2004). Çalışmamızda kullanılan *Rhaponticoides iconiensis* bitkisi Türkiye'nin endemik türlerinden biridir ve "tülüşah" veya "gaşak" yerel isimleri ile bilinmektedir. (Avcı M., 2005) Günümüzde fitoterapi, 19. ve 20. yüzyıllarda kimya ve biyokimya bilimlerindeki gelişmeler ile paralel olarak ilaç sanayine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuvarlarda tıbbın gereksinimlerine yanıt veren birçok ilaç geliştirilmiştir. Günümüzde

eczanelerde satılan mevcut ilaçların 1/4'i bitkisel kökenlidir ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevleridir ve bunların birçoğunda bitkiden elde edilmek istenen etken madde, laboratuvar ortamında kopya edilmektedir.

Çağımızda halk sağlığı için en önemli konulardan biri kanserden korunmadır. Yaklaşık yirmi yıldır doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bütün yapay maddeler toksik olarak bilinmektedir ve sağlıklı hücrelere ciddi zarar vermektedirler. Bu nedenle kanserden korunmak için ya da kemoterapi amacıyla doğal ürünlerin kullanımı kanser hastalığının yan etkilerini azaltabilir. Bu doğrultuda tıbbi bitkiler de kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara alternatif olabilirler (Reed, J.C.,1999).

Günümüzde kanser tüm dünyada büyük bir sağlık problemidir ve dünya genelinde her yıl yaklaşık 4 milyonu genç yaşta olmak üzere 7,6 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmektedir. Meme kanseri, kadınlar arasında yaygın görülmekte ve kanser nedeni ölümlerin başında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, kadınlarda görülen kanser türleri içinde en yaygın olanının meme kanseri olduğu rapor edilmiştir. (WHO, 2021) Hastalığın yaygın olarak görülmesi ve ölümlerle sonuçlanması nedeniyle bu hastalığın tedavisine yönelik araştırmalar hala güncelliğini korumakta ve giderek artmaktadır. Öte yandan Üriner sistem infeksiyonu (ÜSİ), en sık görülen klinik enfeksiyonlardan biridir. Bu nedenle ÜSİ'nin epidemiyolojisi, etiyolojik ajanların belirlenmesi ve etkenlerin antibiyotik duyarlılık profilinin belirlenmesi önemlidir (Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H). Üriner sistem infeksiyonlarının %75-90'ından Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler sorumludur. Escherichia coli (E. coli) ise en sık izole edilen mikroorganizmadır (Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS). Ve çalışmamızda antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde *E.coli* bakterileri tercih edilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, ülkemize endemik olan *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin biyolojik aktivitesinin araştırılması amacıyla meme kanseri hücre soyu (MCF-7) üzerine olan sitotoksik ve *E.coli* bakterisi üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. Çözüm

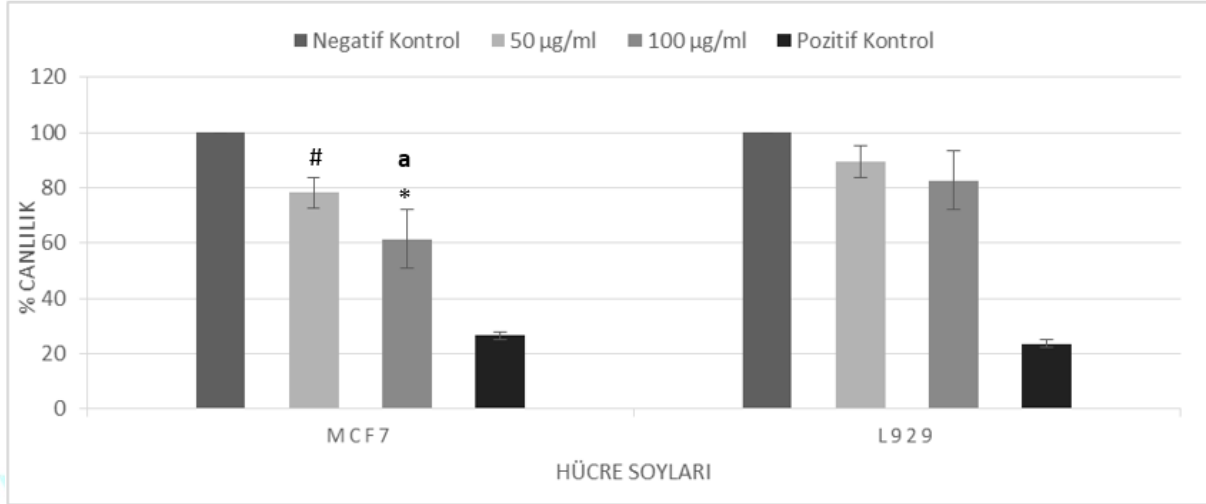
Çalışmamızda endemik *Rhaponticoides iconiensis* türünün biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması kapsamında sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri gösterildi.

2.1. Sitotoksik Etki

Çalışmamızda endemik *Rhaponticoides iconiensis* türünün meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 ile sitotoksik etkilerinin ortaya konması için MTT testi yapıldı. Bitki ekstraktının kanserli hücre soyları yanında sağlıklı hücre soyları üzerine olan etkilerinin gözlemlenmesi için MCF-7 hücre soyu ile birlikte fare fibroblast hücre soyu olan L-929 hücre soyu kullanıldı.

Endemik *Rhaponticoides iconiensis* türünün artan doz uygulamaları sonucu, MCF-7 hücre soyu üzerinde gösterdiği % canlılık oranları negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, 50 µg/ml ($p<0,05$) ve 100 µg/ml ($p<0,01$) dozlarında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Buna ek olarak sağlıklı fare fibroblast L-929 hücre soylarına ekstraktın artan dozlarda uygulanması ile hücrelerin % canlılık oranlarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

MCF-7 ve L-929 hücre soyları aralarında yapılan kıyaslamada ise hücrelerin % canlılık oranlarında meydana gelen azalma 50 µg/ml dozunda anlamlı değilken, 100 µg/ml dozda % canlılık oranlarında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya kondu ($p<0,05$).



Şekil 1. MCF7 VE L929 hücrelerinin % canlılık değerleri grafiği. # $p<0,05$; * $p<0,01$; negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında. ^a $p<0,05$ L929 grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki veriler ortalama (\bar{X})±standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir.

2.2. Antimikrobiyal Etki

Çalışmamızda *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin in vitro antibakteriyel aktivitesi test edilmek üzere *E.coli* mikroorganizmasına karşı disk difüzyon yöntemi ile zon çapları ölçülerek tespit edildi.



Şekil 2. *E. coli* bakteri üzerinde *Rhaponticoides iconiensis* endemik bitkisi (T) ve Sefotaksim (S) antibiyotikinin disk difüzyon çapları.

Sulu ekstraktı kullanılan *Rhaponticoides iconiensis* endemik türünün pozitif kontrol olarak kullanılan Sefotaksim antibiyotiği ile kıyaslanması sonucu güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 1, Şekil 2, Tablo 1).

Tablo 1. Disk difüzyon metodu ile oluşan antimikrobiyal aktivite sonuçları. Gruplardaki veriler ortalama (X)±standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

Disk Difüzyon Zon Capı (cm) ± SD		
İşlemler	<i>Sefotaksim</i>	<i>Rhaponticoides iconiensis</i>
E. coli	5,0 ± 0,256	3,2 ± 0,206

3. Yöntem

Çalışmalarımız için Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi hücre kültürü laboratuvarı ve Bayrampaşa Bilim Merkezi biyoloji laboratuvarı imkânlarından faydalandı.

3.1. Bitki Materyali

Tülüşah, Türkiye’de %78’i endemik olan peygamber çiçeği (*Rhaponticoides*) türlerindedir. Yaklaşık 2m boylanabilen ve kanarya sarısı rengindeki iri çiçekleriyle güzel ve gösterişli bir tür olan tülüşah, çok yıllık otsu bitkidir. Taban yaprakları, 30-40 cm boyunda ve teleksi parçalanmış yapıdadır. Gövde, üst kısımlarda çatalsı biçimde dallanır. Çiçekler, çatalları uçlarında yer alan 1-5 adet yumurtamsı başçıkta toplanmıştır. Çiçekler, temmuzda açar ve bir ay sonra solmaya başlar (Vural M. ve Tugay O., 2007).



Şekil 3. *Rhaponticoides iconiensis* tohumu

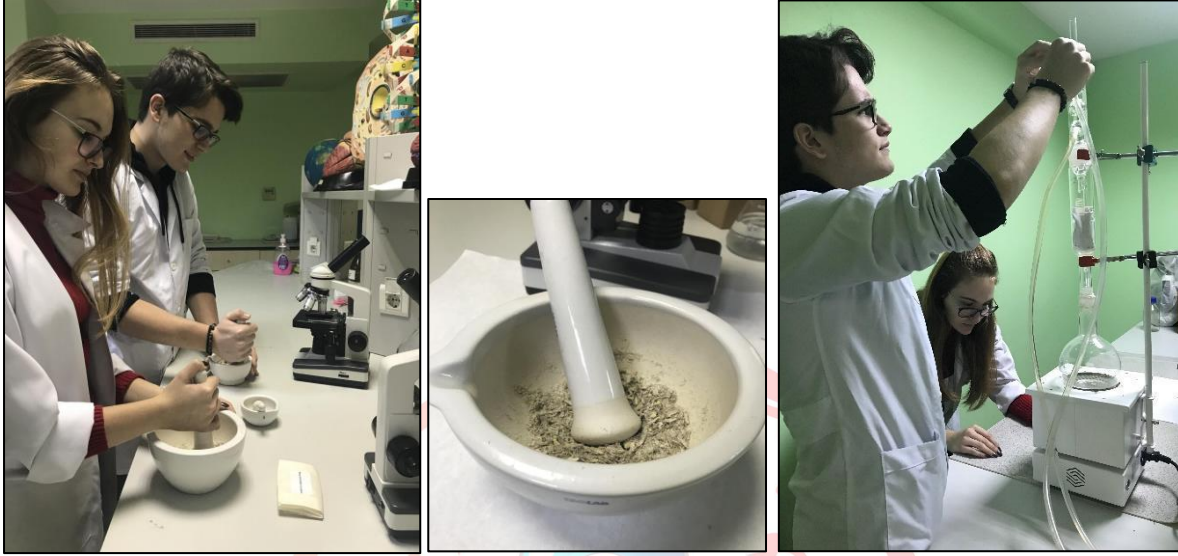
Çalışmalarımızda kullanılan endemik *Rhaponticoides iconiensis* bitkisi tür tanımlaması yapılmış olarak Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi’nden temin edildi (Şekil 3).

3.2. Soxhlet Ekstraksiyonu

Çalışmamızda kullanılan endemik *Rhaponticoides iconiensis* türüne ait tohumlar Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi’nden temin edildi. Ekstraksiyon işlemi için 20 gr havanda öğütülen örnek 200 ml distile su içeren yuvarlak dipli şişeye konuldu. Soxhlet cihazı kurularak (Elektro-mag) hazırlanan düzenekte 6-8 saat süreyle ekstrakte edildi. Takiben bitki ekstraktı su banyosunda (Elektro-mag) +40°C’de sudan uzaklaştırıldı. Tartılan kuru ekstraktlar medyumda çözüldü ve 0,22 µm’lik membran filtrelerden (Sartorius) geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Ardından +4 °C kullanılmaya kadar muhafaza edildi (Şekil 4, Şekil 5).



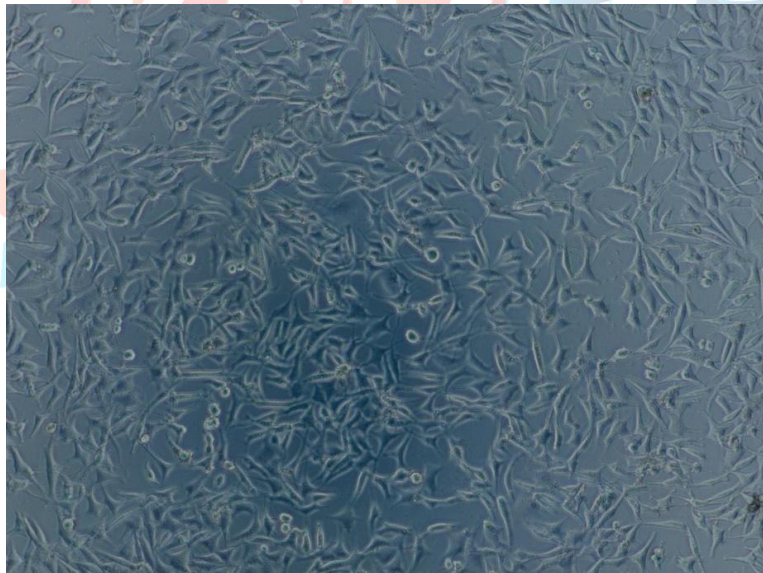
Şekil 4. *Rhaponticoides iconiensis* ekstraktı



Şekil 5. *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin havanda öğütülmesi ve Soxhlet ekstraksiyon düzeneği ile ekstraktının alınması.

3. 3. Hücre Kültürü

Araştırmalarımızda Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından temin edilen insan meme kanseri (MCF-7) ve fare fibroblast (L-929) hücre soyları kullanıldı.

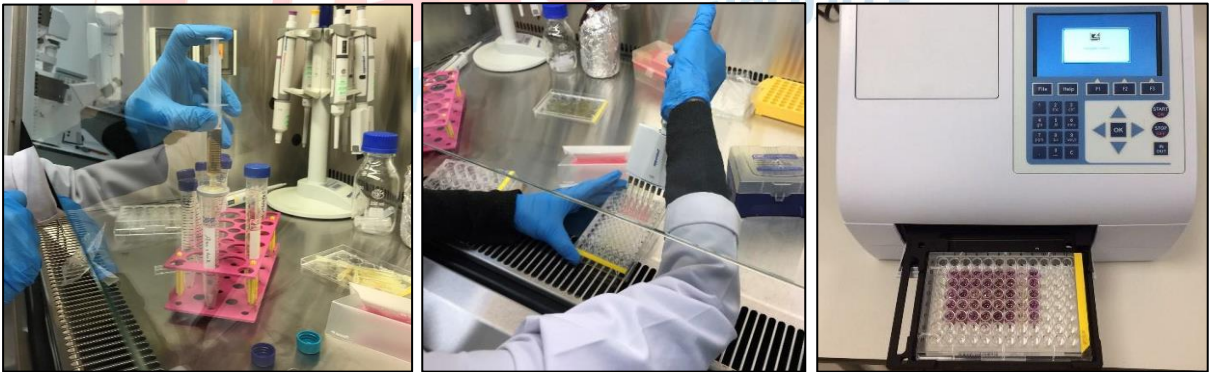


Şekil 6. Fare fibroblast (L929) hücrelerinin pasajlama sonrası ters aydınlatmalı faz kontrast mikroskopunda genel görünüşleri.



Şekil 7. Meme kanseri (MCF7) hücrelerinin pasajlama sonrası ters aydınlatmalı faz kontrast mikroskopunda genel görünüşleri.

Hücreler için besi ortamı olarak, inaktive edilmiş %10 Fötal Sığır Serum (FBS), 100 IU/ml penisilin ve streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture (DMEM) medyumunu kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren flasklarda, iç ortamı %5 CO₂ , %95 hava karışımı olan 37°C'lik inkübatör içinde tutuldu ve haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi (Şekil 6, Şekil 7). Semi-konfluent kültürler kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tamponunda hazırlanmış %0,3 (Gibco) tripsin ile tripsinize edilerek toplandı. 1500 rpm'de 1-3 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi 3 ml medyum ile tekrarlanarak tripsin etkisi ortadan kaldırıldı. Hücreler taze hazırlanmış serumlu medyumda tek hücre süspansiyonu haline getirildi (Şekil 8).



Şekil 8. Hücre kültürü çalışmaları.

3.4. Hücre Canlılık Değerlendirmeleri

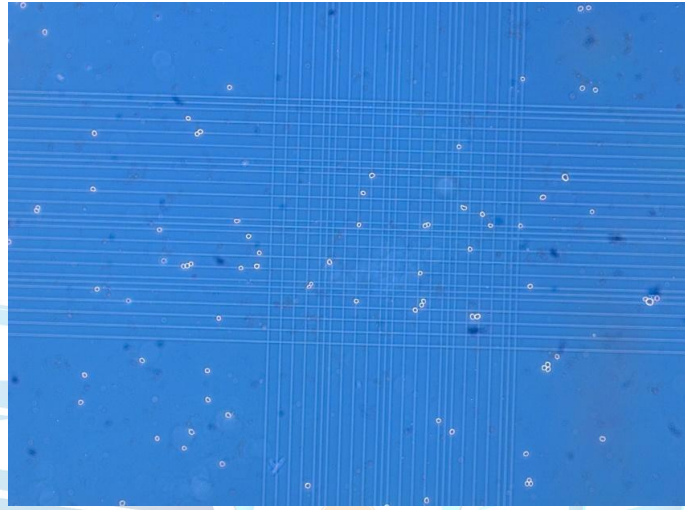
Çalışmamızda hücre canlılık değerlendirmeleri için MTT yöntemi kullanıldı.

3.4.1. MTT Solüsyonunun Hazırlanması

Bir falkon tüpüne 5mg/ml olacak şekilde 25 mg MTT tartıldı ve 5 ml 1xPBS ile vorteks ile karıştırılarak çözdürüldü. Önce 0,45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

3.4.2. MTT Testinin Yapılışı

Deneyler 96 kuyucuklu kültür pleytlerinde gerçekleştirildi. Her kuyucuğa taze hazırlanmış ve %10 serum içeren DMEM medyumunu konuldu. Bu medyumun içerisine her bir hücre soyu için %100 canlı Thoma lamında sayılarak 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde 200 µl MCF-7 ve L-929 kuyucuklara ekildi. Kültür kapları hafifçe sallanarak hücrelerin kuyucuk yüzeyine homojen yayılmaları sağlandı (Şekil 9).



Şekil 9. Thoma lamında MCF7 hücrelerinin sayımı.

Hücreler 37°C'de 1 gün %5 CO₂, % 95 hava ve nemli inkübatörde bekletildi. Ardından *Rhaponticoides iconiensis* bitki ekstraktı her bir kuyucuğa final konsantrasyonu 50 µg/ml ve 100 µg/ml dozlarda olacak şekilde DMEM medyum ile tamamlanarak deney grupları oluşturuldu ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her iki hücre soyu için negatif kontrol olarak sadece medyum kullanılırken pozitif kontrol olarak fenol çözeltisi kullanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl taze medyum ve 10 µl MTT (5 mg/ml) eklenerek 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara 100'er µl DMSO (Sigma-aldrich) eklendi ve orbital çalkalayıcıda 100 rpm'de 5 dakika çalkalanması sağlanarak mikrolakalardaki hücrelerin optik değerleri mikrolaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda okutuldu. (Şekil 8)

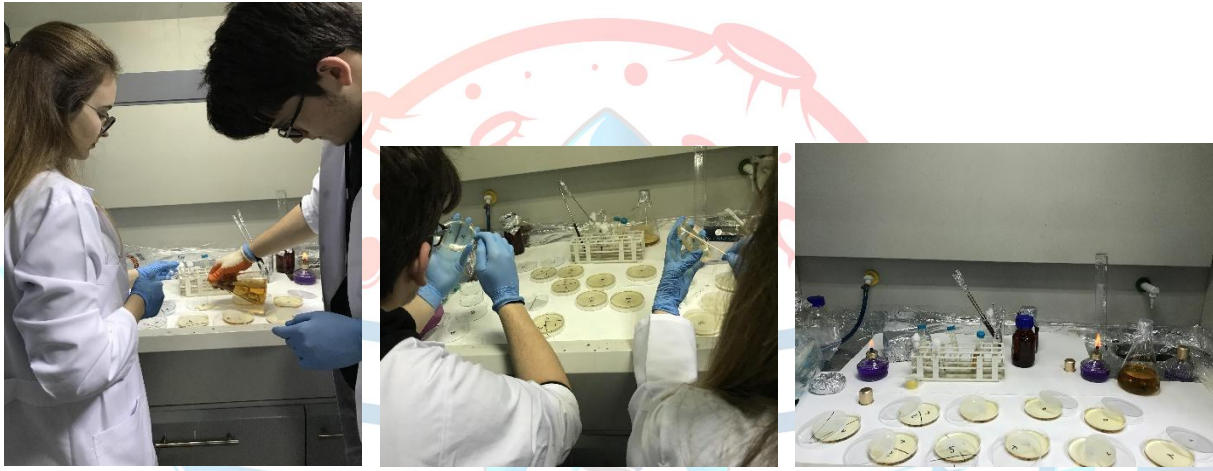
3.5. Antimikrobiyal Aktivite

Çalışmamız için kullanılan *E. coli* bakterisi İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edildi.

3.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi antimikrobiyal etki çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan bakteri kültürlerini aktif hale getirebilmek için 28 gr Nutrient Broth

(Merck) 1 litre distile suda çözülerek elde edildi. Ardından %0,9 NaCl içerisinde 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmış bakteri çözeltisi hazırlandı. Bakteri süspansiyonlarından eküvyon yardımı ile agar dökülmüş petri kaplarına ekimler yapıldı. Hazırlanan agar üzerinde 6 mm çapında steril Whatman No:1 filtre kağıtlarına steril *Rhaponticoides iconiensis* bitki ekstraktı 20 µl emdirildi. Pozitif kontrol olarak Sefotaksim antibiyotiği 20 µl filtre kağıtlarına emdirilerek kullanıldı. Petri kaplarına yerleştirilen diskler 37°C'de 24 saat boyunca etüvde beklemeye bırakıldı. Ardından petri kaplarında oluşan zon çapları bir cetvel yardımı ile ölçüldü, deneyler üç kere tekrarlanıp elde edilen sonuçların ortalama ve standart sapmaları hesaplandı. Çalışmamızda kullanılan tüm materyaller öncesinde otoklav yardımıyla steril edildi (Şekil 2, Şekil 10, Tablo 1).



Şekil 10. Antimikrobiyal aktivite tayini çalışmaları.

3.6. Kullanılan Malzemeler

Çalışmalarımızda; distile su cihazı (Elektro-Mag), su banyosu (Elektro-mag), membran filtre (Sartorius), etüv (Ertick), hassas terazi (Ratwag), çeker ocak (Siemens), petri kapları (IsoLab), filtre kağıdı (Whatman), mikropipet (Isotherm), deney tüpleri (IsoLab), askorbik asit (Sigma-Aldrich), clevenger (IsoLab), DPPH (Sigma-Aldrich), beher (Isotherm), mueller-hinton-agar (Merck), inkübatörde (Thermo Scientific), laminar akım kabini (Tezsan), santrifüj (Sigma, 2-16K), hücre kültürleri incelemeleri invert mikroskop (Zeiss Zen), inkübatör (Sanyo), mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific), cam malzeme sterilizasyonu otoklav (JK-VSP-60A, JKI) ve stokların depolanması için buzdolabı (Indesit) kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analizler

Her bir hücre soyu için yapılan 3 tekrar sonrası hücrelerin canlılıkları % olarak hesaplanmıştır. Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri için GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı ile ANOVA testi kullanıldı. Testler %95 güven aralığı içinde yapıldı ve $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Gruplardaki verilerin ortalaması \pm standart sapma (SD) olarak verilmiş ve sonuçlarının grafikleri Microsoft Office Excel 2017 programında hazırlandı.

4. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az olan yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar fazla olması, insanları bitkiler ile tedaviye yöneltmiştir. Bunun yanı sıra özellikle kanser tedavilerinde kullanılan kombine ilaç tedavilerinin metabolizma üzerinde yarattığı hasarı yine sentetik yollar ile gidermenin yarattığı sorunlar çalışmamızın temelini oluşturmuştur. Ayrıca bu tedavilerde çoğunlukla antimikrobiyal etkileri bildirilen çok sayıda bitki bildirilmiştir. Bu kapsamda çalışmamızda etkileri henüz aydınlatılmamış endemik *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri tespit edilmiştir.

Endemik *Rhaponticoides iconiensis* türünün laboratuvar ortamında ilk kez incelenmesi; sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitesinin tayini projemiz ile araştırılmıştır.

Endemik *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir. Çalışmamızdan çıkan bu olumlu sonuçlar bundan sonra yapılan çalışmalar için de yol gösterici olmuştur.

Geçtiğimiz yıl Dimitrova ve arkadaşları tarafından *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin biyolojik aktivitesi ile ilgili yeni bir çalışmada bitkinin yaprak, çiçek ve meyve kısımlarının içerikleri farklı çözücüler kullanılarak aydınlatılmıştır (Dimitrova, 2020). Ayrıca Tugay ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; *Rhaponticoides iconiensis* türünün çeşitli kanser soylarına karşı sitotoksik aktivite sonuçlarının projemizde elde ettiğimiz sonuçlara istatistiksel olarak yakın olduğu görülmüştür (Tugay, 2020). Bu çalışmalarda projemizin ilerleyen süreci için umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

5. Uygulanabilirlik

Bu çalışmada *Rhaponticoides iconiensis*'in biyolojik aktivitesinin aydınlatılması amaçlandığından deneylere Bayrampaşa Bilim Merkezi'nin biyoloji laboratuvarı kullanılmıştır. Çalışmamızın ileri aşamalarının hayata geçirilebilmesi için üniversite standartlarında bir laboratuvara ihtiyaç olduğu için Yıldız Teknik Üniversitesi'nin hücre kültürü laboratuvarlarında deneylere devam edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular sonucunda *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin hücrelerde neden olduğu toksisitenin hangi moleküler yollar üzerinde gerçekleştiği ve hücre siklusunun hangi evrelerine tutuklu kaldığı aydınlatılmalıdır. Ayrıca hücre ölümünün ölüm yolağından meydana geldiğinin belirlenmesi için apoptotik ve nekrotik belirteçlerin kullanılması gerekmektedir.

Bundan sonraki süreçte *Rhaponticoides iconiensis* bitki ekstraktının etkilerinin daha iyi anlaşılması için farklı çözücülerle elde edilen tülüşah ekstraktlarının, çeşitli hücre soyları üzerindeki etkilerinin ortaya konması gerekmektedir.

Rhaponticoides iconiensis, aydınlattığımız yüksek antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri sebebiyle, yüksek ticari ürün potansiyeline sahiptir. Yüksek donanımlı laboratuvarlarda hücre ölüm yollarının tayini, farklı hücre soylarına yapılan deneylerin artırılması ve optimum dozların belirlenmesinin ardından ilaç üretimi için çalışmalara başlanabilir. Üretim süreci ve yöntemleri yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlara göre belirlenecektir.

Yaptığımız çalışmayla *Rhaponticoides iconiensis* kuvvetli antibiyotik etki ve istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki gösterdiği için değerli bir farmasötik ajan olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız *Rhaponticoides iconiensis* türü ülkemize endemiktir. İlerleyen süreçte yapılan araştırmalar doğrultusunda geliştirilen ilaç ve benzeri ürünlerde tülüşah bitkisi doğrudan veya dolaylı olarak kullanılabilir. İlaç sanayinde kilogram başına katma değer göze alındığında *Rhaponticoides iconiensis*; ülkemize endemik olması bakımından önemli bir gelir kalemi olabilme potansiyeline sahiptir.

Çalışmamızda ortaya koyduğumuz *Rhaponticoides iconiensis* türünün in vitro ortama göstermiş olduğu bu olumlu etkilerinin in vivo ortamda da araştırılması ve takiben klinik araştırmalarda değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullanılan bitki ülkemizde kolaylıkla temin edilebilir olmasından dolayı da uygulanabilirlik açısından ucuz ve kolay bir çalışma imkânı sağlayacaktır.

6. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tablo 2. Proje Zaman Planlama Çizelgesi

Yıl: 2017-2018	Aylar												
Aşamalar	Ay	ARALIK	OCAK	ŞUBAT	MART	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	TEMMUZ	AĞUSTOS	EYLÜL	EKİM	KASIM
	LİTERATÜR TARAMASI	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
VERİ TOPLANMASI	X	X	X	X	X	X	X	X					
BİTKİ ANALİZLERİ			X	X	X								
LABORATUVAR ÇALIŞMASI				X	X	X	X	X	X				
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ								X	X	X	X		
PROJE RAPORU YAZIMI								X	X	X	X	X	X

Kullandığımız Malzemeler:

Çalışmalarımızda; distile su cihazı (Elektro-Mag), etüv (Ertick), hassas terazi (Ratwag), çeker ocak (Siemens), petri kapları (IsoLab), filtre kağıdı (Whatman), mikropipet (Isotherm), deney tüpleri (IsoLab), askorbik asit (Sigma-Aldrich), clevenger (IsoLab), DPPH (Sigma-Aldrich), beher (Isotherm), santrifüj tüp (IsoLab) ve mueller-hinton-agar (Merck), hücre pasajları laminar akım kabini (Tezsan), hücre kültürleri incelemeleri invert mikroskop (Zeiss Zen), cam malzeme sterilizasyonu otoklav (JK-VSP-60A, JKI), stokların depolanması için buzdolabı (Indesit) kullanıldı.

Maliyet:

Çalışmamızda kullandığımız *Rhaponticoides iconiensis* tohumu Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi'nden ücretsiz temin ettik. Kullandığımız teçhizat ve deney ekipmanları modern bir laboratuvarın standart donanımlarıdır.

Kullandığımız cihaz ve teçhizatlar Bayrampaşa Bilim Merkezi ve Yıldız Teknik Üniversitesi'nin donanımlarıdır. Laboratuvarların kullanımı için herhangi bir ücret ödenmemiştir. Projemizin deney ekipmanları ve sarf malzemeleri için ayırdığımız bütçe 1000£'dır.

Çalışmamızın başlangıç aşamasını oluşturan bu proje ile *Rhaponticoides iconiensis* türünün çeşitli hücre soyları üzerine sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitesi ortaya konulmuştur. İleriki aşama etken madde tayini ve nihai ürün aşamasıdır (Tablo 3).

Nihai ürün aşamasında yeni ilaç geliştirmek uzun bir süreçtir. Bir ilaç geliştirmek ortalama 12-15 yıl sürmekte ve 2013 yılı verilerine göre, her bir bileşik için 2,55 milyar \$ yatırım yapılmaktadır. Ruhsat sonrası Ar-Ge harcamaları dahil edildiğinde bir ilacın geliştirme maliyeti 2,87 milyar \$'ı bulmaktadır. En ufak bir hatada elde edilen tüm bilgiler güvenilirliğini ve değerini yitirebilmektedir. Bu nedenle klinik araştırmalar çoğunlukla gelişmiş ülkelerde yürütülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1981-1990 yılları arasında onaylanan 196 yeni ilacın 181'i (%92,4) ilaç endüstrisi, 7'si akademik kuruluşlar ve 1'i devlet tarafından geliştirilmiştir (Pfizer, 2015).

2015 yılı verilerine göre dünyada ilaç Ar-Ge'sine ayrılan bütçe yaklaşık 140 milyar dolar civarındadır. Bu yatırımın %35'i Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleşmiştir. Ar-Ge yatırımlarının çok önemli bir kısmı klinik araştırmalar alanında gerçekleşmektedir (Pfizer, 2015).

Son yıllarda altyapının gelişmesi, kalitenin yükselmesi ve küreselleşmenin etkisi ile gelişmekte olan ülkelerde de araştırma yatırımının arttığını gözlemlemektedir. Bu durum ülkemiz için önemli bir fırsat yaratmaktadır. Son yıllarda ülkemizde klinik araştırmalar alanında gerçekleşen hızlı büyümeye rağmen, nüfus göz önüne alındığında, Türkiye henüz potansiyelinin çok altındadır. Devlet, akademi ve endüstri iş birliğinin güçlenmesi, Ar-Ge ve inovasyonu destekleyen ortamın gelişmesini ve önümüzdeki yıllarda ilaç Ar-Ge ve klinik araştırmalar alanında hızlı bir büyüme gerçekleşmesini sağlayacaktır. T.C. Kalkınma Bakanlığı'nın "Onuncu Kalkınma Planı" çerçevesinde 2014 yılında yayınladığı "Sağlık Endüstrilerinde Yapısal Dönüşüm Eylem Planı" ile, uzun vadede Türkiye'nin küresel bir ilaç Ar-Ge ve üretim merkezi olması, ilaç alanında rekabetçi bir konuma ulaşması hedeflenmektedir. Bu plan doğrultusunda, global klinik araştırma yatırımlarından Türkiye'nin aldığı payın ve yürütülen klinik araştırma sayısının yıl bazında %25 oranında artması planlanmaktadır (Pfizer, 2015).

Öngörülen büyüme göz önüne alındığında *Rhaponticoides iconiensis*, ülkemiz için önemli bir ticari katma değer olma potansiyeline sahiptir.

Tablo 3. Projenin günümüz ve ilerleyen aşamalarına göre süreç-aşama tablosu.

<i>Süreçler</i> <i>Aşamalar</i>	Literatür Taraması ve Tasarım	Araştırma Projesi	Etken Madde Tayini ve İlaç Geliştirme Çalışmaları
<i>Başlangıç Aşaması</i>	X	X	
<i>Geliştirme Aşaması</i>		X	X
<i>Nihai Ürün Aşaması</i>			X

7. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör türüdür. 2020'de dünya genelinde meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın ve 685.000 ölüm rapor edilmiştir. 2020 yılı sonu itibarıyla, son 5 yılda 7,8 milyon kadına meme kanseri teşhisi konması, meme kanserini dünyanın en yaygın kanseri haline getirmiştir. Meme kanseri dünyanın her ülkesinde kadınlarda ergenlikten sonra herhangi bir yaşta görülmekle birlikte ileri yaşlarda artan oranlarda görülmektedir (WHO, 2021).

Meme kanserleri vakalarının yaklaşık yarısı cinsiyet (kadın) ve yaş (40 yaş üstü) dışında tanımlanabilir. Yaşın artması, obezite, zararlı alkol kullanımı, ailede meme kanseri öyküsü, radyasyona maruz kalma öyküsü, üreme öyküsü (menstrüel dönemlerin başladığı yaş ve ilk gebelik yaşı gibi), tütün kullanımı ve menopoza sonrası hormon tedavisi meme kanseri riskini artıran faktörlerin önde gelenleridir (WHO, 2021).

Ülkemizde kansere yönelik sağlıklı kayıt ve bildirim sisteminin olmaması nedeniyle, meme kanserine ait ulusal veriler yeterli olmamakla birlikte; Sağlık Bakanlığı'nın 1999 yılı verilerine göre, meme kanseri kadınlarda görülen kanserler arasında %24,1 (2390 vaka) oranıyla en sık görülen kanser türüdür ve insidansı giderek artmaktadır (Uzun Ö. ve ark., 2004).

Escherichia coli (E. coli), insanların ve sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir. E. coli türlerinin çoğu zararsızdır. Ancak Shiga toksini üreten E. coli (STEC) gibi bazı suşlar, gıda kaynaklı ciddi hastalıklara neden olabilir. (WHO, 2018). E. coli nedeniyle oluşan hastalık salgınları binlerce kişiyi etkileyebilmekte ve uluslararası manşetlerde yer tutabilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda bakteri türü olarak tercih edilmiştir.

Ayrıca çalışmamızın ilerletilmesi durumunda *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin etkilerinin daha net aydınlatılması ve başka hücre soylarında da denenmesinin birçok farklı alanda sağlık problemleri yaşayan insanlara yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Projemizin verileri enfeksiyon hastalıkları, meme kanseri başta olmak üzere onkolojik tedaviler için tıp alanında çalışmalar yapan tüm araştırmacılara ışık tutacaktır.

8. Riskler

Rhaponticoides iconiensis bitkisinin etkileri ilk kez bu projeye ortaya konmuştur. Özellikle antimikrobiyal etkileri yüksek olduğundan bu özelliği üzerine gidilmesi gerektiğinin ve farklı bakteri soylarında da denenmesinin gerekmektedir. Öte yandan *Rhaponticoides iconiensis* bitkisinin biyolojik etkilerinin araştırılması için B planı olarak *Candida albicans* ve *Saccharomyces* gibi maya türlerinin araştırılması planlanmıştır.

Rhaponticoides iconiensis türü üzerine yaptığımız bu çalışma deneysel nitelik taşımaktadır. Bu sebeple herhangi bir risk taşımamakla birlikte çalışmaların ilerletilmesi halinde olası riskler öngörülebilir ve oranları hesaplanabilecektir. Bu anlamda etken madde tayini çalışmaları ve olabildiğince farklı hücre soyu üzerine çeşitli doz uygulamaları kritik öneme sahiptir.

9. Kaynaklar

1. Avcı, M. (2005) Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi 13: 27-55.
2. Erik S. ve Tarıkahya B., (2004) Türkiye florası üzerine. Kebikeç, 17: 139-163.
3. Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H: Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007;26(2):83-90.
4. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS: Urinary tract infections: new insights into a common problem, Postgraduate Med J 2005;81(952):83-6.
5. Tugay, O., Paşayeva, L., Demirpolat, E., & Şahin, M. (2020, April 10). Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Phytochemical Composition of *Centaurea iconiensis* (*Rhaponticoides iconiensis*). Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science | 10.1007/s40995-020-01030-y.
6. Reed, J.C. (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. Current Opinion in Oncology, 11(1), 68-75.
7. Uzun Ö, Eti Aslan F, Selimen D, Koç M. Quality of life in women with breast cancer in Turkey. Journal of Nursing Scholarship 2004;36(3):207-2
8. Vural M. ve Tugay O., Doğadaki Son Örnekleriyle Varolma Çabasını Sürdürüyor, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Dergisi, 2007.
9. Pfizer Türkiye, *Yeni İlaç Geliştirmenin Dünya ve Türkiye'deki Durumu*. (2015, Kasım)

10. Zheleva-Dimitrova, D., Zengin, G., Sinan, K. I., Yıldıztuğay, E., Mahomoodally, M. F., Ak, G., Picot-Allain, M. C. N., & Gevrenova, R. (2020). Identification of bioactive compounds from *Rhaponticoides iconiensis* extracts and their bioactivities: An endemic plant to Turkey flora. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 113537.
11. World Health Organization: WHO. (2021, March 26). *Breast cancer*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
12. World Health Organization: WHO. (2018, February 7). *E. coli*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

