

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

LİSE SEVİYESİ FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

ANTI-HCC

PROJE ADI

Hepatosellüler Karsinom Hücre Hatlarında Hünnap ve Hint
İncirinin Antikanserojen Etkisinin Araştırılması

BAŞVURU ID

427024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. Proje Özeti	3
2. Problem/Sorun	3
3. Çözüm	4
4. Yöntem	5
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	13
6. Uygulanabilirlik	13
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	13
8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)	15
9. Riskler	15
10. Kaynaklar	16



1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Karaciğer kanseri, en sık rastlanan ikinci ölümcül malignitedir. Karaciğer kanseri vakalarının %90'ından fazlası hepatosellüler karsinomlardır (HCC). HCC tedavisinde rezeksiyon, transplantasyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi başvurulan yöntemlerdir. Bu yöntemler, sağlıklı hücrelerin zarar görmesi, organ kaybı ve karaciğer yetmezliği gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Günümüzde HCC tedavisinde doğru ve etkili tedavi yetersizliği nedeniyle yeni potansiyel ilaçların araştırılması ivme kazanmıştır. Bu projede, daha önce karaciğer kanseri üzerine çalışılmamış olan hünnap (*Ziziphus zizyphus*) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitki ekstraktlarının hepatosellüler karsinom hücre hatlarında antikanserojen etkisinin *in vitro* olarak araştırılmasıyla karaciğer kanseri için alternatif tedavi yöntemi bulunması amaçlanmıştır.

Hünnap bitkisinin yaprağı ve Hint inciri bitkisinin kladotlarından metanol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen bitki ekstraktlarının HCC hücre hattı olan SNU-398 ve SNU-475 hücre hatları üzerinde sitotoksosite (MTT), migrasyon ve apoptoz deneyleri gerçekleştirilmiştir. MTT testi sonuçlarına göre SNU-398 hücre hattı için hünnap yaprak ekstresinin LC50 değeri 0,25 mg/ml iken Hint inciri kladot ekstresinin LC50 değeri 2 mg/ml'dir. SNU-475 hücre hattı için hünnap yaprak ekstresinin LC50 değeri 0,5 mg/ml iken Hint inciri kladot ekstresinin LC50 değeri 1 mg/ml'dir. Migrasyon deneyleri sonucunda, çizik atılan bölgelerde kanser hücrelerinin çoğalamadığı gözlemlenmiştir. Apoptoz deneyleri sonucunda ise her iki bitki ekstresinin de iki HCC hücre hattında nekrotik ölüme yol açmadan erken apoptoz ile ölüme yol açtığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, hünnap ve Hint inciri bitkilerinin karaciğer kanseri üzerine antikanserojen etkilerinin ilk defa araştırıldığı bu projede; elde edilen bitki ekstrelerinin iki farklı HCC hattı üzerine anti-proliferatif, anti-migrant ve apoptotik özellikler gösterdiği bulunmuştur.

2. Problem/Sorun

Kanser, çağımızın en fazla görülen ve diğer patojenik hastalıklara kıyasla mortalitesi (ölüm oranı) en yüksek olan hastalıktır. Karaciğer kanseri, şekil 1'de de görüldüğü üzere, en sık görülen 6. kanser çeşidi olup aynı zamanda kanser kaynaklı ölümler arasında 2. sırada yer almaktadır. Karaciğer kanseri, en sık rastlanan ikinci ölümcül malignitedir.

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site										
Cancer	New cases				Deaths				5-year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop.
Breast	2 261 419	1	11.7	5.20	684 996	4	6.9	1.49	7 790 717	0
Lung	2 206 771	2	11.4	2.74	1 796 144	1	18.0	2.18	2 604 791	0
Prostate	1 414 259	3	7.3	3.86	375 304	8	3.8	0.63	4 956 901	0
Colon	1 148 515	4	6.0	1.30	576 858	5	5.8	0.55	3 045 225	0
Stomach	1 089 103	5	5.6	1.31	768 793	3	7.7	0.90	1 805 968	0
Liver	905 677	6	4.7	1.11	830 180	2	8.3	1.01	994 539	0
Rectum	732 210	7	3.8	0.91	339 022	10	3.4	0.37	2 066 732	0
Cervix uteri	604 127	8	3.1	1.39	341 831	9	3.4	0.82	1 495 211	0
Oesophagus	604 100	9	3.1	0.78	544 076	6	5.5	0.68	666 388	0
Thyroid	586 202	10	3.0	0.68	43 646	25	0.44	0.05	1 984 927	0
Bladder	573 278	11	3.0	0.64	212 536	14	2.1	0.18	1 720 625	0
Non-Hodgkin lymphoma	544 352	12	2.8	0.62	259 793	12	2.6	0.27	1 544 488	0
Pancreas	495 773	13	2.6	0.55	466 003	7	4.7	0.51	379 958	0
Leukaemia	474 519	14	2.5	0.50	311 594	11	3.1	0.32	1 340 506	0
Kidney	431 288	15	2.2	0.52	179 368	16	1.8	0.20	1 207 547	0
Corpus uteri	417 367	16	2.2	1.05	97 370	20	0.98	0.22	1 415 213	0
Lip, oral cavity	377 713	17	2.0	0.46	177 757	17	1.8	0.22	959 248	0
Melanoma of skin	324 635	18	1.7	0.37	57 043	23	0.57	0.06	1 092 818	0
Ovary	313 959	19	1.6	0.73	207 252	15	2.1	0.49	823 315	0
Brain, central nervous system	308 102	20	1.6	0.35	251 329	13	2.5	0.30	837 152	0
Larynx	184 615	21	0.96	0.25	99 840	19	1.0	0.13	518 380	0
Multiple myeloma	176 404	22	0.91	0.21	117 077	18	1.2	0.13	450 579	0
Nasopharynx	133 354	23	0.69	0.16	80 008	22	0.80	0.10	382 507	0
Gallbladder	115 949	24	0.60	0.13	84 695	21	0.85	0.09	137 466	0
Oropharynx	98 412	25	0.51	0.13	48 143	24	0.48	0.06	258 543	0
Hypopharynx	84 254	26	0.44	0.11	38 599	26	0.39	0.05	132 717	0
Hodgkin lymphoma	83 087	27	0.43	0.09	23 376	28	0.23	0.02	281 112	0
Testis	74 458	28	0.39	0.14	9 334	34	0.09	0.02	296 686	0
Salivary glands	53 583	29	0.28	0.06	22 778	29	0.23	0.03	160 292	0
Anus	50 865	30	0.26	0.06	19 293	30	0.19	0.02	141 378	0
Vulva	45 240	31	0.23	0.09	17 427	31	0.18	0.03	135 892	0
Penis	36 068	32	0.19	0.09	13 211	33	0.13	0.03	102 157	0
Kaposi sarcoma	34 270	33	0.18	0.03	15 086	32	0.15	0.01	82 033	0
Mesothelioma	30 870	34	0.16	0.03	26 278	27	0.26	0.03	37 047	0
Vagina	17 908	35	0.09	0.04	7 995	35	0.08	0.02	44 613	0
All cancer sites	19 292 789	-	-	20.44	9 958 133	-	-	10.65	50 550 287	0

Şekil 1. 2020 yılında, Dünya genelinde en sık görülen vakalar ve ölüm nedenleri arasında karaciğer (liver) kanserinin yeri görülmektedir (WHO, 2020b).

Karaciğer kanseri vakalarının %90'undan fazlası hepatosellüler karsinomlardır (HCC). HCC tedavisinde rezeksiyon, transplantasyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi başvurulan yöntemlerdir. Bu yöntemler, sağlıklı hücrelerin zarar görmesi, organ kaybı ve karaciğer yetmezliği gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Günümüzde, HCC tedavisinde doğru ve etkili tedavi yetersizliği nedeniyle yeni potansiyel ilaçların araştırılması ivme kazanmıştır.

Bu projede, daha önce karaciğer kanseri üzerine çalışılmamış olan hünnap (*Ziziphus zizyphus*) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitki ekstraktlarının hepatosellüler karsinom hücre hatlarında antikanserojen etkisinin *in vitro* olarak araştırılmasıyla karaciğer kanseri için alternatif tedavi yöntemi bulunması amaçlanmıştır.

3. Çözüm

Günümüzde, karaciğer kanserinin tedavisi multidisipliner olarak ele alınmaktadır. Bu çoklu yaklaşım, kişiselleştirilmiş bir temelde hastanın sahip olduğu tümör tipine ve evresine bağlı olarak yönlendirilmektedir (Liu ve ark., 2015). Karaciğer kanser tedavisinde rezeksiyon, transplantasyon, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi gibi birçok tedavi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tedavi çeşitleri, her ne kadar başarıya ulaşırsa da bu yöntemler karaciğer kanser hastalarında organ kaybı, sağlıklı hücrelerin kanserleşmesi, karaciğer yetmezliği ve hastanın ölümüne yol açmaktadır. Bu yüzden yalnızca kanser hücrelerini hedef alan, fitoterapi gibi toksik özelliği ve yan etkileri az olan veya bulunmayan yeni yöntemler araştırılmaktadır.

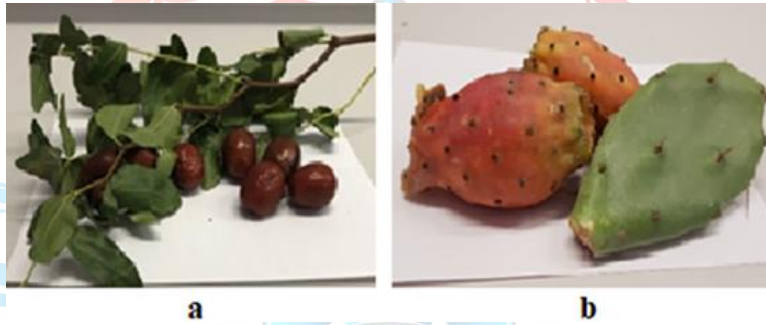
Bu projede ise hepatosellüler karsinoma tedavisinde etkili olacağı düşünülen iki bitki ekstresi incelenmiştir. Hünnap bitkisinin yaprağı ve Hint inciri bitkisinin kladotlarından metanol ekstraksiyon yöntemiyle bitki ekstraktları elde edilip HCC hücre hattı olan SNU-398

ve SNU-475 hücre hatları üzerinde sitotoksikite (MTT), migrasyon ve apoptoz deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, elde edilen bitki ekstraktlarının SNU-398 ve SNU-475 HCC hücre hatları üzerine anti-proliferatif, anti-migrant ve apoptotik özellikler gösterdiği, biyoteknolojik yöntemlerle kanıtlanmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, hünnap bitkisinin yaprağı ve Hint inciri bitkisinin kladot ekstraktlarının; hepatosellüler karsinom (HCC) için alternatif bir tedavi kaynağı olarak umut vadettiği gözlenmiştir.

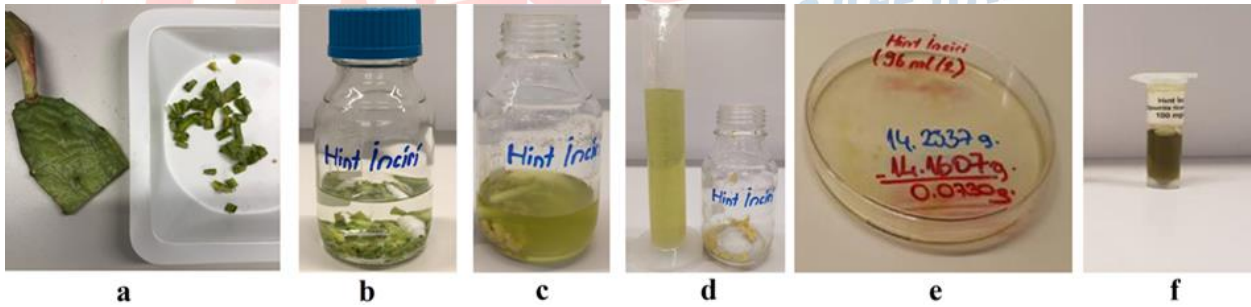
4. Yöntem

Bu projede; ülkemizde yetişen ve doğadan toplanmış olup tanıları, Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi Herbaryum Uygulama ve Araştırma Merkezindeki uzmanlar tarafından konulmuş Hünnap (*Z. zizyphus*) bitkisinin yaprağı ve Hint inciri (*O. ficus-indica*) bitkisinin kladotlarının hepatosellüler karsinom üzerine antikanserojen etkileri (sitotoksik, anti-migrant ve apoptotik) araştırılmıştır.

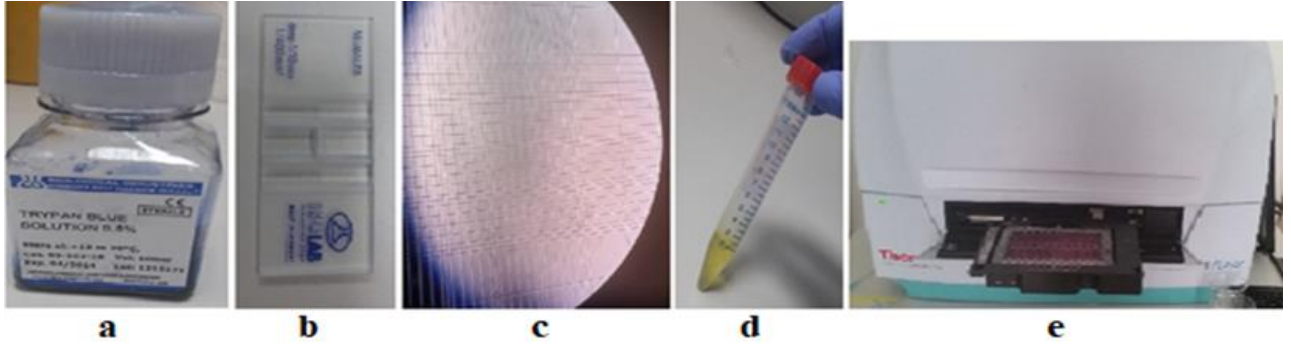


Şekil 2. Hünnap (*Zizyphus zizyphus*) (a) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitkileri (b).

Her iki bitkinin ekstraksiyon işlemi metanol ekstraksiyon yöntemi polar bir çözücü olması nedeniyle tercih edilmiştir ve 100 mg/ml konsantrasyonda bitki ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen bitki ekstraktları, hepatosellüler karsinom (HCC) hücre hatlarında [SNU-398 (ATCC® CRL-2233™) ve SNU-475 (ATCC® CRL-2236™)] MTT, migrasyon ve apoptoz deneylerinde kullanılmıştır.

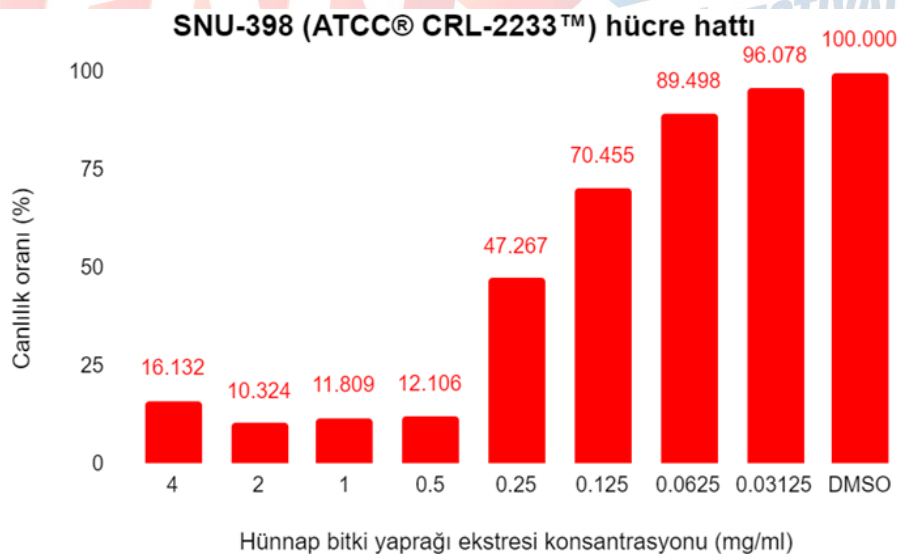


Şekil 3. Hint inciri kladotlarının ekstraksiyon aşamaları. a: kurutulmuş Hint inciri kladotlarının küçük parçalara ayrılması. b: metanol eklenmesi sonucunda ekstraksiyonun başlaması. c: ekstraksiyon sonrası elde edilen solüsyon. d: solüsyonun süzülmesi. e: metanolün uçurulması. f: DMSO'da çözülmüş Hint inciri ekstresi. Aynı işlemler hünnap bitki yaprakları için de uygulanmıştır.

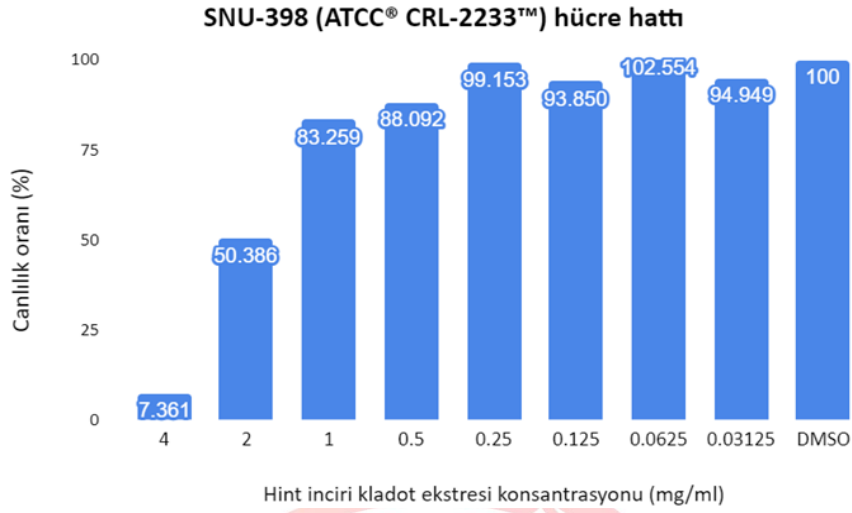


Şekil 4. SNU-398 ve SNU-475 HCC hücre hatlarının MTT testi aşamaları. a, b, c: Trypan Blue boyası ile SNU-475 hücre hattı sayımı; d ve e: MTT ile hücrelerin muamele edilmesi ve mikropilaka okuyucu ile analiz edilmesi.

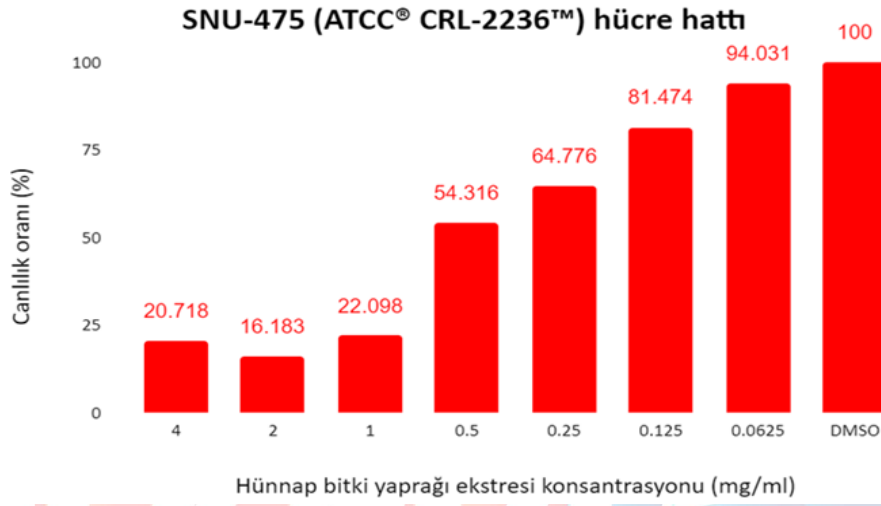
Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstresininin DMSO'da çözülmüş farklı konsantrasyonlarındaki (4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 ve 0,03125 mg/ml) solüsyonlar, SNU-398 ve SNU-475 hücreleri ile 72 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, MTT testiyle kanser hücrelerinin canlılıkları (LC₅₀) saptanmıştır. SNU-398 hücre hattı üzerinde hünnap yaprak ekstresininin LC₅₀ değeri 0,25 mg/ml (%47,267 hücre canlılığı) olurken Hint inciri kladot ekstresininin LC₅₀ değeri 2 mg/ml (%50,386)'dır. SNU-475 hücre hattı üzerinde hünnap yaprak ekstresininin LC₅₀ değeri 0,5 mg/ml (%54,316 hücre canlılığı) olurken Hint inciri kladot ekstresininin LC₅₀ değeri 1 mg/ml (%51,838)'dir. MTT sonuçları değerlendirildiğinde hünnap yaprak ekstresi, Hint inciri kladot eksterine göre sırasıyla 8 ve 2 kat daha etkili olduğu saptanmıştır. Yücel (2018) tarafından yapılan bir araştırmada dağ kekiği bitki ekstresininin karaciğer kanser hücre hattında araştırılmıştır. Bu araştırmada, dağ kekiğinin karaciğer kanseri hücrelerinde etkili LC₅₀ değeri 1-15 mg/ml (µg/µl) bulunmuştur. Bu projede elde edilen bitki ekstreslerinden hünnap yaprağının LC₅₀ değeri dağ kekiği ile karşılaştırıldığında en az 4 en fazla 60 kat daha etkili olduğu; Hint inciri kladot ekstresininin ise en az 2 en fazla 15 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, MTT hücre canlılık testi ile hünnap (*Z. zizyphus*) ve Hint inciri (*O. ficus-indica*) bitkilerinin anti-proliferatif aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır.



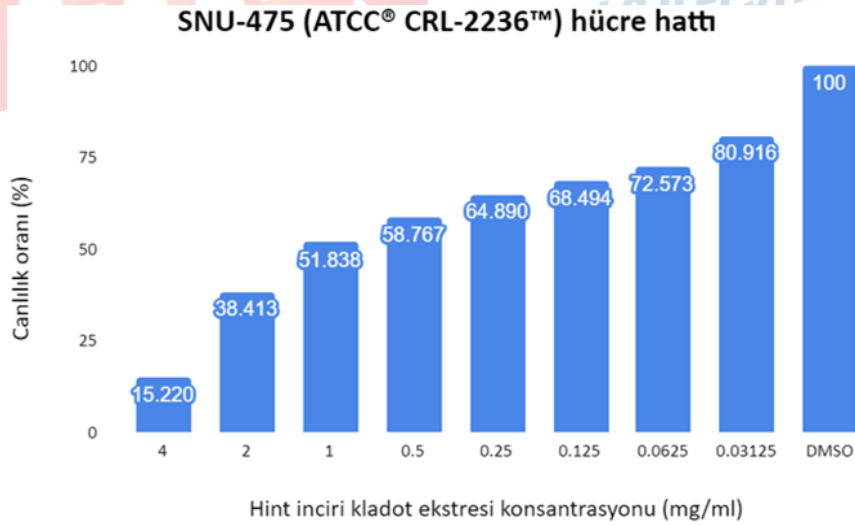
Şekil 5. Hünnap bitki yaprak ekstresininin farklı konsantrasyonlarda SNU-398 hücre hattı canlılıklarına etkisi.



Şekil 6. Hint inciri kladot ekstresinin farklı konsantrasyonlarda SNU-398 hücre hattı canlılıklarına etkisi.

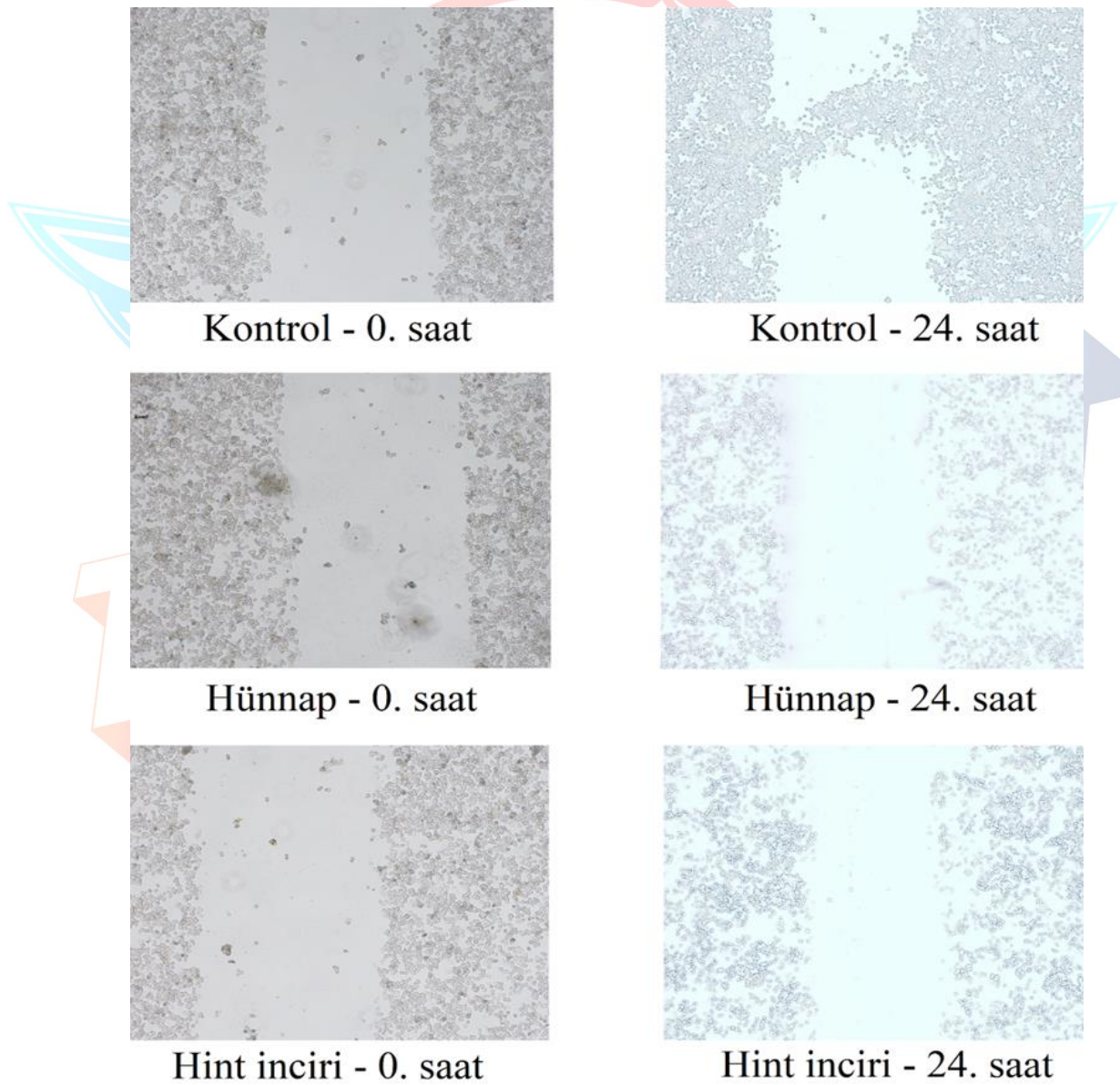


Şekil 7. Hünnap bitki yaprak ekstresinin farklı konsantrasyonlarda SNU-475 hücre hattı canlılıklarına etkisi.



Şekil 8. Hint inciri kladot ekstresinin farklı konsantrasyonlarda SNU-475 hücre hattı canlılıklarına etkisi.

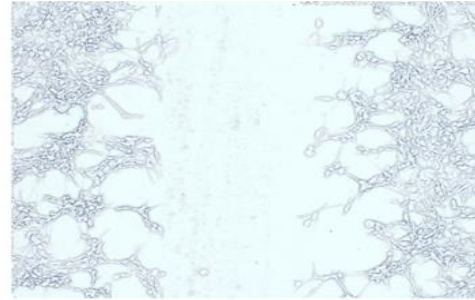
Migrasyon veya *in vitro* çizik tahlili; diğer yöntemlere göre daha kolay, ekonomik ve aynı zamanda geliştirilmiş bir yöntemdir (Liang ve ark., 2007). Bu projede, *in vitro* çizik tahlili ile hünnap ve Hint inciri bitki ekstralarının karaciğer kanser hücrelerinin göçü üzerine etkisi araştırılmıştır. Bölüm 4.2’de bahsedildiği üzere, bu bitki ekstralarının uygulandığı deneylerde 24 saat içerisinde, tam bir göç sağlanmamış, çizik atılan bölge hücreler tarafından kapatılmamış hatta petri kabının sağ ve sol kenarlarında bulunan hücrelerde de seyrelmeler gözlenmiştir (Şekil 10 ve 11). Bu bulgular doğrultusunda, hünnap ve Hint inciri bitki ekstralarının hepatosellüler karsinom hücre hattı olan SNU-398 ve SNU-475 hücre hatları üzerinde anti-proliferatif ve anti-migrant etkinliğinin mevcudiyeti kanıtlanmaktadır. Elde edilen migrasyon deneyleri sonucunda, hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstraları; SNU-398 ve SNU-475 hücre hatları gibi metastatik karaciğer kanser hücrelerinin yayılımcı özelliklerini ortadan kaldırması etkili bir fitoterapik ajan adayı olabileceği kanıtlanmıştır.



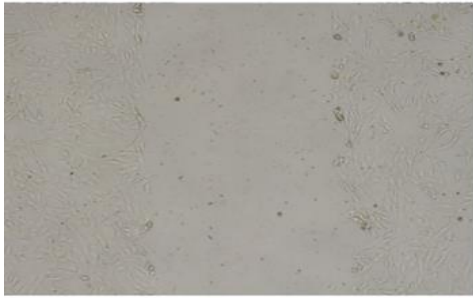
Şekil 9. Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstralarının SNU-398 hücre hattının migrasyon deneylerindeki (*in vitro* çizik tahlili) etkileri.



Kontrol - 0. saat



Kontrol - 24. saat



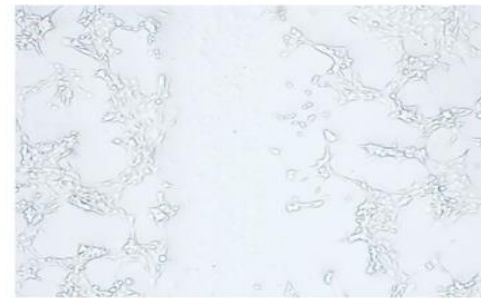
Hünnap - 0. saat



Hünnap - 24. saat



Hint inciri - 0. saat



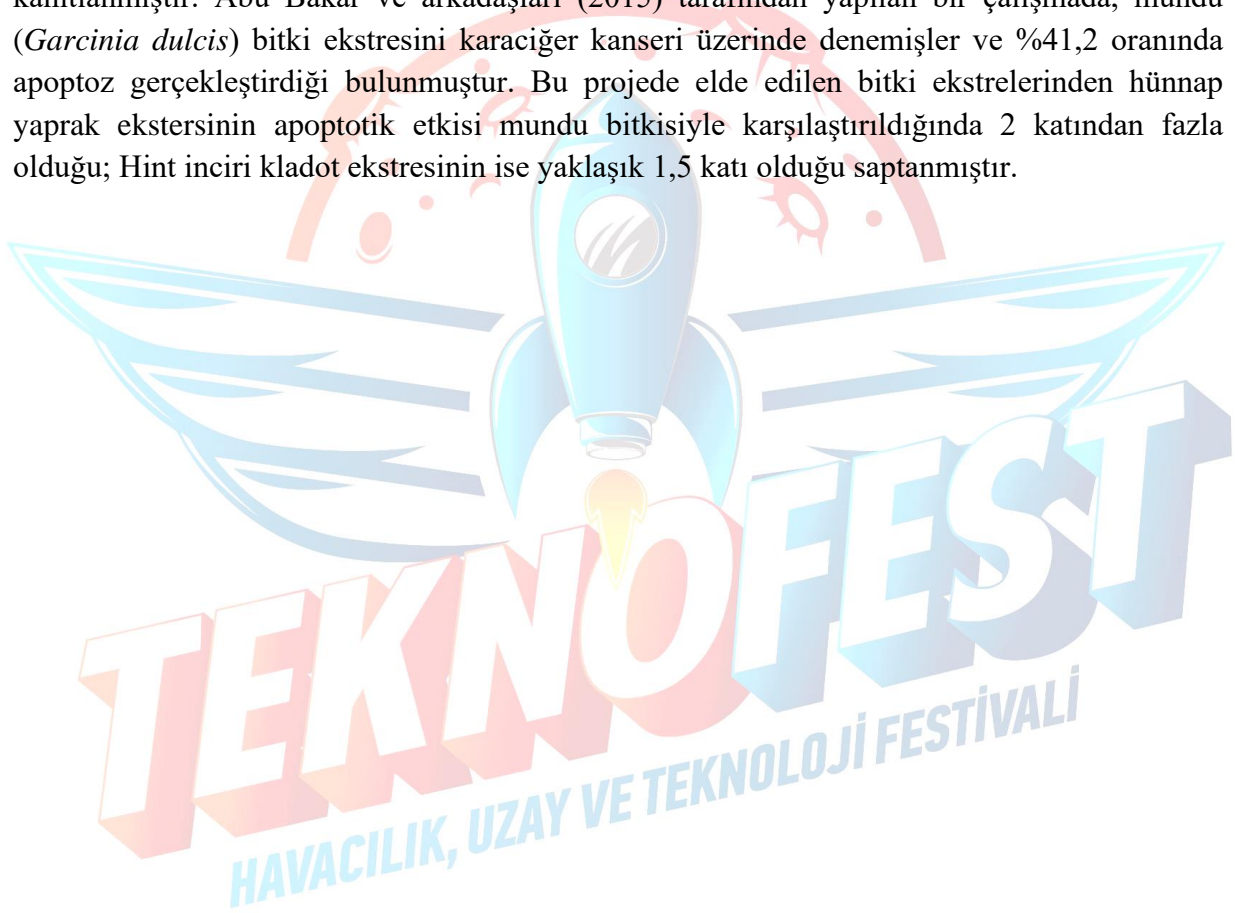
Hint inciri - 24. saat

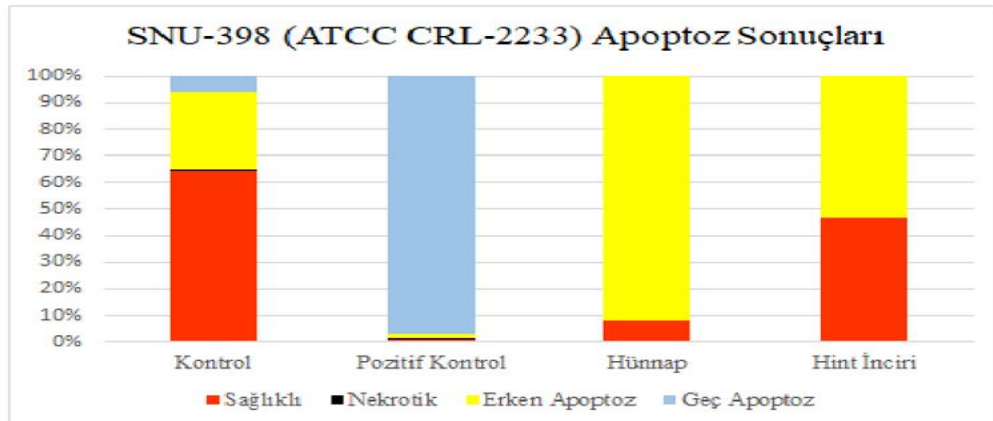
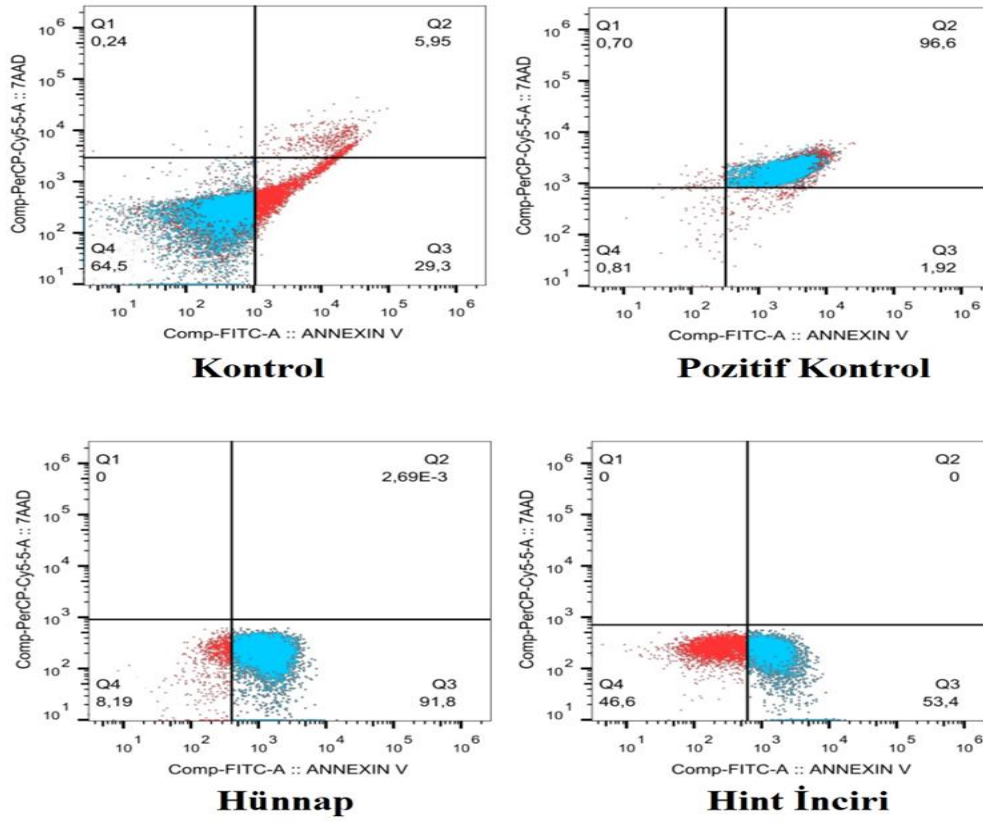
Şekil 10. Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstralarının SNU-475 hücre hattının migrasyon deneylerindeki (*in vitro* çizik tahlili) etkileri.

Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstralarının hepatosellüler karsinom (HCC) hücre hatlarında sitotoksik etkisinin apoptotik olup olmadığı apoptoz testi (Annexin V-FITC) ile araştırılmıştır. Şekil 12’de SNU-398 hücre hattı üzerindeki etkiler incelendiğinde kontrol grubu %64,5 canlılık oranı ve %29,3 erken apoptoz, %5,95 geç apoptoz, %0,24 nekroz gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olan H₂O₂’de %0,81 canlılık oranı ve %1,92 erken apoptoz, %96,6 geç apoptoz, %0,70 nekroz gözlemlenmiştir. Hünnap yaprak ekstresinde %8,19 canlılık oranı ve %91,8 erken apoptoz, %0,01 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Dolayısıyla SNU-398 hücre hattı üzerine hünnap yaprak ekstresinin sitotoksik etkisinin apoptotik olduğu ve hiç nekrotik etki göstermediği bulunmuştur. Hint inciri kladot ekstresinde %46,6 canlılık oranı ve %53,4 erken apoptoz, %0 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Dolayısıyla SNU-398 hücre hattı üzerine Hint inciri kladot ekstresinin sitotoksik etkisinin apoptotik olduğu ve hiç nekrotik etki göstermediği bulunmuştur. SNU-398 hücre hattı üzerindeki tüm sonuçlar incelendiğinde hünnap yaprak ekstresinin Hint inciri kladot ekstresine göre daha yüksek apoptotik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

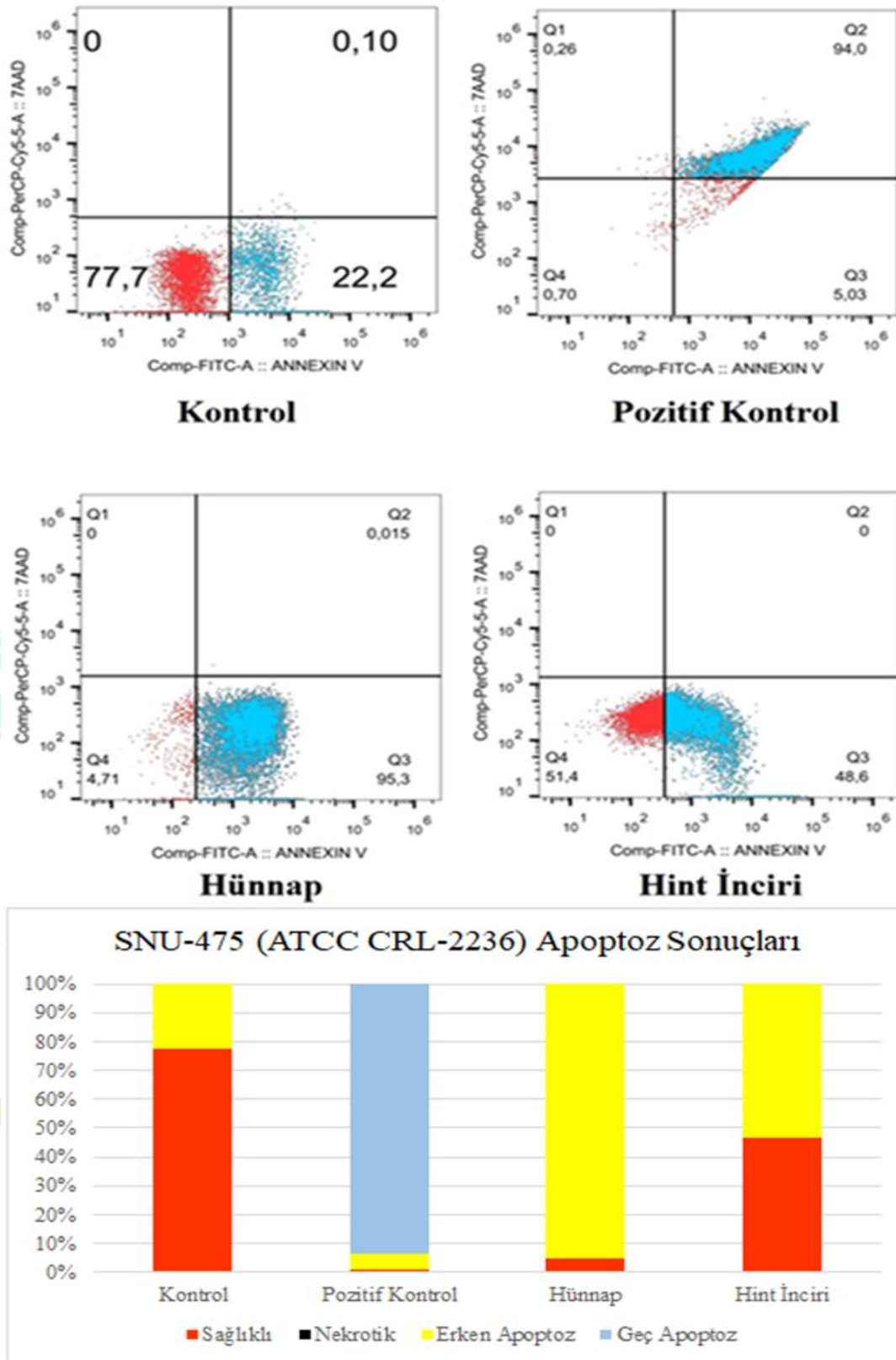
Şekil 12’de, SNU-475 hücre hattı üzerindeki etkiler incelendiğinde kontrol grubu %77,7 canlılık oranı ve %22,2 erken apoptoz, %0,10 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Pozitif

kontrol olan H_2O_2 'de %0,70 canlılık oranı ve %5,03 erken apoptoz, %94,0 geç apoptoz, %0,26 nekroz gözlemlenmiştir. Hünnap yaprak ekstresinde %4,71 canlılık oranı ve %95,3 erken apoptoz, %0,015 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Dolayısıyla SNU-475 hücre hattı üzerine hünnap yaprak ekstresinin sitotoksik etkisinin apoptotik olduğu ve hiç nekrotik etki göstermediği bulunmuştur. Hint inciri kladot ekstresinde %51,4 canlılık oranı ve %48,6 erken apoptoz, %0 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Dolayısıyla SNU-475 hücre hattı üzerine Hint inciri kladot ekstresinin sitotoksik etkisinin zayıf apoptotik olduğu ve hiç nekrotik etki göstermediği bulunmuştur. SNU-475 hücre hattı üzerindeki tüm sonuçlar incelendiğinde hünnap yaprak ekstresinin Hint inciri kladot ekstresine göre çok daha yüksek apoptotik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Apoptoz sonuçları değerlendirildiğinde hünnap ve Hint inciri bitki ekstrelerinin karaciğer kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Abu Bakar ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, mundu (*Garcinia dulcis*) bitki ekstresini karaciğer kanseri üzerinde denemişler ve %41,2 oranında apoptoz gerçekleştirdiği bulunmuştur. Bu projede elde edilen bitki ekstrelerinden hünnap yaprak ekstresinin apoptotik etkisi mundu bitkisiyle karşılaştırıldığında 2 katından fazla olduğu; Hint inciri kladot ekstresinin ise yaklaşık 1,5 katı olduğu saptanmıştır.





Şekil 11. Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstralarının SNU-398 hücre hattı üzerindeki apoptoz test sonuçları.



Şekil 12. Hünnap yaprağı ve Hint inciri kladot ekstralarının SNU-475 hücre hattı üzerindeki apoptoz test sonuçları.

Sonuç olarak, hünnap (*Zizyphus zizyphus*) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitkilerinin karaciğer kanseri üzerine antikanserojen etkilerinin ilk defa araştırıldığı bu projede; iki farklı hepatosellüler kanser hattı üzerine anti-proliferatif, anti-migrant ve apoptotik

özellikler taşıyan bitki ekstraları elde edilmiştir. Günümüzdeki hepatosellüler karsinoma tedavisinde doğru ve etkili tedavi seçeneği yetersizliği göz önüne alındığında; hünnap ve Hint inciri bitki ekstralarının karaciğer kanserinin fitoterapötik tedavisinde umut vadettiği *in vitro* olarak kanıtlanmıştır.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

SNU-398 hücre hattı üzerinde yapılan deneylerde Hünnap yaprak ekstresi %8,19 canlılık oranı ve %91,8 erken apoptoz oranı gösterirken Hint inciri kladot ekstresinde %46,6 canlılık oranı ve %53,4 erken apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Aynı prosedürler SNU-475 hücre hattı üzerine uygulandığında ise Hünnap yaprak ekstresinde %4,71 canlılık oranı ve %95,3 erken apoptoz, %0,015 geç apoptoz, %0 nekroz; Hint inciri kladot ekstresinde %51,4 canlılık oranı ve %48,6 erken apoptoz, %0 geç apoptoz, %0 nekroz gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda bu projede, hünnap ve Hint inciri bitkilerinin hepatosellüler karsinom üzerine antikanserojen etkileri ilk defa araştırılmıştır. Ayrıca iki bitki ekstresinin de hepatosellüler karsinom hücre hatları üzerinde, daha önce yapılmış benzer çalışmalara kıyasla daha yüksek oranda erken apoptotik özellik gösterdiği ve nekrotik özellik göstermediği keşfedilmiştir. Bu da kanserleşmiş hücrelerin kontrollü ölümünün sağlanması ve sağlıklı hücrelerin zarar görmemesi için oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, hünnap (*Ziziphus zizyphus*) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitkilerinin iki farklı hepatosellüler karsinom hattı üzerine (SNU-398 VE SNU-475) antikanserojen etkileri, bu projenin başvuru tarihi itibarıyla literatürde mevcut değildir. Bu fikir, ilk defa bu projede ortaya konmuş ve anti-proliferatif, anti-migrant ve apoptotik özellikler taşıyan bitki ekstraları elde edilmiştir. Günümüzde, hepatosellüler karsinoma tedavisinde doğru ve etkili tedavi seçeneği yetersizliği göz önüne alındığında; hünnap ve Hint inciri bitki ekstralarının karaciğer kanserinin fitoterapötik açıdan desteklenmiş tedavisinde umut vadettiği *in vitro* olarak kanıtlanmıştır.

6. Uygulanabilirlik

- Bu projede, hünnap (*Ziziphus zizyphus*) ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitki ekstralarının SNU-398 ve SNU-475 hücre hatları üzerindeki etkilerinin araştırılmasıyla hepatosellüler karsinoma tedavisinde kullanılabilecek alternatif antikanserojen etki yaratılıp yaratılamadığı gözlemlenebilir.
- Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu bitki ekstralarının; HCC dışındaki diğer kanser hücre hatları üzerinde, antimikrobiyal, antifungal ve antiviral etkinliklerinin de araştırılması önerilmektedir. Ayrıca her iki bitki ekstresinin apoptotik etkinliğinin hangi biyokimyasal moleküller tarafından gerçekleştirildiğinin kanıtlanması için ileri saflaştırma işlemlerine tabii tutulmaları planlanmaktadır. Daha sonra, saflaştırılan moleküllerin kanserleşmede önemli olan Wnt/ β -katenin sinyal iletim yollarındaki etkinliğinin araştırılması ve buradan çıkacak sonuçlar neticesinde ilgili moleküllerin ilaç faz çalışmalarına başlanması hedeflenmektedir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Bu projede, hünnap (*Ziziphus zizyphus*) bitki yaprağı ve Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) bitki kladotları araziden toplanmış olup Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi Herbaryum Uygulama ve Araştırma Merkezindeki uzmanlar tarafından tanıları konulmuştur (Şekil 2).

Bitki ekstraksiyon işlemlerinde okul laboratuvarında bulunan etüv (Isolab), havan (Isolab), analitik terazi (Daihan Biomedical), besiyeri şişesi (Isolab), manyetik karıştırıcı (Daihan MSH-20A), manyetik balık (20 mm, Isolab), metanol (Carlo Erba), Whatmann NO 1 filtre kağıdı (Sigma Aldrich), mezür (Isolab), huni (Isolab), petri kapları (Isolab), ependorf tüp (Isolab) ve DMSO (Carlo Erba) cihaz ve kimyasalları kullanılmıştır.

Anti-kanser deneylerinde; masaüstü santrifüj (Thermo Fisher), laminar kabinet (Thermo Scientific MSC Advantage), CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific Steri Cycle), su banyosu (Nüve NB9), sallamalı karıştırıcı (Labnet), sıvı azot hücre saklama tankı (Thermo Cryoplus 2), hassas terazi (Sartorius GE512-0CE), analitik terazi (Sartorius GC1603 S-0CE), mikropilaka okuyucu (Thermo Varioskan® Flash), hücre kültürü petri kabı (Corning), PBS, MTT (5mg/ml steril PBS içinde), DMSO (Dimetil sülfoksit), RPMI 1640 (Gibco 11875-093, %10 FBS), Fetal Bovine Serum (FBS), Metanol, Tripsin %0,25 EDTA, cyrstal violet, glutaraldehit kullanılmıştır.

Tablo 1. Bu proje kapsamında gerçekleştirilen işler tanımı ve süreçleriyle birlikte aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

İşin Tanımı	AYLAR							
	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat
Literatür Taraması	X	X	X	X	X	X	X	X
Laboratuvar Çalışması		X	X	X	X	X	X	
Verilerin Toplanması ve Analizi		X	X	X	X	X	X	
Proje Raporu Yazımı				X	X	X	X	X
Dönemsel Harcama Planı		SNU-398 ve SNU-475 hücre hattı	Hünnap ve Hint inciri					

Tablo 2. Proje kapsamında kullanılan malzemeler ve fiyatları sunulmaktadır.

Malzeme	Harcama
SNU-398 hücre hattı (CRL-2233™)	14.308,85TL (€897.00 EA)
SNU-475 hücre hattı (CRL-2236™)	14.308,85TL (€897.00 EA)
Hünnap	14,86TL/kg (Bu projede ücretsiz temin edilmiştir.)
Hint inciri (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	25,81TL (Fidan fiyatı) (Bu projede ücretsiz temin edilmiştir.)

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Karaciğer kanseri, en sık görülen 6. kanser çeşidi olduğundan ve kanser kaynaklı ölümler arasında da 2. sırada yer aldığından global bir sorundur (WHO, 2020b). Hepatosellüler Karsinom (HCC) ise primer karaciğer kanserlerinin en sık rastlanan, teşhis ve ölüm oranı en fazla olan çeşididir (Mejia ve Pasko, 2020; McGlynn ve ark., 2020). Hepatit B, Hepatit C enfeksiyonları, karaciğer fibrozisi ya da sirozuna sahip olmak, obezite ya da tip 2 diyabet hastası olmak, beslenme tarzı, fazla alkol tüketimi, sigara-tütün ürünlerinin, aflatoksin bulaşmış yiyeceklerin tüketimi hepatosellüler karsinomun başlıca risk faktörleridir (Dhar ve ark., 2020; McGlynn ve ark., 2020). İleri yaş, yaşanan coğrafya ve cinsiyet ile değişkenlik gösterebilen risk faktörleriyle birlikte HCC'nin görülme sıklığı daha da artmaktadır. HCC'nin yüksek prevalansa (görülme oranı) sahip oluşu bu proje fikrinin hedef kitlesinin belirli bir kesimle sınırlı kalmadığını ve dünya nüfusuna hitap ettiğini göstermektedir.

9. Riskler

Bu projede, hepatosellüler karsinoma tevavisinde etkili olacağı düşünülen iki bitki ekstresi incelenmiştir. Projenin deney fazları kısmında ortaya çıkabilecek risk faktörlerinden en önemlisi bitki ekstralarının hücre canlılığı üzerinde etkisi gözlenememesi olacaktır. Saflık veya ekstrasyon derecelerinin yetersiz gelme ihtimaline karşı alınabilecek önlem olarak, deneyler her iki bitki ekstresi için de farklı derişimler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ardından Hünnap bitkisinin yaprağı ve Hint inciri bitkisinin kladotlarından metanol ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen bitki ekstraktlarının HCC hücre hattı olan SNU-398 ve SNU-475 hücre hatları üzerinde sitotoksisite (MTT), migrasyon ve apoptoz deneyleri uygulanmıştır. Bir diğer risk faktörü ise bitki ekstralarının uygulandığı çizik testi gibi deney ortamlarında yeterli hücre apoptozu gözlenememesi veya migrasyon sağlanamaması olabilirken, bu ihtimali ortadan kaldırmak adına deneyler tekrarlı gerçekleştirilmiş ve hata payı düşürülmüştür. Böylece elde edilen bitki ekstralarının HCC hücre hatları üzerine anti-proliferatif, anti-migrant ve apoptotik özellikler gösterdiği, biyoteknolojik yöntemlerle kanıtlanmıştır.

10. Kaynaklar

- Abdelmoneem, M. A., Mahmoud, M., Zaky, A., Helmy, M. W., Sallam, M., Fang, J.-Y., Elkhodairy, K. A ve Elzoghby, A. O. (2018). Dual-targeted casein micelles as green nanomedicine for synergistic phytotherapy of hepatocellular carcinoma. *Journal of Controlled Release*. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.08.026
- Abu Bakar, M. F., Ahmad, N. E., Suleiman, M., Rahmat, A., ve Isha, A. (2015). *Garcinia dulcis* fruit extract induced cytotoxicity and apoptosis in HepG2 liver cancer cell line. *BioMed research international*, 2015. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1155/2015/916902
- Aksoy, S. Ö. (2010). Hepatosellüler kanserde karaciğer nakli ve karaciğer rezeksiyon tedavilerinin karşılaştırılması. (Yayımlanmış doktora tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- Akyıldız, Ü., Yalçın, K. S. ve Türkay, F. C. (2011). Hepatosellüler Karsinom Tedavisi. Erişim Tarihi: 12.12.2020. Erişim adresi: <http://guncel.tgv.org.tr/journal/38/pdf/100030.pdf>
- Ameh, S. J., Obodozie, O. O., Inyang, U. S., Abubakar, M. S. ve Garba, M. (2010). Current phytotherapy-A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 072-081. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.5897/JMPR09.005
- Anwanwan, D., Singh, S., Singh, S., Saikam, V. ve Singh, R. (2020). Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews On Cancer*, 1873(1), 188314. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314
- Aslam, M.S., Naveed, S., Ahmed, A., Abbas, Z., Gull, I., Athar, M.A. (2014), Side effect of chemotherapy in cancer patients and evaluation of patients opinion about starvation based differential chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 5, 817 – 822. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.4236/jct.2014.58089
- Barnes, L. (2013). Principles and practice of phytotherapy. *Journal of the Australian Traditional-Medicine Society*, 19(3), 179-180. Erişim Tarihi: 12.12.2020. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/phytotherapy>
- Batista Ferreira, E. C., Vila Nova, I. C., de Almeida, W. A., dos Santos Albuquerque, F. M., dos Santos Cruz, G., da Costa, H. N., ... ve Pontual, E. V. (2021). *Opuntia ficus-indica* cladode extract is an embryotoxic, larvicidal, and oviposition-deterrent agent for the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105351
- Chabner, B.A., ve Roberts Jr., T.G. (2005), Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 65-72. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1038/nrc1529
- Chen, Z., Xie, H., Hu, M., Huang, T., Hu, Y., Sang, N. ve Zhao, Y. (2020). Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *American Journal of Cancer Research*, 10(9), 2993. Erişim Tarihi: 10.12.2020. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7539784/pdf/ajcr0010-2993.pdf>
- Conde, J., de la Fuente, J.M., Baptista, P.V. (2013), Nanomaterials for reversion of multidrug resistance in cancer: a new hope for an old idea? *Frontiers in Pharmacology*, 4(134): 1

- 5. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.3389/fphar.2013.00134
- Çetinkaya, M. ve Şahin, S. (2020). Kanser ve Ergoterapi. *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(2), 14-24. Erişim Tarihi: 10.12.2020. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1170867>
- de Vlieghere, E., Carlier, C., Ceelen, W., Bracke, M., De Wever, O. (2016), Data on in vivo selection of SK-OV-3 Luc ovarian cancer cells and intraperitoneal tumor formation with low inoculation numbers. *Data in Brief*, 6, 542 – 549. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.037
- Dearnaley, D.P., Khoo, V.S., Norman, A.R., Meyer, L., Nahum, A., Tait, D., Yarnold, J. Ve Horwich, A. (1999), Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *The Lancet*, 23;353(9149):267-272. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1016/S0140-6736(98)05180-0
- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., ve Brenner, D. A. (2020). Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 245(2), 96–108. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1177/1535370219898141
- El Maaiden, E., El Kharrassi, Y., Qarah, N. A., Essamadi, A. K., Moustaid, K., ve Nasser, B. (2020). Genus *Ziziphus*: A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 112950. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.jep.2020.112950
- Fu, J., ve Wang, H. (2018). Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China. *Cancer letters*, 412, 283-288. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.008
- Güven, C. (2017). Doğu Akdeniz Bölgesi'nden Selekte Edilen Bazı Dikenli İncir (*Opuntia ficus-indica* [L.] Mill.) Genotiplerine Ait Meyve Sularının Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi (Yayımlanmış yüksek lisans tezi). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Heinrich, M. (2017). Phytotherapy. Erişim Tarihi: 20.12.2020. Erişim adresi: <https://www.britannica.com/science/phytotherapy>
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., ve Tuma, F. (2020). Physiology, liver. *StatPearls* [Internet]. Erişim Tarihi: 04.12.2020. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
- Karahan, F., ve İlçim, A. (2017). The potential benefits of medicinal and aromatic plants in cancer patients undergoing radiotherapy. *Biological Diversity and Conservation*, 10(2), 51-61. Erişim Tarihi: 04.12.2020. Erişim adresi: <https://openaccess.mku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12483/2722>
- Kuo, M. T. (2009). Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 11(1), 99-133. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1089/ars.2008.2095
- Liang, C. C., Park, A. Y. ve Guan, J. L. (2007). in vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1038/nprot.2007.30
- Liu, C. Y., Chen, K. F., ve Chen, P. J. (2015). Treatment of liver cancer. *Cold Spring Harbor*

- perspectives in medicine, 5(9), a021535. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1101/cshperspect.a021535
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L. ve El-Serag, H. B. (2020). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 10.1002/hep.31288. Çevrimiçi yayın. doi: 10.1002/hep.31288
- Mejia, J. C. ve Pasko, J. (2020). Primary Liver Cancers. *Surgical Clinics of North America*. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.suc.2020.02.013
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nooter, K. ve Stoter, G. (1996). Molecular Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Pathology-Research and Practice*, 192(7), 768–780. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/s0344-0338(96)80099-9
- Özkan, A. (2020). Fitoterapi, Kanser Tedavisinin Yan Etkilerini Azaltabiliyor. Erişim Tarihi: 20.12.2020. Erişim adresi: <http://www.yeditepehastanesi.com.tr/fitoterapi-kanser-tedavisinin-yan-etkilerini-azaltabiliyor>
- Pandayarajan, V., Govalan, R. ve Yang, J. D. (2021). Risk Factors and Biomarkers for Chronic Hepatitis B Associated Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 479. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.3390/ijms22020479
- Peate, I. (2019). Liver cancer. *British Journal of Healthcare Assistants*, 13(7), 322–328. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.12968/bjha.2019.13.7.322
- Seri, C. S., Okpekon, T. A., Yao-Kouassi, P. A., Magid, A. A., Sayagh, C., ve Voutquenne-Nazabadioko, L. (2020). Saponins and flavonoid glycosides from the leaves of *Ziziphus mauritiana* Lam. native of a forest area of Ivory Coast. *Phytochemistry Letters*, 37, 5-9. Çevrimiçi önyayın. doi: 10.1016/j.phytol.2020.03.001
- Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü. ve Demirel, G. Y. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Türk J Immunol* 2013;1(3):74-89 Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.5606/tji.2013.267
- Ventura-Aguilar, R. I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S., ve Rivera-Cabrera, F. (2017). Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5065-5073. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1002/jsfa.8493
- Wang, N., Feng, Y., Zhu, M., Tsang, C.-M., Man, K., Tong, Y. ve Tsao, S.-W. (2010). Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: The cellular mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(6), 1426–1436. Çevrimiçi ön yayın. doi:10.1002/jcb.22869
- Wang, W. ve Wei, C. (2020). Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes & Diseases*. 308-319. Çevrimiçi ön yayın. doi: 10.1016/j.gendis.2020.01.014
- WHO (2020b) The Global Cancer Observatory. Erişim tarihi: 05.12.2020. Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- WHO (2021). Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. Erişim tarihi:

- 05.01.2021. Erişim adresi: <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/8/07-042820/en/>
WHO, (2020a). Cancer. Erişim tarihi: 05.12.2020. Erişim adresi: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Yurtsever, S. G., Kaya, S., Arkalı, T., Müderris, T., Günaydın, P. ve Kkzeybek, Y. (2020). Medikal Onkoloji Hastalarında Hepatit B Seroprevelansı. Nobel Medicus, 16(3): 29-34. Erişim tarihi: 05.01.2021. Erişim adresi: <https://www.nobelmedicus.com/Content/1/48/29-34.pdf>
- Yücel, D. (2018). Cytotoxic effects of Satureja cuneifolia extract in liver cancer cell line (HepG2). Biological Diversity and Conservation, 11(2), 42-46. Erişim Tarihi: 03.01.2021. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1181532>
- Zamur, C., ve Topal, U. (2020). Çocuklarda ve Eriřkinlerde Hepatosellüler Karsinom Aynı Biyolojik Davranışa mı Sahip? Pediatrik ve Yetiřkin Hastaların Histolojik, Moleküler Arka Plan ve Tedavi Açısından Karşılaştırılması. Editörler: Cem Everekliođlu ve Metin nl, Gece Kitaplığı, 1-12.

