TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

İNSANLIK YARARINA TEKNOLOJİ YARIŞMASI
PROJE DETAY RAPORU

PROJE ADI: Paklitaksel ile Kombine Edilmiş Zeytin(*Olea europaea*) Embriyo Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Soyları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

TAKIM ADI: COMPOLIVE

KATEGORİ: Sağlık-İlk Yardım

Başvuru ID: 398556

TAKIM SEVİYESİ: Üniversite

DANIŞMAN ADI: Serpil KORKMAZ

İçindekiler

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ 1
İçindekiler 2
1-Proje Özeti (Proje Tanımı) 3
2-Problem Durumunun Tanımlanması 3
3- Çözüm 4
4- Yöntem 4
- **Olea europaea (Zeytin) meyvesinden embriyolarının elde edilmesi** 4
- **Zeytin çekirdeği embriyosundan ekstrakt eldesi** 4
- **Zeytin çekirdeği embriyosu ve zeytin yaprağındaki oleuropein konsantrasyonunun belirlenmesi** 5
- **Oleuropein miktarının zeytin yaprağıyla kıyaslanması** 5
- **Sitotoksisite Çalışmaları** 5
- **Hücre Kültürü** 5
- **Hücre Soylarının Pasajlanması** 5
- **Kullanılan besi yerinin hazırlanması** 6
- **Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı** 6
- **SRB (Sulforhodamine B) Metodu** 6
- **Anti-kanser Aktivite SRB (Sulforhodamine B) Analiz Sonuçları** 7
- **Canlılık hesabı(%)** 7
- **Morfolojik Değerlendirme** 8
- **Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi** 8

5-Yenilikçi (İnovatif) Yönü 8
6- Uygulanabilirlik 8
7-Maliyet Hesabı 9
8-Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar) 9
9-Riskler 9
B Planı 9
10-İş –Zaman Takvimi(Proje Süreci) 10
11-Kaynaklar 10
12-Proje Ekibi 12
13- Proje süreci görselleri 13

1-Proje Özeti (Proje Tanımı)

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların etkinliğini artırma yönündeki Ar-Ge çalışmaları dünya çapında devam etmektedir. Bu çalışmada; Olea europaea embriyolarından elde edilen ekstraktın anti-kanser aktivitesinin belirlenmesi, kemoterapi ilaçlarının dozunun düşürülmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya başlarken yapılan kromotografik analizlerde zeytin yaprağındaki ve embriyosundaki oleuropein değerleri incelenmiş, etken maddenin oleuropein'in öncü maddesi olduğu fikrine ulaşılmıştır. İn vitro deneylerde *Olea europaea* embriyolarından elde edilen ekstraktın anti-kanser etkisini ispatlamak için farklı kanser hücre soyu (A-549, HeLa, HT-29, MCF-7) üzerinde SRB (Sulforhodamine B) metodu kullanarak sitotoksik etki araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu 400µg embriyo ekstraktı uygulandığında hücre canlılık oranı en düşük MCF-7 hücrelerinde %59,726; en yüksek A-549 hücrelerinde %97,867 olarak belirlenmiştir. 800 µg/ml embriyo ekstraktında ise en başarılı olunan hücre grubu MCF-7 hücrelerinde canlılık oranı %31,209; en başarısız olunan hücre grubu ise HT-29 hücre soyu olmuştur. MCF 7 hücre hattında alınan sonuçlar olumlu bulunduğu için ileri düzey analizlerde MCF-7 ve meme kanserinin agresif türevlerinden MDA-MB-231 hücre soyu kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ekstre + paklitaksel kombinasyonunun çeşitli dozları ile kullanılmış ve sinerjistik bir etki gözlenmiştir. MCF-7 hücre hattında paklitaksel 3,98µM oranında %14,66 canlılık gösterirken 400µg ekstrakt + paklitaksel 3,98µM'de canlılık %9,91'e düşürülmüştür; MDA-MB231 hücre hattında ise paklitaksel 3,98µM oranında %21,98 canlılık gösterirken 400µg ekstrakt + paklitaksel 3,98µM oranında canlılık %11,19'a düşürülmüştür. 400 µg öncül oleuropein ile yapılan deneylerde en verimli sonuç 3,98µM paklitaksel ile MCF-7 hücre hattında %9,91 olarak kaydedilmiştir. MDA-MB231 hücre hattında Taxol 3,98µM %31,73 canlılık gösterirken 800µg ekstrakt + paklitaksel 3,98µM'de canlılık %5,41 düşürülmüştür. Flüoresans boyama yönteminde ise bu etkinin apoptoz kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

2-Problem Durumunun Tanımlanması

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden mikrop veya tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Kemoterapi ilaçları, etki özellikleriyle ilgili olarak, bireyde rahatsız edici bir dizi yan etkilere yol açabilmektedir (Thompson ve ark. 1997, White 2001). Bu durum kemoterapi ilaçlarının hızlı büyüyen hücrelerini öldürmesinin yanı sıra sağlıklı vücut hücrelerine de zarar vermesinden kaynaklanmaktadır. Sağlıklı hücrelerin zarar görmesi bazı yan etkilere neden olur. Kemoterapinin bireyde görülen yan etkileri, ilaçların özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte; bulantı, kusma, iştahsızlık, kemik iliği baskılanması (anemi, lökopeni, trombositopeni), saç dökülmesi, mukozit, cilt problemleri, uykusuzluk, nörolojik problemler, ağrı, göz problemleri, halsizlik, yorgunluk şeklinde belirtilebilir (Craddock 1999, Flyge 1993, Miller ve Kearney 2001, Nagel 2004, Platin 1996). Mevcut kanser tedavileri arasında kemoterapi, radyoterapi ve alternatif tedavi yöntemleri

bulunmaktadır. Fakat bu tedavi seçenekleri hastaları maddi, manevi ve psikolojik olarak yormakla beraber tedavi yöntemleri bireyin sağlık durumunu daha ciddi seviyelere taşıyabilmektedir.

3- Çözüm

Anti-kanser olarak bilinen ve üzerinde pek çok araştırma yapılan bitki zeytin (*Olea europaea L.*) ve zeytinyağında bulunan antioksidanlar arasında anti-tümör aktiviteden sorumlu ana bileşiğin oleuropein olduğu bildirilmektedir. Yapılan HPLC analizlerinde zeytinin tüm kısımlarından daha fazla ve etkili oleuropein tespit edilmiştir. Zeytin çekirdeğinin bütün olarak tedavide kullanılması yeterince verimli değildir. Kabuk kısmı hemiselülozik yapıda olup, embriyoya kıyasla oleuropein açısından oldukça fakirdir. Bu nedenle öz niteliğindeki çekirdek içeriği tercih edilmiştir.Çalışmamızda daha önce atık ve enerji alanında geri dönüşüme kazandırılan zeytin çekirdeğinin içindeki embriyo bünyesinde bulunan oleureropeinin program hali kullanılmıştır. Tüm dünyada yan etkileri dolayısıyla tedavi sürecinde kemoterapi ajanlarının kullanımının azaltılması yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Çalışmamızda zeytin embriyosunun anti-kanser özelliği tespit edildikten sonra kanser tedavisi sırasında kemoterapi ilacı ile birlikte kullanılıp, ilacın dozunun azaltılması amaçlanmıştır. Zeytin embriyo ekstraktı ile bir kemoterapi ajanı olan taksan grubu ilaçlarından paklitaksel kullanılmıştır. Paklitaksel, *Taxus brevifolia* (Porsuk ağacı)'nın kabuklarından izole edilen doğal diterpendir. Bitkisel kökenli kanser ilacı Paklitaksel ile birlikte zeytin embriyosundan elde edilen içerik meme kanseri hücre soyları üzerinde denenmiş; sinerjik bir etki tespit edilmiştir. Yani kullanılan ilacın dozu düşürülmüş;sitotoksik etki sağlıklı hücrelerde değil kanserli hücrelerde olmuştur.Hücrelerin ölüm şekli apoptotik olup; tedavide istenilen şekildedir.

4- Yöntem

Olea europaea (Zeytin) meyvesinden embriyolarının elde edilmesi

Ekim-Kasım ayları arasında toplanmış ve hiçbir şekilde işlem görmemiş Ayvalık türü zeytin meyveleri (Şekil 1. A.). *Olea europaea* türüne ait 150 kilogram zeytinin embriyolarına zarar vermeyecek şekilde çekirdekleri parçalanmıştır (Şekil 1. B.).

Zeytin çekirdeği embriyosundan ekstrakt eldesi

Zeytin çekirdek embriyosu ekstraktı eldesi saf metanol ve hekzan kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çekirdek kabukları ve embriyolar ayrılarak zaman kaybetmeden 34^0C'lik etüve yerleştirilmiş, 12 saat boyunca kurutulmuştur. Tamamen kurutulmuş örnekler kısa süre sonra homojenizatörden geçirildikten sonra toz halindeki kuru numunelerden 5,00 g alınıp 50 mL, metanol ve hekzan eklenmiş, karışım 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Her karışım ağzı kapalı şekilde 24 saat bekletildikten sonra kaba filtre kâğıdı ile süzülmüştür (Şekil 2.). Süzüntüden soxhlet cihazında ekstraksiyona tabi tutulmuş; rotary evaporatörde metanol ve hekzandan arındırılıp, ekstre elde edilmiştir. Elde edilen sıvı embriyo ekstraktı daha sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutularak toz haline getirilmiştir (Şekil 3.).

Zeytin çekirdeği embriyosu ve zeytin yaprağındaki oleuropein konsantrasyonunun belirlenmesi

Erken hasat döneminde toplanan zeytin yaprağı ve embriyo ekstraktlarının Oleuropein bileşiğinin konsantrasyonları HPLC cihazı kullanılarak kromatografik yöntemle belirlenmiştir. Oleuropein konsantrasyonları Agilent Technologies EZChrom Elite Version marka HPLC cihazı (Şekil 4.) ile C-18 silikajel kolon kullanılarak UV dedektör ile 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Deneyde mobil faz olarak asetonitril ve su kullanılmıştır. Sonuçlar mg/mL olarak ifade edilmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktı referans olarak Kale Extract markasından tedarik edilmiştir.

Oleuropein miktarının zeytin yaprağıyla kıyaslanması

Oleuropein standart çözeltileri 0,03125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,500 mg/mL, 1.00 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmış, standart çözeltilerden 5 µL alınıp HPLC ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Zeytin embriyosunda ki oleuropein miktarı yaklaşık 0,075±0,015 iken zeytin yaprağında yaklaşık 0,063±0,017'dir (Analiz Bursa Gıda Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.)(Şekil 5.).

Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite çalışmaları Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji bölümünde bulunan Bursa Uludağ Kanser Araştırma Laboratuvarında (BUKAL) gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü, kontrollü şartlar altında hücrelerin bölünüp çoğalmasını kapsayan bir süreçtir. Çalışmamızda aşağıdaki tabloda gösterilen insan kanser hücre soyları kullanılmıştır. İnsan kolon kanseri hücreleri (HT-29), akciğer kanseri hücreleri (A549), serviks kanseri hücreleri (HeLa), meme kanseri (MCF7, MDA-MB-231) hücre soyları kullanıldı (Tablo 1.). Kanser hücre soyları American Type Culture Collection (ATCC)'den ticari olarak temin edilmiştir. Kullanılan hücre soyları aşağıdaki tabloda verilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7 Hücre hattından gelen sonuçlara göre çalışmaya eklenmiştir.

Kullanılan Hücre Soyu	Hücre Kodu
Akciğer kanseri hücre soyu	A-549
Serviks kanseri hücre soyu	HeLa
Kolon kanseri hücre soyu	HT-29
Meme kanseri hücre soyu	MCF-7
Meme kanseri hücre soyu	MDA-MB-231

Tablo 1. Kullanılan hücre soyları

Hücre Soylarının Pasajlanması

A549, MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 ve HeLa hücre soyları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besi yeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm^2 'lik flask içerisine 2ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek

uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besi yeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besi yeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besi yerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75cm^2 'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı (Şekil 6.).

Kullanılan besi yerinin hazırlanması

Kullanılan hücre soylarının besi yerleri RPMI1640 medium içerisinde Tablo 2.' de gösterildiği konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Hücre Soyları	FBS(Fetal Bovine Serum)	Penisilin Streptomisilin	Non-essential Amino Asit
A-549	%10	%1	-
HeLa	%10	%1	-
HT-29	%10	%1	%1
MCF-7	%5	%1	-
MDA-MB-231	%10	%1	-

Tablo 2. Kullanılan hücre soylarının besi yerleri.

Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besi yerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

SRB (Sulforhodamine B) Metodu

SRB metodu hücre kültüründe sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan, hücrelerdeki total protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metottur. Pasajlama işleminden sonra 75cm²'lik flask içerisinde konfluent olan hücreler, hücre pasaj protokolündeki gibi tripsin ile kaldırıldı. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besi yeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besi yerinde çözündükten sonra 9ml besi yeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu elde edildi. Hücreler, 96 kuyulu plate içerisine son hacim 200µl medium içinde 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Kontrol için kullanılacak kuyulara ise 200 µl medium eklendi. Liyofilize edilip saklanan *Olea europaea* embriyosundan elde edilen liyofilize ekstrenin stok çözeltisi 100 mg/ml (0,05gr bitki ekstraktı + 0,5ml DMSO) olacak şekilde DMSO ile

çözünerek hazırlandı. SRB testi için, bitki örneklerinin farklı konsantrasyonları hücre besi yerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549, MCF-7, HT29, HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100 µl besi yeri içerisinde $5x10^3$ hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, kontrol olarak sadece besi yeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Bu kuyuların içerisine ise 200µl besi yeri ilave edildi. Ardından hücreler 72 saat 37^oC, %5 CO_2li ortamda inkübasyona bırakıldı. İleri analizlerde MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı. Bu hücreler bitki ekstresinin 400-800 µg/ml dozları ile paklitakselin farklı konsantrasyonları kombine edilerek SRB canlılık testi gerçekleştirildi. Bu analiz için 96 plate düzeni şekil 7'daki gibi düzenlendi.

Anti-kanser Aktivite SRB (Sulforhodamine B) Analiz Sonuçları

Bitki ekstresinin anti kanser potansiyelini belirlemek için insan akciğer (A-549), meme (MCF 7), kolorektal (HT29) ve serviks (HeLa) kanser hücreleri ekstrenin farklı konsantrasyonu ile muamele edildi.Bitki ekstresinin meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 hücrelerinde oldukça etkili olduğu belirlendi. Bu nedenle ileri analizler için Meme kanseri hücre soyları kullanıldı.Zeytin embriyo ekstraktının 400µg/ml dozunun tüm hücre soylarında canlı hücre oranını azalttığı tespit edilmiştir. En etkili olunan hücre soyunun MCF-7 hücre soyu olduğu, %59,726'ya düştüğü; bu dozda en az etkili olunan hücre soyunun ise akciğer kanseri (A549) olduğu (%97,867) ölçülmüştür. 800µg/ml dozunda ise yine en etkili olunan hücre soyu MCF-7 (meme kanseri) olmuştur. Canlılık oranını %31,209 a kadar düşmüştür. Canlılık oranının en az düşüş yaşandığı hücre soyu bu kez kolon kanseri(HT-29) olmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkılarak en etkili olunan kanser türü olan meme kanseri hücreleri üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir (Şekil 8).

Canlılık hesabı(%)

Bitki örnekleri uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, bitki ekstraktları uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı. % Canlılık=[100×(Bitki ekstresi ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması)] olarak hesaplandı.

	Paklitaksel + Bitki 400 µg/ml Konsantrasyonu	**Paklitaksel + Bitki 800 µg/ml Konsantrasyonu**
MCF-7	❖Yapılan kombinasyonu uygulaması sonucunda, paklitakselin tek başına uygulamasına göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ❖ **Örneğin** Paklitaksel **7,97µM** dozunda **%8,98** hücre canlılığı gözlenirken, Bitki ekstraktı ile yapılan kombinasyon uygulamasında **%9,33** canlılık gözlenmistir.	❖ Paklitakselin 3,98, 1,99, 1 µM konsantrasyonları ile 800 µg/ml Bitki ekstraktı kombinasyonunda, kemoterapi ilacının ve bitki ekstraktının tek başına kullanımlarına oranla hücre canlılığı oldukça azalmıştır. ❖ **Örneğin**, Paklitaksel **3,98µM** dozunda hücre canlılığı ***%17***, Bitki ekstraktının tek başına kullanımında hücre canlılığı ***%20***'dir. Fakat Paklitaksel 3,98µM +Bitki ekstraktı 800 µg/ml kullanıldığı zaman hücre canlılığının ***%8,4*** olduğu gözlenmiştir.

MDA-MB-231	❖ Paklitakselin **3.98**, **1**, **0.5**, **0.25** ve **0.12** µM konsantrasyonları ile 400 µg/ml Bitki ekstraktı kombinasyonunda, kemoterapi ilacının ve bitki ekstraktının tek başına kullanımlarına oranla hücre canlılığı oldukça azalmıştır.	❖ Paklitakselin **7,97 µM** konsantrasyonları dışında diğer tüm dozlarda yapılan kombinasyon uygulamasında, kemoterapi ilacının ve bitki ekstraktının tek başına kullanımlarına oranla hücre canlılığı oldukça azalmıştır. ❖ Kombinasyon uygulamasının en etkili olduğu gruptur.

Tablo 3.) Elde edilen zeytin embriyo ekstraktının paklitaksel ile olan kombinasyonunun yorumlanması.

Morfolojik Değerlendirme

MDA-MB-231 hücrelerinde bitki ekstresinin 400-800 µg/ml dozlari ile paklitakselin farklı konsantrasyonları kombine edilerek meydana getirdiği sitotoksik etki morfolojik olarak da değerlendirildi. Sonuçlar şekil 9 ve 10' da belirtilmiştir.

Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

Hücrelerde gerçekleşen ölüm modunu (apoptozis/nekrozis) belirlemek amacıyla floresan boyalar kullanıldı. Hoechst33342, hücre membranından nüfuz ederek DNA'ya bağlanabilen bir boyadır ve bütün hücrelerin, canlı ve ölü (apoptotik/ nekrotik), nükleusunu boyamak için kullanılmaktadır. MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37^0C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemeden üzerlerinden 100 µl besi yeri uzaklaştırıldı ve sonrasında bitki ekstresinin 400-800 µg/ml dozlari ve paklitaksel ile kombine edilerek hücrelerin üzerlerine uygulandı. Kontrol kuyularından 100 µl besi yeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl taze besi yeri ilave edildi. Ardından hücreler, 72 saat 37^0C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonra hücrelere zarar vermeden üzerlerinden 50 µl uzaklaştırıldı. Hoechst 33342 boyası 5µg/ml ve PI boyası 1 µg/ml konsantrasyonlar da hazırlanarak hücrelere uygulandı ve floresan mikroskopta görüntüleme yapıldı. Boyama sonucunda hücrelerin apoptoz yoluyla öldüğünü göstermekte olup; verimli bir sonuçtur (Şekil 11). Sitotoksisite sonuçları ayrıca ışık mikroskobunda gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Doza bağlı bir şekilde hücre popülasyonundaki ve canlılığındaki azalma çok net bir şekilde görülmektedir.

5-Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Literatürde oleuropein içeren zeytin yaprağı, meyvesi, yağından elde edilen kısımlarla çalışma yapıldığına dair pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ancak işlenmemiş zeytin çekirdeğinden elde edilen öncü oleuropein ile çalışılmadığı tespit edilmiştir. Etken maddemizin kanser ilacı ile sinerjik bir etki yapması; kemoterapide ilaç dozunu düşürmesi oldukça inovatif ve umut vaad etmektedir.

6- Uygulanabilirlik

Yüksek bir üretim potansiyeline sahip işlenmemiş zeytine ait çekirdeklerden embriyo kısmı çıkarılıp hammadde eldesi gerçekleşebilir. Çıkarılan embriyolar öğütülüp; organik çözücüde çözüldükten sonra ekstresi çıkarılabilir. Ürün piyasadaki ilaçlara ek olarak hap veya sıvı formda tüketilebilir olacak şekilde üretime geçmesi planlanmaktadır. Kimyasal işlemler oldukça basit olup; Ar-Ge çalışmaları bittikten sonra üretim aşaması kısa sürede düşük maliyetle yapılabilmektedir. Zeytin pazarının gıda ürünlerinin yanı sıra sağlık alanına sunacağı katma değeri ülkemiz adına milli bir kaynak niteliğindedir. Zira bu değerli hammaddenin ekonomik getirisi çok yüksektir. Kanser tedavisi sırasında kullanılan ilacın

dozunun düşürülmesi; ilaca ödenen tutarın ve yan etkilerin azaltılması çok değerli bir kazanımdır.

7-Maliyet Hesabı

Sarf Malzemeleri ve hücre soyları Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden ücretsiz olarak temin edilmiştir. Deney aşamaları belirtilen fakülte bünyesinde yer alan Kanser Araştırma Laboratuvarı(BUKAL)'nda gerçekleştirilip, gerekli cihazları yetkililer gözetiminde kullanılmıştır. Hammadde kaynağı olan zeytin ise Balıkesir Edremit'te bulunan zeytin ürünleri satışı yapılan Kale Naturel firmasından etli kısmı çıkarılmış zeytinlerden atık durumuna geçmiş çekirdek kısımları olduğu için ücretsiz olarak temin edilmiştir. Bahsi geçen firmanın presi kullanılarak 150 kilo zeytinden elde edilen çekirdeklerin embriyoları zarar görmeyecek şekilde kırılıp öz kısımları çıkarılmıştır.

8-Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Meme kanseri tedavisi gören hastalar ve belirtli gösteren muhtemel risk grubu üyeleri ekstraktı kullanabilir.

9-Riskler

Olasılık	Yüksek	Bölgede artan yağış ve olumsuz hava koşulları sebebiyle zeytin hasadının negatif etkilenmesi.(Dönemlik)		Üretim tesisinin yeterli sermaye bulunamamasından kaynaklı kurulamaması.
	Orta	Coğrafi etkenler sebebiyle ürünlerde etken maddenin veriminin azalması.		
	Düşük	Proje araştırma sürecinde yapılan deneyler sonucu ölçüm hatalarından kaynaklı hesaplama hataları.	Kanser hücrelerinin öngörülemeyen mutasyonları sonucu etken maddenin etki potansiyelinin azalması.	Ülkemizde zeytin tarımının bitmesi.
		Düşük	Orta	Yüksek
	Etki			

B Planı

Ürünün piyasaya çıkamaması durumunda öncelikle eksik yapılan veya hata yapılan durumlar belirlenecek ve eksikliklerin giderilmesi sağlanacak. Etken maddenin aktivitesinden kaynaklı meydana gelen sorunlarda diğer ülkelerdeki zeytin üreticilerinden tedarik edilen zeytinler üzerine daha detaylı bir Ar-Ge çalışmaları üzerine yoğunlaşılacaktır. İklim koşullarından kaynaklı sorunlarda optimum değeri veren toprak ve iklim koşulları belirlenerek standartlara uygun üretim yapılması planlanmaktadır.

10-İş –Zaman Takvimi(Proje Süreci)

Zaman	Süreçte gerçekleşen faaliyet
Ağustos 2021	Proje fikri üzerine yoğunlaşıldı. Ekipçe benzer çalışmalar incelenerek yol haritası çizildi.
Eylül 2021	Fikir belirlendikten sonra literatürde materyal ve metot üzerinde detaylı araştırma yapıldı. BUKAL ve zeytin tedarikçisiyle iletişime geçildi. Kararmaya başlamayan çekirdek çapı 18-22 mm aralığı zeytinler toplandı.
Ekim 2021	Ekim ayı boyunca oleuropein miktarı artan zeytinler toplanmaya devam edildi diğer yandan Bursa Gıda Araştırma Laboratuvarında kromatografik analizler yapıldı. Çalışmada kullanılacak metotlar belirlenmek üzere literatür taraması süreci son aşamaya geldi.
Kasım 2021	ATCC' den temin edilen hücre hatları üzerinde ilk sitotoksisite çalışmaları BUKAL'de yapıldı.
Aralık 2021	A-549,MCF-7,HeLa,HT-29 hücre hatlarının analiz sonuçlarının yorumlanması üzerine çalışmaya devam edilecek yol haritası belirlendi.MCF-7 hücre hattına dair sonuçlar, çalışmaya MDA-MB-231 hücre hattının dahil olması konusunda önemli bir etken varsayılarak ileri düzey analizlerde hücre ölüm mekanizması üzerine yoğunlaşıldı.
Ocak 2022	İleri düzey analizlerde etken maddenin Taxol ile kombinasyonu MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında denenip, hücre ölüm mekanizmasını belirleme adına yapılan floresan boyama analizi sonuçlandıktan sonra rapor yazım süreci başladı.
Şubat-Mart 2022	Rapor yazımı bitirildi. Yarışma başvurusu yapıldı.

11-Kaynaklar

- Amiot, M.J., A. Fleuriet and J.J. Macheix. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. Phytochem. 28:67-69.
- Aslan ,Ö. Vural H. , Kömürcü, Ş. , Özet A. (2006) , Kemoterapi Alan Kanser Hastalarına Verilen Eğitimin Kemoterapi Semptomlarına Etkisi, MASCC/ISOO 16.) Intenational Symposium Suportive Care in Cancer) C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 2006, 10(1)
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello M., Tarocchi, M., Galli, A., Balsano, C., 2014. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. International Journal of Molecular Sciences 15: 18508-18524.
- Bilir, N., Cancer Occurence in Developing Countries, Ed. D.M. Parkin, içinde "TURKEY" s. 303-307, IARC Scientific Publications, No. 75, IARC, Lyon, 1986.
- Craddock R B et al (1999) An Intervention to İncrease Use and Effecetiveness of Selfcare Measures for Breast Cancer Chemotherapy patients, Cancer Nursing, 22(4): 312-319.

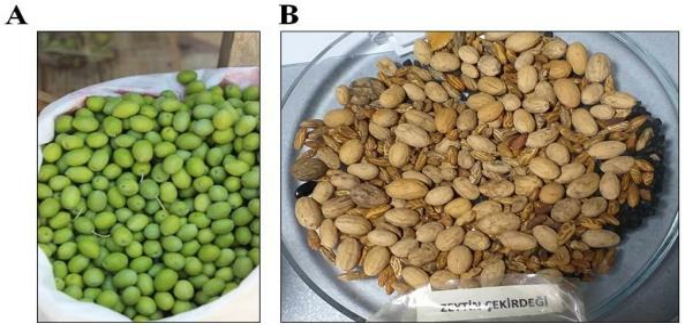
- Curado. M. P., Edwards, B., Shin. H.R., Storm. H., Ferlay. J., Heanue. M. and Boyle. P., eds (2007) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX.IARC Scientific Publications No. 160, Lyon, IARC.
- Erdoğan, B. , Uzaslan ,E.K. (2003) , Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa Türkiye Klinikleri Arch Lung. 2003;4(3):165-74
- Esti, M. L. Cinquanta and E. La Notte. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. J. Agric. Food Chem. 46.32–35.
- Flyge H A (1993) Meeting the Challange of Neutrepenia, Nursing, 23(7):61-64.
- Han,J.,Talorete,T.P.N.,Yamada,P.,Isoda,H.,Anti-proliferative and apoptotic effect so folur opein and hydroxyryrosolon human breast cancerMCF7cells, Cytotechnology,(2009)59(1):45-53
- Huang,L.;Chen,CH.,ProteasomeRegulators:ActivatorsandInhibitors,CurrentMedicinal Che mistry,(2009),16(8):931-939
- Kaya R. (2007), Carol Firenze, Zeytinyağı Tutkusu, 2007
- Kayaalp, O .(2000) Tıbbi Farmakoloji, Cilt: 1, Ankara, Feryal Matbaacılık, s.372, 378-380, 384-400
- Kimura,Y.,Sumiyoshi,M.,Olive Leaf Extract and Its Main Competent Oluropein prevent Chronic Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Damage and Carcinogenesis in Hairless Mice, Journal of Nutrition,(2009)139(11):2079-2086
- Köçkar, F., Aydoğan Türkoğlu, S., Aydın, M., 2010. Oleuropein'in Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve Hepatoma (HEP3B) Kanser Hücrelerinde Anti-tümör Etkisinin Belirlenmesi. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 3 (2): 185-190.
- Miller M M., Kearney N (2001) Oral Care.for Patients With Cancer: A Review of the Literature, Cancer Nursing, 24(4):241- 254.
- Nagel T (2004) Help Patients Cope With Chemo., RN, 67(10): 28-30.
- Onur, H. ,Candan, İ. ve ark (2000) Kanser Epidemiyolojisi, Klinik Bilimlere Giriş:,.(Ed.), Antıp A.Ş. Yayınları, Ankara, ss.445- 446.
- Platin N.(Ed.) (1996), Hemşireler İçin Kanser El Kitabı, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, Ankara.
- Ryan, D., K. Robards and S. Lavee. 1999. Changes in Phenolic Content of Olive During Maturation. Int. J. Food Sci. Technol. 34:265–274.
- Sanchez, J.C., M.A. Alsina, M.K. Herrlein and C. Mestres. 2007. Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. Colloid Polym. Sci. 285:1351–1360.
- Singla, A., K., Garg, A., Aggarwal, D. 2001. Paclitaxel and Its Formulatins. International Journal of Pharmaceutics 235, 179-192.
- SSK İzmir Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi(Medical Journal of İzmir Hospital) 8(1): 37-72,2002
- T.C. S.B. Kanser Savaş Daire Başkanlığı 1998 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri, 2002

- Tetik, D. (2004), Sofralık Zeytin İşleme Teknikleri, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, İzmir, 2004
- Thompson J, Nuget S M J,Walczak R J (1997) Clinical Nursing, 4th Ed., St Louis, Mosboy, pp.1330-1331.
- Thompson, D. J. ; Stout, D. G., 1997. Mixtures of Persian clover with Italian ryegrass or barley-Italian ryegrass for annual forage. Can. J. Plant Sci., 77 (4): 579-585
- Tokuşoğlu Ö. 2010. Özel Meyve Zeytin: Kimyası, Kalite ve Teknolojisi. Seher Matbaacılık. Yayın No: 006-1B; Sidas Medya Ltd. Şti., Fevzipaşa Bulvarı Çelik İş Merkezi/İzmir. 350 s
- Tuğrul, B. , Oktay, M.. , (2014) Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa Turkish Journal of Oncology 2014 , Vol 29 , Num 4 The Role of Hydroxytyrosol in Health and Disease
- Ünlüel, İ. , Aydın, Ö. (2016) , Bir Zeytin Fenoliği Olan Oleuropeinin Sağlığımız Üzerine Etkileri (Phenolic of Olives, Oleuropein, The Impact on Our Health) , Ahi Evran Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bağbaşı Yerleşkesi, Kırşehir Zeytin Bilimi 6 (2) 2016, 77-14
- White, L .(2001) Foundations of Nursing: Caring for the whole person, Texas, Delmar, 2001, pp.659- 681.

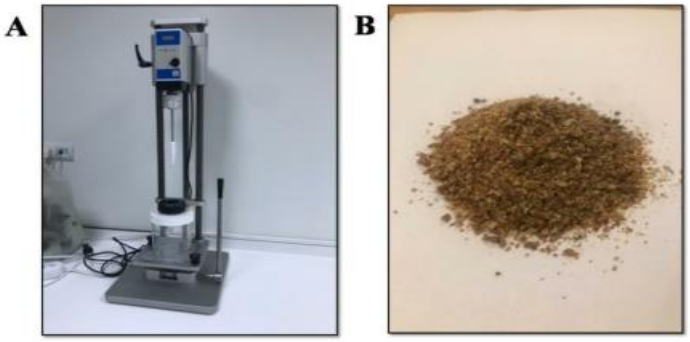
12-Proje Ekibi

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Serpil KORKMAZ	**Danışman** Literatür tarama, uygun yöntem belirleme, deney malzemesi temini, çalışma alanı belirleme, deney verilerini yorumlama, rapor kontrolü	Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yükseklisans	Zeytin bileşimindeki etken maddeler ile ilgili 2013 yılından bu yana araştırma ve projeler yapmaktadır.
Ömer Faruk YILDIRIM	**Takım Kaptanı** Proje fikri geliştirme, literatür tarama, laboratuvar çalışmaları, deneyleri gözlemleyip, verileri kaydetme, rapor yazma.	Sakarya Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Bilimleri Bölümü	Sağlık ve Biyoteknoloji ile ilgili lise öğretimi boyunca araştırmalar yapıp,Tubitak Projelerine dahil olmuştur.Projeyle ilgili 2 yıldır çalışmaktadır.

13- Proje süreci görselleri

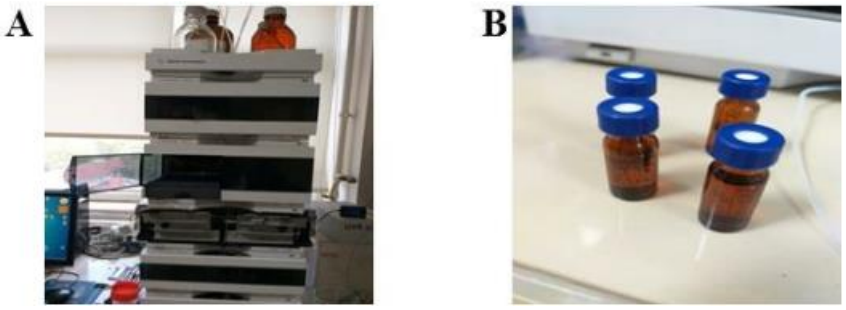


(Şekil 1). A. *Olea europaea* (zeytin) bitkisinin Ekim-Kasım ayında toplanan 14-18mm çapındaki meyveleri, **B.** Meyveden elde edilen çekirdekler ve embriyolar.

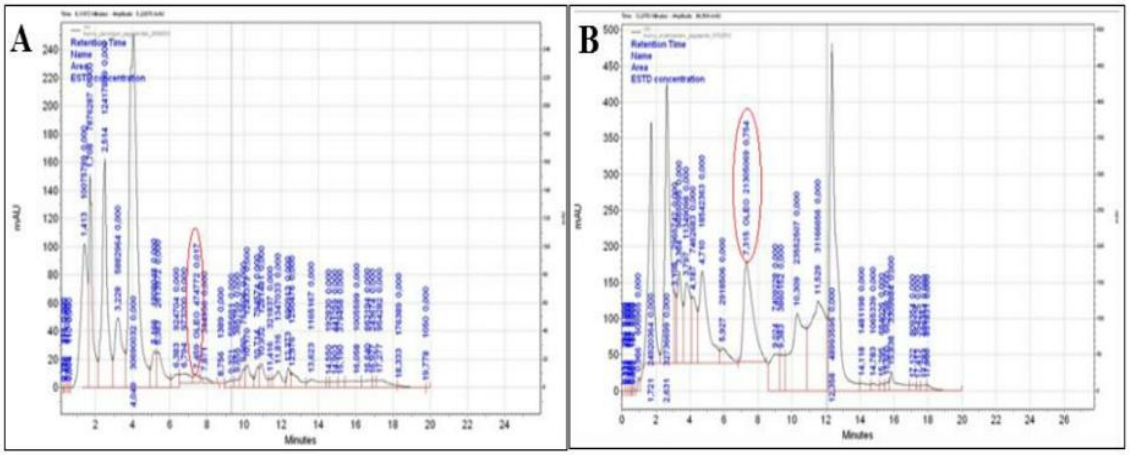


(Şekil 2.) A. Kullanılan homojenizatör cihazı**, B.** Elde edilen toz zeytin embriyosu.

(Şekil 3.) A. Soxhlet'de ekstraksiyon işlemi, **B.** Evoporasyon işlemi, **C.** Liyofilizasyon işlemi

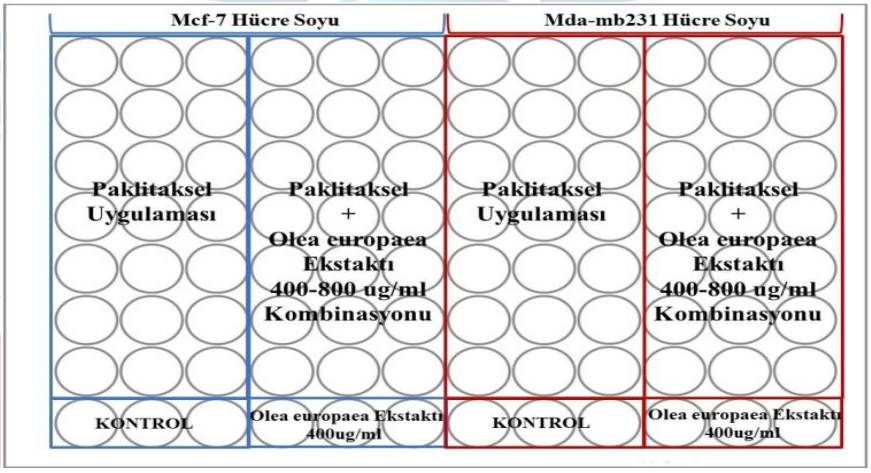


(Şekil 4.) A. HPLC cihazında oleuropein tayini **B.** Test Numuneleri



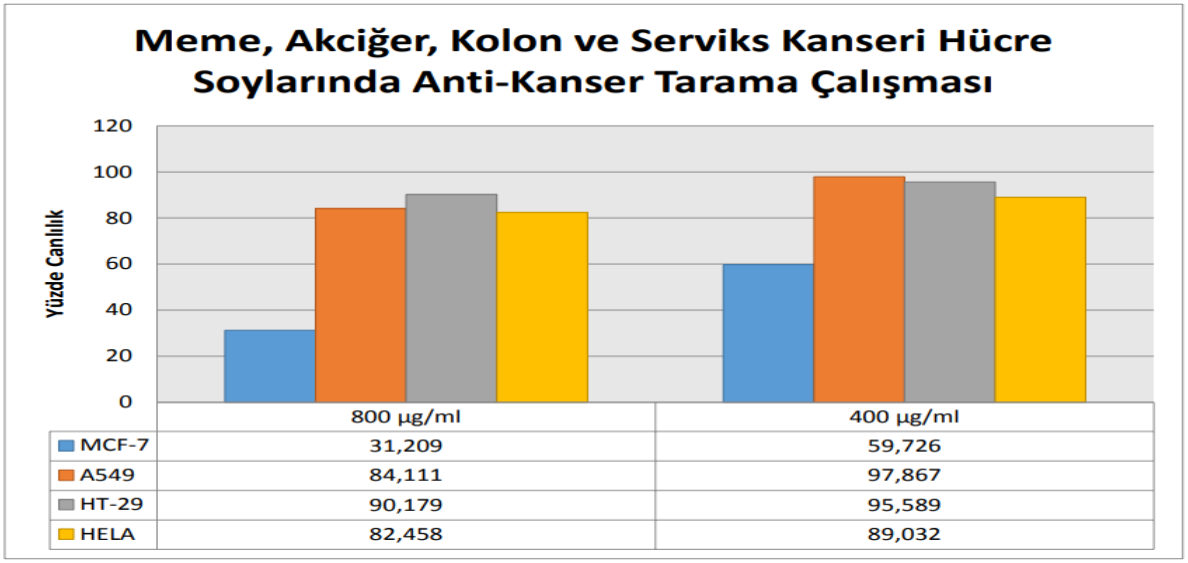
(Şekil 5.) A. Zeytin embriyosu HPLC sonuçları**, B.** Zeytin yaprağı HPLC sonuçları.

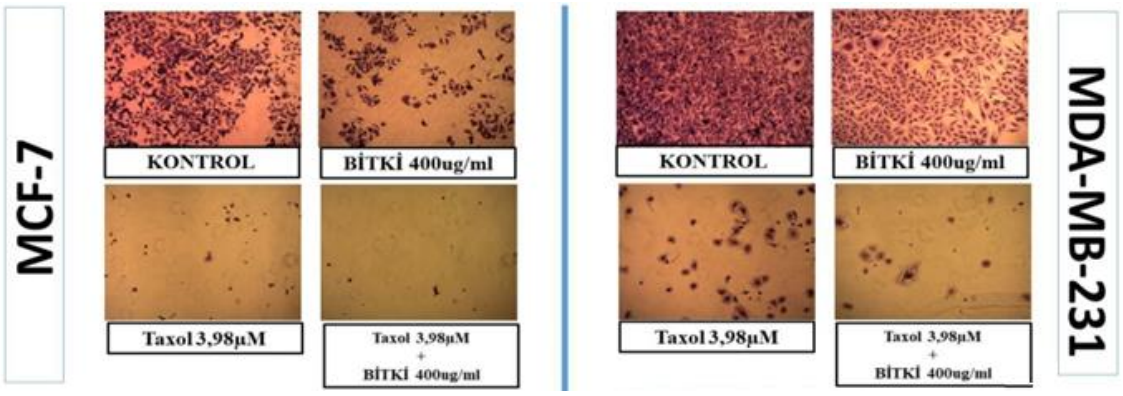
(Şekil 6). Hücre soylarının pasajlanması



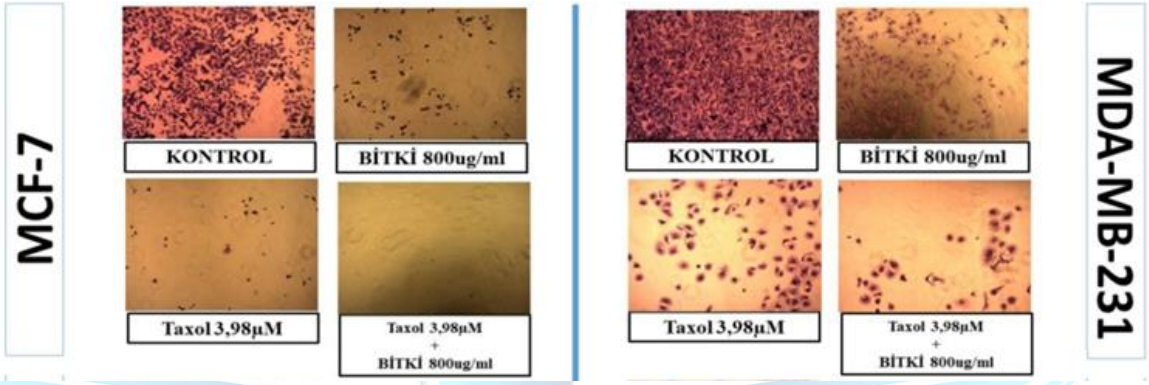
(Şekil 7.) SRB plate düzeni

Şekil 8) Kanser çeşitleri üzerindeki etkiler(Yüzde canlılık oranı)

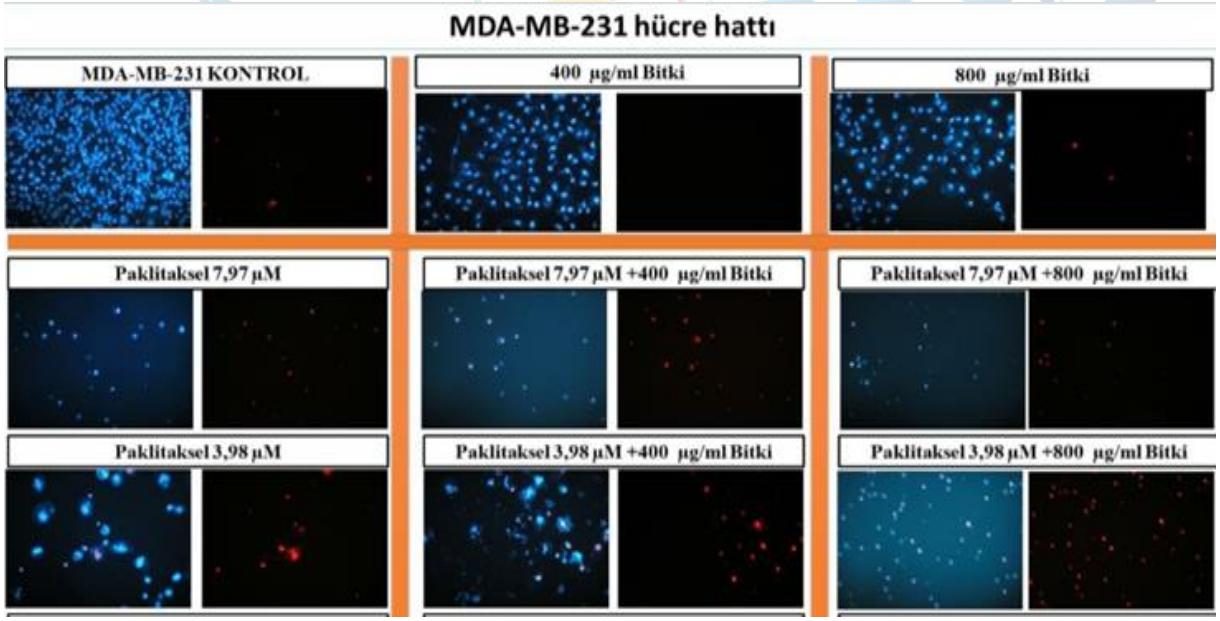




(Şekil 9.) MCF-7 ve MDA-MB231 hücre soylarının ışık mikroskobu görüntüleri. (Bitki 400mg/ml)



(Şekil 10.) MCF-7 ve MDA-MB231 hücre soylarının ışık mikroskobu görüntüleri. (Bitki 800mg/ml)



Şekil 11.) MDA-MB-231 Hücre soyu floresan boyama görüntüleri.