

ÖNSÖZ

Projemiz kapsamında sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerine Timokinon molekülünün sitotoksik etkileri doz bağımlı ve zaman bağımlı olarak MTT ve Akış sitometrisi yöntemleriyle incelendi. Projemiz, Namık Kemal Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Proje (BAP) birimi tarafından desteklendi.

İÇİNDEKİLER

Özet.....	3
Giriş.....	4
Gereç ve yöntem.....	5
Bulgular.....	8
Tartışmave sonuç.....	15
Kaynaklar.....	17

Sağlıklı Meme Epitel Hücre Hattı Üzerine Timokinon'un Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi.

ÖZET

Timokinon, Ranunculacea ailesinden olan *Nigella sativa* türünün uçucu yağından elde edilen en biyoaktif üründür. Timokinon tedavisi uygulanan meme karsinoma hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde azalma, Bax protein ekspresyon düzeyinde artma ayrıca peroxisomeproliferator-activatedreceptor γ aktivitesinde artma sağlanmasıyla meme kanser hücrelerini apoptozu tetikler. Timokinon ile tedavi edilen doksorubisin dirençli meme kanser hücre hattında (MCF-7/DOX) p21 ve p53 protein seviyelerinin artırır ve hücreyi G2/M safhasında durdurmaktadır. Timokinon; p53 bağımlı ve bağımsız yolları kullanarak ve kaspaz 7,8, 9'u aktive ederek önemli anti-kanser mekanizmaları vardır.

Timokinon'un sağlıklı hücreler (fare primerkeratinositleri, fare sağlıklı böbrek hücreleri, malign olmayan fibroblastlar ve sağlıklı insan akciğer fibroblastları) üzerine minimal sitotoksik etkileri bulunmaktadır. Timokinon, sağlıklı dokular üzerinde superoksit radikallerini ve lipid peroksidasyon ürünlerini inhibe ederek güçlü antioksidan özelliği göstermektedir.

Planlanan çalışma kapsamında, Timokinon'un isim ve koduyla piyasadan hazır bulunan sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerine doz bağımlı ve zaman bağımlı etkilerinin MTT ve Akış sitometri cihaz analizleri ile incelendi. Çalışmamız sonucunda, 25 μ M ve 50 μ M Timokinon molekül konsantrasyonunda 12., 24., 48., 72. saatler ve 7. gün etkileri sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerinde MTT ve Akış sitometrileriyle incelendiğinde sitotoksik etkilerinin olmadığı görüldü. Ayrıca, 75 μ M ve 100 μ M Timokinon konsantrasyonun sırasıyla 24.ve 12. saatten itibaren sitotoksik etkisi başlamaktadır.

Sonuç olarak, proje kapsamında araştırılan in vitro sağlık meme epitel hücrelerine 7. güne kadar sitotoksik etkisinin olmadığı maksimum dozun 50 μ M olduğu MTT ve Akış sitometrisi ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi ile hesaplanarak bulundu.

GİRİŞ

Timokinon, Ranunculacea ailesinden olan *Nigella sativa* türünün uçucu yağından elde edilen en biyoaktif üründür. Kimyasal yapısı 2-Isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone, molekülerkütlesi $164.20 \text{ g mol}^{-1}$, CAS Number 490-91-5, kimyasal formülü $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ ¹.

Timokinon, endotel hücrelerdeki ekstraselüler düzenleyici kinazları ve Aktsinyal yollarını inhibe ederek tumor anjiyogenezini inhibe eder².

Yapılan son çalışmalarda, Timokinon tedavisi uygulanan meme karsinoma hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde azalma, Bax protein ekspresyon düzeyinde artma^{3,4} ayrıca peroxisome proliferator-activated receptor γ aktivitesinde artma³ sağlamasıyla meme kanser hücrelerinde apoptozu tetikler.

Timokinon ile tedavi edilen doksorubisin dirençli meme kanser hücre hattında (MCF-7/DOX) p21 ve p53 protein seviyelerinin artırır ve hücreyi G2/M safhasında durdurmaktadır. Timokinon; p53 bağımlı ve bağımsız yolları kullanarak ve kaspaz 7, 8, 9'u aktive eder^{4,5,6} Timokinon'un p53 bağımlı ve bağımsız yollar üzerinden çeşitli kanser hücre hatlarında (HCT116 colorectal carcinoma cells, p53-null HCT116 colorectal carcinoma cells, p53-null HL-60 myeloblastic leukemia cells) apoptozu tetiklemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, Timokinon'un hücre hatları üzerinde önemli anti-kanser mekanizmalarının bulunduğu görülmektedir⁶⁻⁷.

Timokinon'un sağlıklı hücreler (fare primerkeratinositleri, fare sağlıklı böbrek hücreleri, malign olmayan fibroblastlar ve sağlıklı insan akciğer fibroblastları) üzerine minimal sitotoksik etkileri bulunmaktadır^{8,9,10}. Timokinon, sağlıklı dokular üzerinde superoksit radikallerini ve lipidperoksidasyon ürünlerini inhibe ederek güçlü antioksidan özelliği göstermektedir^{11,12}

Çalışmamızda, Timokinon molekülünün sağlıklı meme epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini doz bağımlı ve zaman bağımlı olarak incelendi. Yapılan literature araştırmasında, Timokinon'un yüksek, orta, düşük dozlarının sağlıklı meme epitel hücresi üzerine kısa, orta ve uzun dönem etkileri ile ilgili incelemeyi amaçlayan kapsamlı bir çalışma olması sebebiyle elde edilen bilgilerin literatürde önemli bir boşluğu doldurduğu düşünülmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre kültürü

Sağlık meme epitel hücrelerin bir kısmı hücre kültür flasklarında, DMEM/F12, 20 ng/ml Human epidermal growth factor, 0.01 mg/ml bovine insulin + 500 ng/ml hydrocortisone (95%) + 5% fetal buzağı serumu, , %1 penisilin/streptomisin ile beslendi. 37°C'de ve nemli ortamda, karbondioksitli inkübatörde (hava içinde %5 CO₂), tutulan hücrelerin medyumları haftada 2 defa değiştirildi. Hücreler konfluent olduğunda, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flasklardan ayırıp, plaklara ekilerek MTT ve Akış sitometri analizlerinde kullanıldı.

MTT Analizi [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]

Uygulanan kimyasal ajanın/ilacın farklı konsantrasyonlarda hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin (hücre canlılığının ve proliferasyonun) sayısal verilerle değerlendirilmesinde ve IC₅₀ (%50 inhibitör konsantrasyonu) hesaplanmasında kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerin mitokondriyal enzimlerine bağlanarak suda çözünmeyen mor renkli kristaller oluşur. Bu kristaller organik çözücüler (DMSO, izopropanol gibi) eklenerek çözülür. Canlı hücreler ve proliferasyonun çok olduğu hücreler mor renkte boyanırken, sitotoksik kimyasal ajanın/ilacın etkisiyle canlılığı azalan veya ölü hücreler açık mor renkte veya pembe renkte boyanırlar. Oluşan renk, ELISA cihazı ile 595 nm dalga boyunda ölçülmesiyle sayısal veriler elde edilir.

Hücreler her kuyuya 1.5×10^4 olacak şekilde 200 µl hücre kültür medyumunu içinde 96 kuyulu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün medyum içerisinde 25 µM, 50µM, 75 µM 100µM timokinon bulunan medyum ile değiştirildi ve hücreler 37°C'de 12, 24, 48, 72 saat ve 7 gün inkübasyona tabi tutuldu. Timokinon konsantrasyonu ile aynı miktarda DMSO içeren medyumun uygulandığı ve aynı sürelerde inkübe edilen hücreler karşılaştırma için kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu sürelerin her birinin bitiminde, her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek hücreler 37°C'de 3.5 saat daha inkübe edildi. Daha sonra, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için MTT içeren medyum çekildi ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek oda ısısında 15 dakika bekletildi. Hücrelerdeki renk değişimi, 595 nm dalga boyunda ELISA cihazı belirlendi. Her bir konsantrasyon deney içerisinde üç farklı kuyuda

tekrarlandı ve bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. Hücre canlılık ve sitotoksosite oranları aşağıdaki formüller ile hesaplandı.

$$\text{Hücre Proliferasyon Yüzdesi} = \frac{A}{B} \times 100$$

$$\text{Sitotoksosite Yüzdesi} = 1 - \frac{A}{B} \times 100$$

A: Test örneklerine ait kuyucuklardaki optik değerlerin ortalaması

B: Pozitif kontrol grubuna (timokinon uygulanmayan) ait değerlerin optik değerlerin ortalaması

Akış Sitometri Analizi

Sağlıklı hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücrede apoptoz başladığında normalde iç yüzeyde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre membranının ekstraselüler yüzeyine doğru yer değiştirir. PS moleküllerinin yer değiştirmesi hücre membran bütünlüğünün henüz bozulmadığı apoptozisin erken döneminde meydana gelir. Anneksin-V, hücre membranının ekstraselüler yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flowsitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyumiyodür eklenmektedir. Hem Annexin V-FITC (greenfluorescence) ve non-vital boya olan propidiumiodide (redfluorescence) ile boyanan hücreler geç apoptotik veya nekrotik hücreler (FITC+PI+), canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) birbirinden ayırt edilmesinde akış sitometri yöntemi kullanılmıştır.

Timokinon; 37⁰C sıcaklıkta çeşitli zaman periyodlarında (12, 24, 48, 72 saatler ve 7. gün) ve çeşitli konsantrasyonlarda (25µM, 50µM, 75µM, 100µM) verilerek, zamana bağlı ve doza bağlı olarak MCF 10A hücreler üzerine apoptotik etkileri akış sitometrisi ile incelenmiştir.

Analiz edilecek hücreler %0.25 Tripsin-EDTA (Gibco-25200-056) solusyonu ile kültür kabından kaldırılmış, santrifüj tüplerine aktararak santrifüj edilmiştir. Santrifüj

sonrası sulandırılan hücreler hemostometre kullanılarak sayılmış ve analiz için 1×10^6 hücre kullanılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra kit içerisinde bulunan BindingBuffer (1X)' dan 200 µl eklenerek hücreler süspansiyon haline getirilmiştir. Bu hücre süspansiyonunun 195 µl'sine 5 µl Annexin V FITC (BMS500FI/100CE) eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler 200µl BindingBuffer (1X) ile yıkanmış ve 190 µl BindingBuffer (1X) ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyona 10 µl Propidium Iodide (20µg/ml) ve 100 µg/ml RNaseA eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler soğuk DPBS (Sigma- D5652) ile yıkandıktan sonra her tüpe 500 µl DPBS (Sigma- D5652) eklenerek BD FACS Calibur Flow Cytometer cihazında analizi yapılmıştır.

Analiz sonucu aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir:

- **Nekrotik Hücreler:** PI pozitif, Annexin V negatif
- **Canlı Hücreler:** PI negatif, Annexin V negatif
- **Geç Apoptotik Hücreler:** PI pozitif Annexin V pozitif
- **Erken Apoptotik Hücreler:** PI negatif Annexin V pozitif

İstatistiksel Analiz

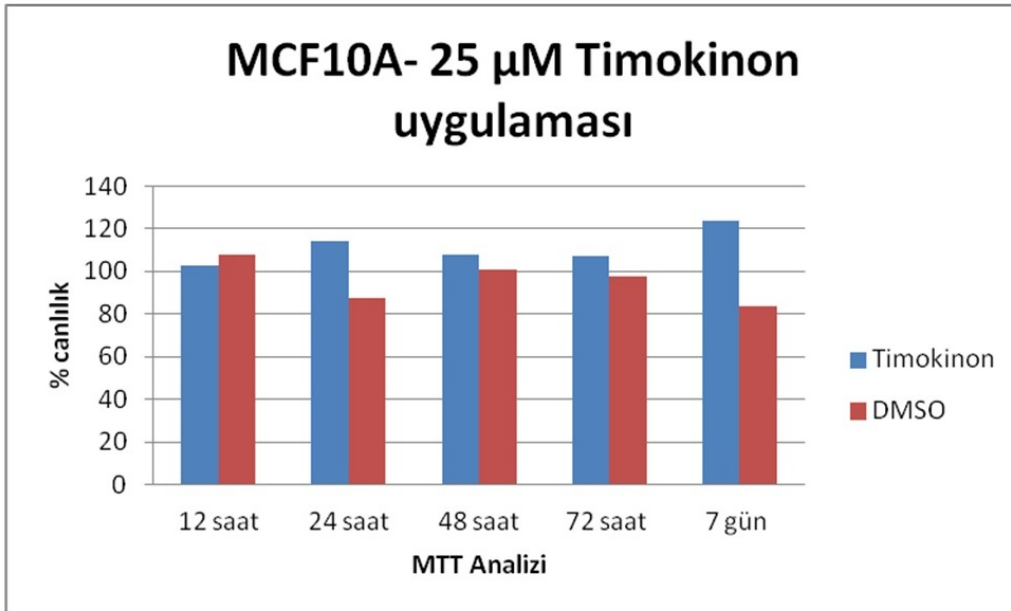
MTT ve Akış sitometrisinden elde edilen verilerin sonuçlarının istatistiksel analizleri için tek yönlü ANOVA testi kullanılacaktır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

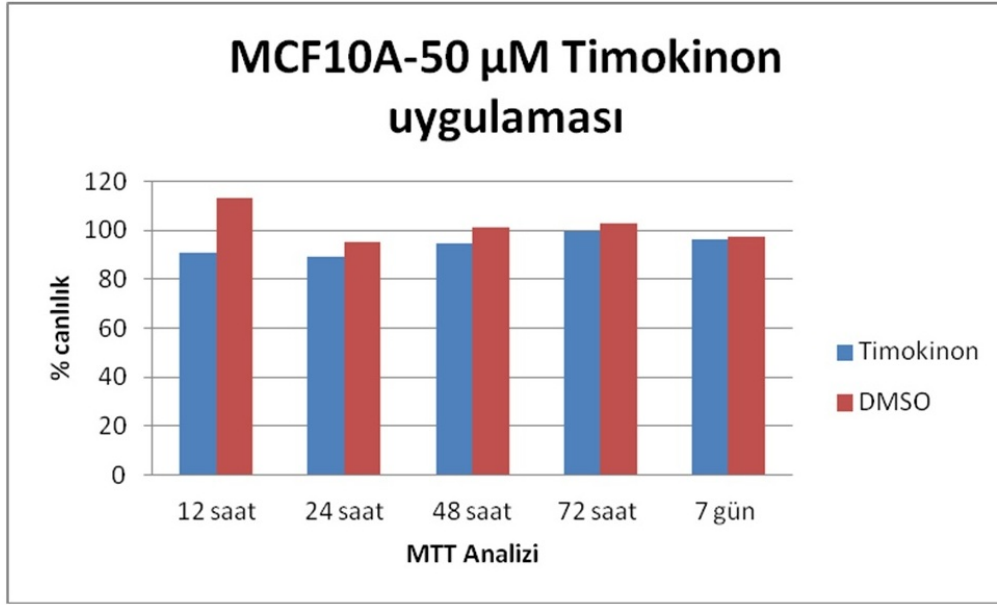
SAĞLIKLI MEME EPİTEL HÜCRE ANALİZLERİ

Timokinon molekülünün sağlıklı meme epitel hücreleri üzerindeki etkisi zaman bağımlı ve doz bağımlı etkisi MTT yöntemi ve Akış sitometri yöntemi ile incelendi. Canlılık analizleri MTT yöntemi ile incelenerek elde edilen veriler Şekil 1-4 ile gösterildi.

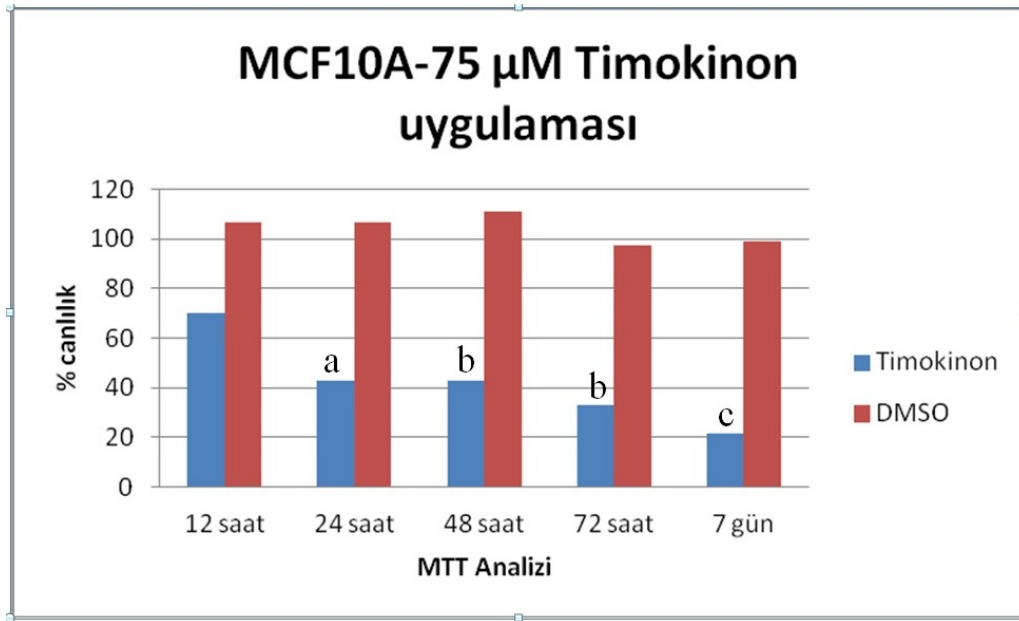
Akış sitometri ile canlılık analizi, nekrotik hücre analizi, geç apoptotic hücre analizi, erken apoptotic hücre analizleri kantitatif veriler kullanılarak tablolar halinde ifade edildi.



Şekil 1. 25 µM Timokinon verilerek 12., 24., 48., 72. Saatler ve 7. Gün MCF10A hücrelerinin canlılık oranları kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında sitotoksik etkisi bulunmamaktadır.

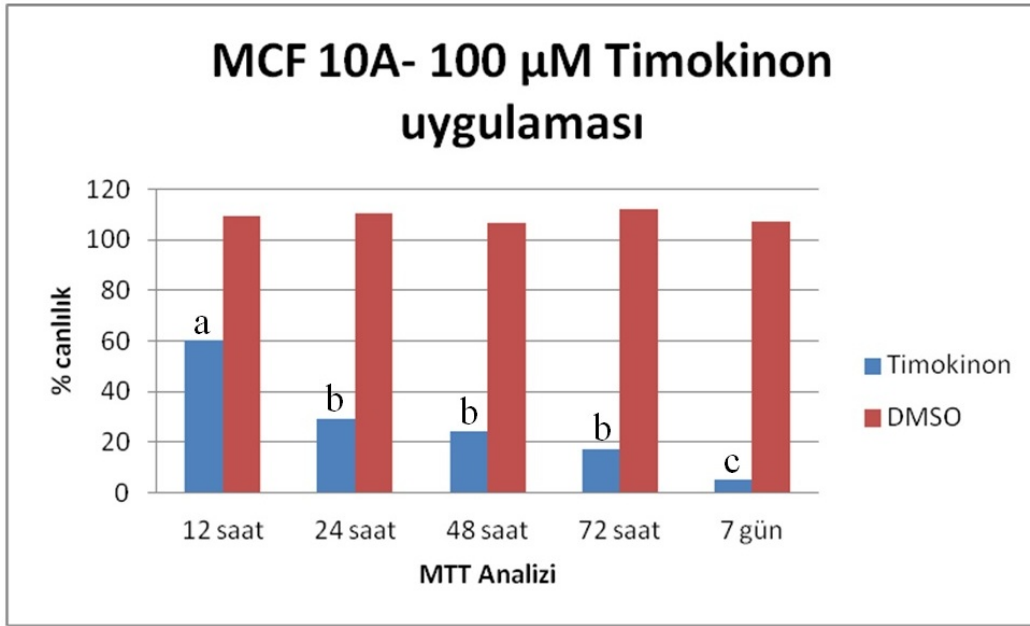


Şekil 2. 50 µM Timokinon verilerek 12., 24., 48., 72. Saatler ve 7. Gün MCF10A hücrelerinin canlılık oranları kontrol grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında sitotoksik etkisi bulunmamaktadır.



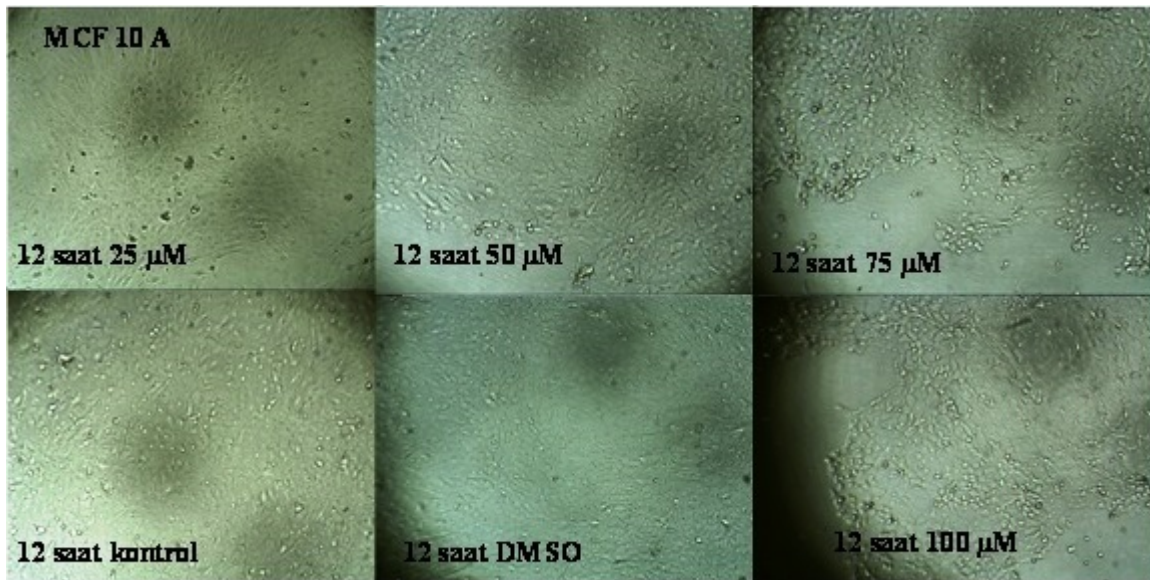
Şekil 3. 75 µM Timokinon verilerek 12. saat etkisi incelenen MCF10A hücrelerinin canlılık oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. 75 µM Timokinon dozunda 24., 48., 72. saatler ve 7. gün etkileri incelenen sağlıklı meme epitel hücrelerinin canlılık oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etkileri bulunmaktadır.

(a, $p < 0.05$) (b, $p < 0.005$) (c, $p < 0.001$)

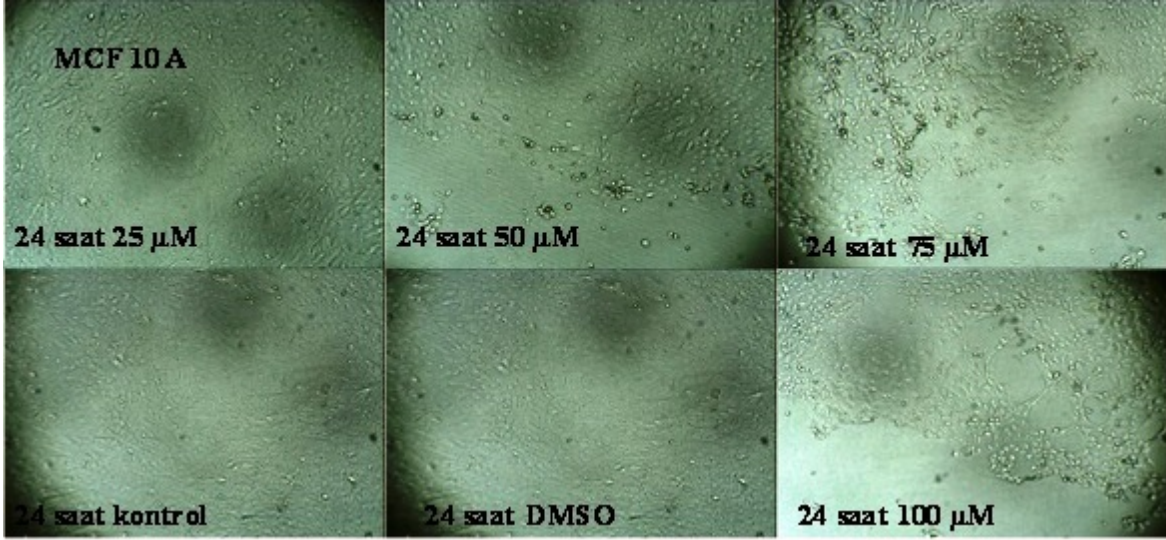


Şekil 4. 100 μ M Timokinin dozunda 12., 24., 48., 72. saatler ve 7. gün etkileri incelenen sağlıklı meme epitel hücrelerinin canlılık oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etkileri bulunmaktadır.

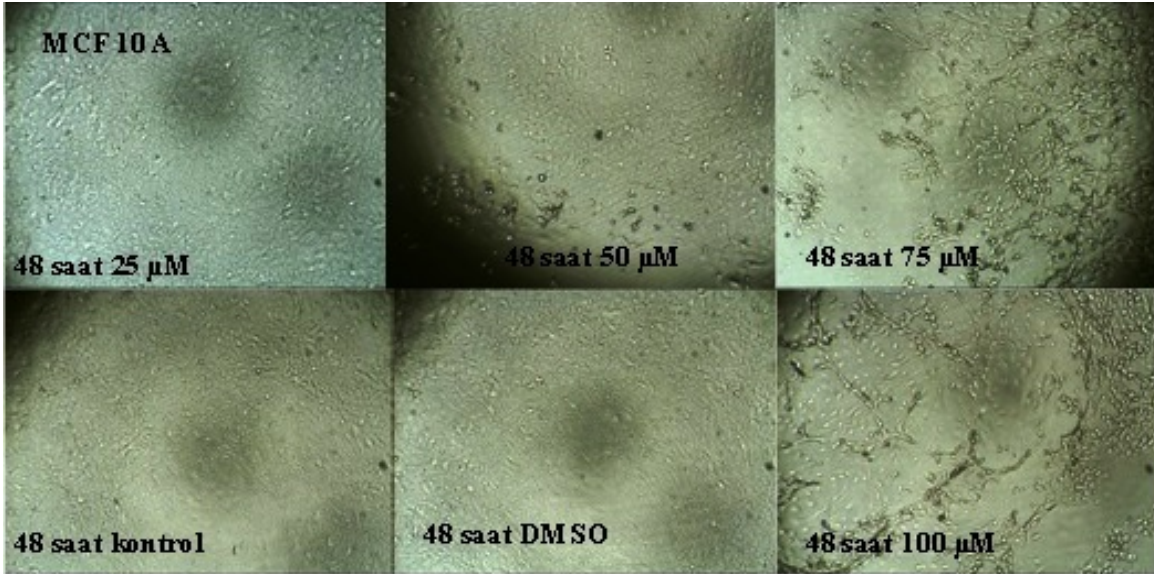
- (a, $p < 0.01$)(b, $p < 0.0001$)(c, $p < 0.00001$)



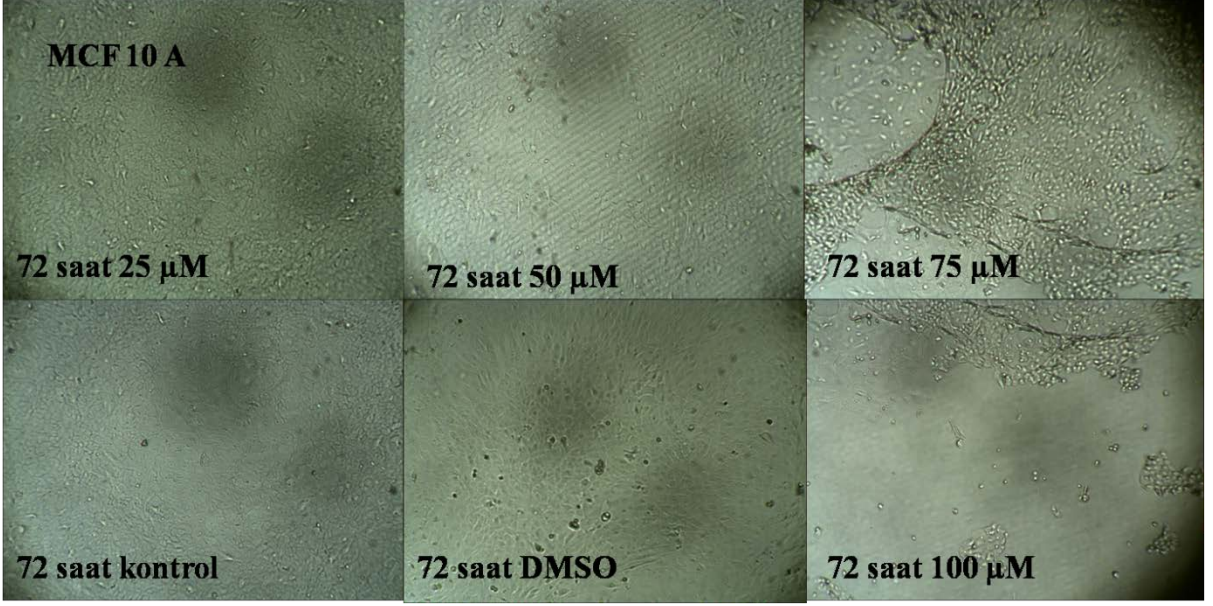
Şekil 5. Artan dozlarda (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M) 12 saat süre ile timokinin uygulamasının MCF 10A hücrelerinin proliferasyonu ve morfolojisi üzerine etkisi. Tedavi görmeyen ve timokininin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı hücreler kontrol olarak değerlendirilmiştir.



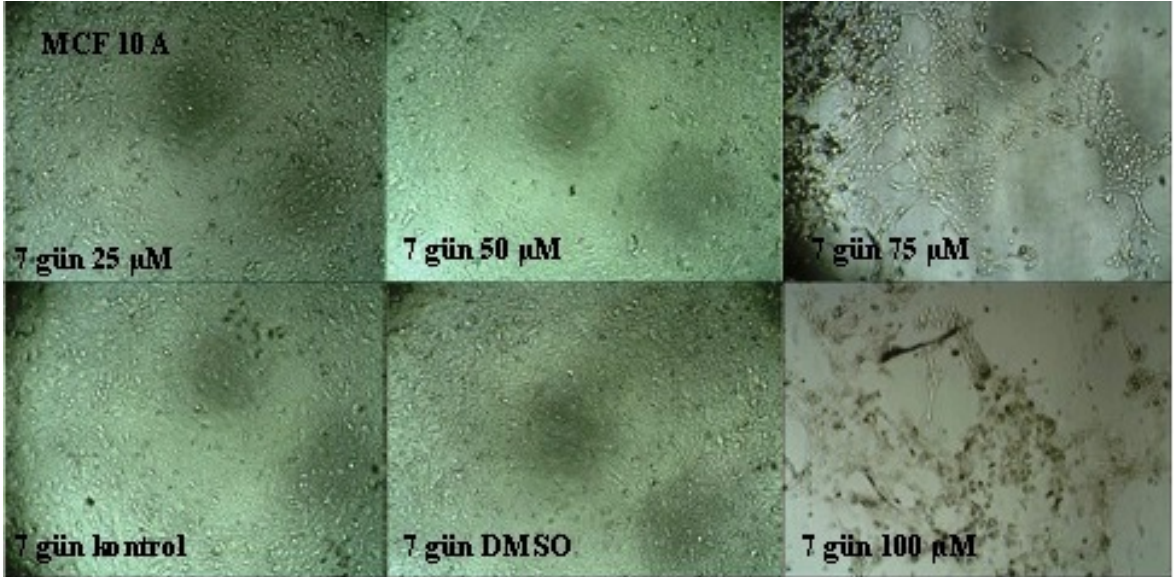
Şekil 6. Artan dozlarda (25µM, 50µM, 75µM, 100µM) 24 saat süre ile timokinin uygulamasının MCF 10A hücrelerinin proliferasyonu ve morfolojisi üzerine etkisi. Tedavi görmeyen ve timokininin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı hücreler kontrol olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 7. Artan dozlarda (25µM, 50µM, 75µM, 100µM) 48 saat süre ile timokinin uygulamasının MCF 10A hücrelerinin proliferasyonu ve morfolojisi üzerine etkisi. Tedavi görmeyen ve timokininin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı hücreler kontrol olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 8. Artan dozlarda (25µM, 50µM, 75µM, 100µM) 72 saat süre ile timokinin uygulamasının MCF 10A hücrelerinin proliferasyonu ve morfolojisi üzerine etkisi. Tedavi görmeyen ve timokininin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı hücreler kontrol olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 9. Artan dozlarda (25µM, 50µM, 75µM, 100µM) 7 gün süre ile timokinin uygulamasının MCF 10A hücrelerinin proliferasyonu ve morfolojisi üzerine etkisi. Tedavi görmeyen ve timokininin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı hücreler kontrol olarak değerlendirilmiştir.

MCF10ACanlı hücre oranları (Akış analizi)

(Ortalama \pm Standart Sapma)

Grup	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	7 gün
Kontrol	94,21 \pm 0,50	91,43 \pm 1,49	92,26 \pm 1,58	96,41 \pm 2,74	98,00 \pm 0,47
25 μ M	93,55 \pm 1,40	88,73 \pm 2,48	94,22 \pm 1,84	95,01 \pm 0,79	98,29 \pm 0,52
50 μ M	85,14 \pm 3,49	91,82 \pm 4,54	90,90 \pm 1,40	93,82 \pm 0,44	95,15 \pm 0,58
75 μ M	77,48 \pm 11,11 ^a	45,59 \pm 1,80 ^b	62,11 \pm 1,11 ^b	30,58 \pm 6,62 ^b	26,93 \pm 4,69 ^b
100 μ M	51,26 \pm 4,43 ^b	36,05 \pm 12,51 ^b	22,01 \pm 0,28 ^b	7,62 \pm 7,93 ^b	1,35 \pm 0,40 ^b

Tablo 1. 25, 50, 75, 100 μ M Timokinon verilen gruplar olup 12, 24, 48, 72 saat ve 7. gün zaman noktalarındaki akış sitometri ile canlılık analizlerinden elde edilen kantitatif veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

a, $p < 0,0005$; b, $p < 0,0001$

İstatistiksel değerlendirmeler aynı saat dilimindeki kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapıldı.

MCF10ANekrotik hücre oranları (Akış analizi)

(Ortalama \pm Standart Sapma)

Grup	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	7 gün
Kontrol	4,22 \pm 0,14	8,01 \pm 1,23	5,94 \pm 2,02	2,58 \pm 3,30	1,66 \pm 0,27
25 μ M	5,71 \pm 1,27	10,78 \pm 2,44	4,92 \pm 1,58	4,51 \pm 0,73	1,37 \pm 0,39
50 μ M	13,41 \pm 3,48	7,43 \pm 4,76	7,83 \pm 1,33	4,99 \pm 0,41	2,52 \pm 0,84
75 μ M	16,09 \pm 9,04	38,33 \pm 5,44 ^c	6,49 \pm 1,47	3,48 \pm 2,28	5,02 \pm 2,80
100 μ M	21,64 \pm 4,49 ^b	24,03 \pm 1,03 ^a	35,30 \pm 0,93 ^c	2,56 \pm 2,60	0,81 \pm 0,55

Tablo 2. 25, 50, 75, 100 μ M Timokinon verilen gruplar olup 12, 24, 48, 72 saat ve 7. gün zaman noktalarındaki akış sitometri ile nekrotik hücre analizden elde edilen kantitatif veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

a, $p < 0,05$; b, $p < 0,005$; c, $p < 0,0001$

İstatistiksel değerlendirmeler aynı saat dilimindeki kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapıldı.

MCF10A Geç Apoptotik hücre oranları

(Ortalama ± Standart Sapma)

Grup	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	7 gün
Kontrol	1,16±0,43	0,44±0,19	1,59±0,48	0,38±0,32	0,29±0,17
25 µM	0,63±0,24	0,39±0,07	0,67±0,31	0,39±0,05	0,26±0,098
50 µM	1,31±0,34	0,54±0,04	1,03±0,20	1,07±0,083	1,53±0,30
75 µM	4,92±2,45	14,67±3,77	30,26±01,12 ^b	57,69±7,74 ^b	61,39±5,08 ^b
100 µM	16,31±3,05 ^a	23,75±7,06 ^b	37,29±17,51 ^b	82,88±15,18 ^b	95,00±1,83 ^b

Tablo 3.Farklı Timokinon konsantrasyonları verilen gruplar olup 12, 24, 48, 72 saat ve 7. gün zaman noktalarındaki akış sitometri ile geç apoptotik hücre analizden elde edilen kantitatif veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

a, p<0,05; b, p<0,0001

İstatistiksel değerlendirmeler aynı saat dilimindeki kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapıldı.

MCF10A Erken Apoptotik hücre oranları

(Ortalama ± Standart Sapma)

Grup	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat	7 gün
Kontrol	0,39±0,20	0,12±0,054	0,20±0,10	0,61±0,51	0,037±0,017
25 µM	0,10±0,05	0,09±0,005	0,18±0,066	0,08±0,012	0,07±0,04
50 µM	0,13±0,08	0,20±0,17	0,23±0,057	0,11±0,029	0,79±0,127
75 µM	1,55±0,63	1,40±0,64	1,14±0,96	8,24±1,14 ^a	6,65±2,40 ^b
100 µM	10,78±5,44 ^c	16,16±6,82 ^c	5,38±3,36 ^d	6,93±4,77 ^c	2,82±1,66

Tablo 6. 25, 50, 75, 100 µM Timokinon verilen gruplar olup 12, 24, 48, 72 saat ve 7. gün zaman noktalarındaki akış sitometri ile geç apoptotik hücre analizden elde edilen kantitatif veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

a, p<0,005; b, p<0,05; c, p<0,0001; d, p<0,5

İstatistiksel değerlendirmeler aynı saat dilimindeki kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapıldı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ranunculaceae ailesinden olan *Nigella sativa*'dan 4 farklı biyoaktif molekül elde edilir. *Nigella Sativa*'dan elde edilen biyoaktif moleküller; Timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol'dür. En fazla biyoaktif özelliğine sahip olan Timokinon'dur^{13,14}. Timokinon molekülünün farklı doz çalışmalarında elde edilen veriler ışığında inflamasyonu, anjiogenezi, karsinogenezi ve tümör ilerleyişini inhibe ettiği bulunmuştur^{15,14}.

Son dönemde yapılan bir çalışmada, fare embriyonik fibroblast hücrelerine (NIH/3T3) ve Sağlık meme epitel hücrelerine (HMEC) 0.01–25 mM Timokinon farklı dozlarda verildikten sonraki ilk 48 saatte sitotoksik etkisi olmamaktadır¹⁶.

50 µM Timokinon verilen insan sağlıklı pankreatik duktal epitel hücreleri (HPDE) 72 sonunda incelendiğinde hücre sayılarında minimal kayıp olmaktadır¹⁷. İnsan sağlıklı intestinal hücrelerine (FHs74Int) 60 µM Timokinon uygulandığında 24. saatin sonunda hücre proliferasyonu ve canlılık oranı etkilenmemektedir.¹⁸ Nonkanseroz prostat epitel hücrelerine (BPH-1) 100 µM Timokinon uygulandığında 48. saatin sonunda hücre proliferasyon oranları etkilenmemektedir¹⁹. HMEC ve NIH/3T3 hücrelerine 60 µM Timokinon verildiğinde hücreler 48. Saatin sonunda % 80'den fazla oranda canlılığını korumaktadır¹⁶.

Planlanan çalışma kapsamında, Timokinon'un isim ve koduyla piyasadan hazır bulunan sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerine doz bağımlı ve zaman bağımlı etkilerinin MTT ve Akış sitometri cihaz analizleri ile incelendi. Çalışmamız sonucunda, 25 µM ve 50 µM Timokinon molekül konsantrasyonunda 12., 24., 48., 72. saatler ve 7. gün etkileri sağlıklı meme epitel hücre hattı üzerinde MTT ve Akış sitometreleri ile canlılık analizleri incelendiğinde kontrol gruplarıyla istatistiksel bir farklılık olmadığı görüldü (Şekil 1-2, Tablo 1). Ayrıca, 75 µM ve 100 µM Timokinon konsantrasyonunun sırasıyla 24. ve 12. saatten itibaren sitotoksik etkisi başlamaktadır (Şekil 3-4, Tablo 1). 75 µM ve 100 µM Timokinon verilen grupta 7. günün sonunda hücrelerin canlılığında % 80 ve % 90'dan fazla oranda azalma görülmektedir (Şekil 3-4, Tablo 1).

Çalışmamızda, 25 µM ve 50 µM Timokinon verilen sağlıklı meme epitel hücrelerinin 12., 24., 48., 72. saatler ve 7. gün canlı hücre oranları, erken apoptotic

hücre oranları, geç apoptotic ve nekrotik hücre oranları control gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktadır. 75 µM Timokinon verilen grupta 72. saat sonunda ve 100 µM Timokinon verilen gruplarda 12., 24., 48., 72. Saatler sonunda erken apoptotic hücre analiz sonuçları control gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Çalışmamızın sonuçları, Motaghed ve ark.'nın 12. saat ve 24. Saat çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, proje kapsamında araştırılan in vitro sağlık meme epitel hücrelerine 7. güne kadar sitotoksik etkisinin olmadığı maksimum dozun 50 µM olduğu MTT ve Akış sitometrisi ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi ile hesaplanarak elde edildi.

KAYNAKLAR

1. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, and H. J. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med***61**, 33 – 36 (1995).
2. Yi, T. *et al.* Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics***7**, 1789–1796 (2008).
3. Woo, C. C. *et al.* Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical Pharmacology***82**, 464–475 (2011).
4. Arafa, E. S. a *et al.* Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis***706**, 28–35 (2011).
5. Woo, C. C. *et al.* Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical Pharmacology***82**, 464–475 (2011).
6. Gali-Muhtasib, H. *et al.* Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology***25**, 857–866 (2004).
7. El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G. & Wani, A. A. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International Journal of Cancer***117**, 409–417 (2005).
8. Shoieb, a M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L. & Tithof, P. K. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Onco***22**, 107–113 (2003).
9. Effenberger, K., Breyer, S. & Schobert, R. Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chemistry and Biodiversity***7**, 129–139 (2010).
10. Gurung, R. L. *et al.* Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PLoS ONE***5**, e12124 (2010).
11. Mansour, M. A. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine

- against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life sciences***66**, 2583–2591 (2000).
12. Badary, O. a & Gamal El-Din, a M. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer detection and prevention***25**, 362–8 (2001).
 13. Sethi, G., Ahn, K. S. & Aggarwal, B. B. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Molecular cancer research : MCR***6**, 1059–1070 (2008).
 14. Sutton, K. M., Greenshields, A. L. & Hoskin, D. W. Thymoquinone, a bioactive component of black caraway seeds, causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells with mutant p53. *Nutrition and cancer***66**, 408–18 (2014).
 15. Woo, C., Kumar, A., Sethi, G. & Tan, K. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology***83**, 443–451 (2012).
 16. Rajput, S. *et al.* Targeted Apoptotic Effects of Thymoquinone and Tamoxifen on XIAP Mediated Akt Regulation in Breast Cancer. *PLoS ONE***8**, e61342 (2013).
 17. Banerjee, S. *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research***69**, 5575–5583 (2009).
 18. El-Najjar, N. *et al.* Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis***15**, 183–195 (2010).
 19. Kaseb, A. O. *et al.* Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research***67**, 7782–7788 (2007).