

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERVİKS KANSER HÜCRE HATTINDA
TİMOKİNONUN SİSPLATİN SİTOTOKSİSİTESİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm.Bio.Songül YILMAZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERVİKS KANSER HÜCRE HATTINDA TİMOKİNONUN SİSPLATİN
SİTOTOKSİSİTESİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm.Bio.Songül YILMAZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr.Sevtap AYDIN**

ANKARA

2018

**SERVIKS KANSER HÜCRE HATTINDA TIMOKINONUN
SISPLATIN SITOTOKSİSİTESİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Bio. Songül YILMAZ

Danışman: Doç. Dr. Sevtap AYDIN

Bu çalışma 04 Temmuz 2018 tarihinde, jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji tezli Yüksek Lisans Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof.Dr.Nurşen BAŞARAN
(Hacettepe Üniversitesi)



Danışman: Doç. Dr. Sevtap AYDIN
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof.Dr.Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr.Ü. Pınar ERKEKOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ
(Ankara Üniversitesi)



ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Temmuz 2018


Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitüsü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisanüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

√ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

04 / 07 / 2018



Bio.Songül YILMAZ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Sevtap AYDIN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Bio.Songül YILMAZ

04 / 07 / 2018

TEŞEKKÜR

Toksikoloji alanındaki akademik çalışmamda bana yol gösterici ve ışık olan, her konuda desteği ile mesafeleri yakınlaştıran, beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Sevtap AYDIN'a hayatım boyunca bana eşlik edecek katkı ve emekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimdeki çok değerli katkıları için, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki her bir hocama ve dönem arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her adımında bana güç olan ve hayatımı kolaylaştıran Annem, Fekiye YILMAZ ve Babam, Seyfettin YILMAZ başta olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ÖZET

Yılmaz, S. Serviks Kanser Hücre Hattında Timokinonun Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.

Timokinon Türkiye’de çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa* L. tohumlarının uçucu yağından elde edilen monoterpen bir molekül ve biyoaktif bir bileşiktir. Yüzyıllardır gıda olarak tüketilmekle beraber, timokinonun başlıca antioksidan özelliği ve özellikle glutatyon mekanizması üzerindeki etkisi sayesinde antikanser etkisinden, antialerjik etkisine kadar çok geniş bir koruyucu yelpazesine sahip olduğu iddia edilmektedir. Platin bazlı bir antikanser ajanı olan sisplatin; over, serviks, testis, prostat, mesane, akciğer kanserleri gibi solid tümörlerin tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır ve mekanizması iyi bilinmektedir. Kemoterapide kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltmak ve vücut içi etkilerini arttırmak amacıyla kombine olarak bitki ekstraktlarının kullanımı araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında önemli biyolojik etkileri olduğu bilinen ve son yapılan çalışmalarda önemi gittikçe artan timokinonun antikanser ilaç olan sisplatinle birlikte kombine kullanımının serviks kanser hücreleri (HeLa) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Sisplatin ve timokinonun farklı zamanlarda sitotoksiste profili belirlendikten sonra geniş doz ranjında timokinonun sisplatinin IC₅₀ değeri üzerine etkileri incelendi. HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarında timokinonun IC₅₀ değeri sırasıyla 143,7 µM ve 67,5 µM olarak ve sisplatinin IC₅₀ değeri sırasıyla 20,3 µM ve 12,9 µM olarak belirlendi. HeLa hücrelerinde timokinonun 24 saatlik inkübasyonlarında 7,8-250 µM doz aralığında ve 48 saatlik inkübasyonlarında 15,6-250 µM doz aralığında sisplatinin IC₅₀ değerini doz bağımlı istatistiksel anlamlı azalttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, bulgularımız HeLa hücrelerinde timokinonun sisplatin sitotoksitesini arttırabileceğini göstermektedir ve dolayısıyla timokinonun sisplatinin antikanser etkisini arttırabileceği düşünülmektedir; ancak bu etkilerin doğrulanması ve antikanser ilaçlar ile etkileşmelerini belirlemek üzere daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, sisplatin, sitotoksiste, HeLa, *in vitro* testler

ABSTRACT

Yılmaz, S. Investigation of the Effects of Thymoquinone on Cisplatin Cytotoxicity in Cervical Cancer Cell Lines. Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2018.

Thymoquinone, derived from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seed known as black seed “çörek otu” in Turkey, is a monoterpene molecule and a bioactive compound. Along with being consumed as food for centuries, thymoquinone has been suggested to have a wide range of protection from anticancer effect to antiallergic effect due to mainly its antioxidant properties and especially its effect on glutathione mechanism. Cisplatin, a platinum-based anticancer agent, as been over, has been used for many years in the therapy of the solid tumours such as cervix, testis, prostate, bladder, lung cancers, and its mechanism is well known. The use of plant extracts in combination with chemotherapeutic drugs has been investigated in order to reduce the side effects of the drugs used in the chemotherapy and to increase their effects on the body. In this thesis study, the cytotoxic effects of the use of thymoquinone, which is known to be significant biological effects and of which the importance has been increasingly in recent studies, were investigated in combination with anticancer drug cisplatin in the cervical cancer cells (HeLa) using MTT method. After determination of the cytotoxicity profiles of cisplatin and thymoquinone at different times, the effects of thymoquinone in a wide dose range on the IC₅₀ values of cisplatin were investigated. In HeLa cells, for 24 h and 48 h incubations, IC₅₀ values of thymoquinone were found to be 143.7 µM and 67.5 µM, respectively and IC₅₀ values of cisplatin were found to be 20.3 µM and 12.9 µM, respectively. Thymoquinone at the concentration range of 7.8-250 µM for 24 h incubation and 15.6-250 µM for 48 h incubation, has been shown to statistically significant decrease the IC₅₀ values cisplatin in a dose-dependent in HeLa cells. In conclusion, our findings indicate that thymoquinone may increased the cytotoxicity of cisplatin in HeLa cells, and therefore thymoquinone may increase the anticancer effect of cisplatin; however to confirm these effects and to determine its interactions with anticancer drugs, the advanced *in vitro* and *in vivo* studies are needed.

Key Words: Thymoquinone, cisplatin, cytotoxicity, HeLa cells, *in vitro* assays

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Timokinon	3
2.1.1. Çörek Otu Tohumu ve Geleneksel Kullanımı	3
2.1.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri	6
2.1.3. Timokinonun Farmakokinetik Özellikleri	6
2.1.4. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizmaları	8
2.1.5. Timokinonun Farmakolojik Etkileri	10
2.1.6. Timokinonun Toksisitesi ve Güvenliliğinin Değerlendirilmesi	23
2.2. Sisplatin	25
2.2.1. Sisplatin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı	25
2.2.2. Sisplatin Farmakokinetik Özellikleri	26
2.2.3. Sisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları	28
2.2.4. Sisplatin Toksisitesi	34
2.3. Sitotoksite Belirleme Yöntemleri	38
2.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	40
2.3.2. Yaşamsal Devamlılığının Değerlendirilmesi	40
2.3.3. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	41
2.3.4. Metabolik Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	41

2.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	45
3.3. Çalışma Çözeltileri	46
3.4. Hücrelerin Çoğaltılması	47
3.5. Timokinonun HeLa Hücre Hattında Sisplatin Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	49
3.6. İstatistiksel Yöntemler	50
4. BULGULAR	51
4.1. Timokinon HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi	51
4.2. Sisplatinin HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi	54
4.3. Timokinonun HeLa Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi	57
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Akt	Protein kinaz B
ALT	Alanin aminotransferaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AST	Aspartaz aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BrdU	5-bromo-2'-deoksiüridin
b.w.	Vücut ağırlığı
CAT	Katalaz
CCL₄	Karbon terakloridin
CO₂	Karbondioksit
CDDP	Sisplatin
CIS	Sisplatin
COX	Siklooksijenaz
CPK	Kreatin fosfokinaz
CYP450	Sitokrom p450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMBA	7,12- dimetilbenz[a]antrasen
DMH	Dimetil hidanton
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit, disodyum tuzu
FBS	Yenidoğan Sığır Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GGT	gama-glutamil transpeptidaz
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyan peroksidaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma
HOCl	Hipoklorik asit
HPLC	Yüksek yoğunluklu likid kromatografi

IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyon
IFN-α	İnterferon alfa
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
ip	İntraperitoneal
iv	İntravenöz
NOS	Nitrik oksit sentaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LD₅₀	Popülasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LO	Lipooksijenaz
MAPK	Mitojen aktive protein kinazlar
MDA	Malondialdehit
MDCK	Madin-Darby köpek böbreği
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş hali)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş hali)
NEDA	Nitrosodietilamin
NF-κB	Nüklear faktör kappa beta
NMRI	İsveç tipi fare
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
NO	Nitrik oksit
NOAEL	Yan etki gözlenmeyen doz (<i>No observed adverse effect level</i>)
OCT	Organik katyon taşıyıcısı
OVA	Ovalbümin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
PG	Prostaglandin
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz

PPARs	Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler
Pt	Platin
ROS	Reaktif oksijen türü
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFE	Süper kritik sıvı ekstraksiyonu
SH-	Tiyol grubu
SiHa	İnsan servikal skuamöz karsinom hücreleri
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TK	Timokinon
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TNF-α	Tümör nekroz edici faktör alfa
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. <i>Nigella sativa</i> bitkisi ve tohumu.	3
2.2. Çörek otu tohumu ve timokinonun kimyasal yapısı.	6
2.3. Timokinonun redoks döngüsü.	7
2.4. Timokinonun kansere karşı mekanizmaları.	17
2.5. Sisplatinin moleküler yapısı.	26
2.6. Sisplatin ve sulu solüsyonda monohidrate kompleks ilişkisi.	28
2.7. Sisplatin hedefleri.	29
2.8. Sisplatinin DNA eklentisi oluşturması.	32
2.9. HeLa hücrelerinin (A) düşük konsantrasyonlarda, (B) yüksek konsantrasyonlarda mikroskopik görünümleri.	43
3.1. Neubauer hücre sayım lamı.	48
4.1. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi.	52
4.2. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 48 saat maruziyette etkisi.	53
4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	54
4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	55
4.5. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	56
4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	57
4.7. HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	59

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>Nigella sativa</i> L. tohumunun genel içeriği.	4
2.2. <i>Nigella sativa</i> L. tohumu uçucu yağının kimyasal bileşenleri.	5
2.3. Timokinonun <i>in vivo</i> çalışmalardan elde edilen antikanser etkileri.	14
2.4. Timokinon ve çörek otu yağının LD ₅₀ değerleri.	24
2.5. Sisplatin metabolizması ve toksisitesini etkileyen faktörler.	33
2.6. Sisplatin uygulamasına bağlı gelişen istenmeyen etkiler.	37
4.1. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi.	52
4.2. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 48 saat maruziyette etkisi.	53
4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	55
4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	56
4.5. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	58
4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	58

1. GİRİŞ

Kanser 20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olmakla beraber 21. yüzyılda da devamlı ve artan bir yayılım göstermektedir. Dünyadaki ölüm nedenlerinin başında yer almakla beraber meme ve serviks kanseri, kadınlarda en sık görülen iki kanser tipi olarak tanımlanmıştır. Son elli yılda kansere açılan savaş, kansere karşı yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasında önemli bir gelişmeye yol açmıştır. Ancak kemoterapötik ajanlar gibi birçok tedavi seçeneğinin ortaya çıkmasına rağmen bazı kanser tiplerinin tedavisinde etkili olduğu bulunan akıllı ilaçlar gibi seçeneklerin çok da fazla değişmediği görülmüştür. Kanserin uzun süreli tedavisinde farmakolojik tedaviler ve kemoterapinin yüksek maliyeti ve potansiyel toksisitesinden dolayı araştırmalar yönünü, doğal olarak bulunan, yüksek etkiye sahip ve farmasötik bileşenlere oranla daha düşük yan etki riskine sahip farmasötik olmayan ürünlere çevirmiştir. Yapılan deneysel araştırmalar, doğal bileşenlerin ve bitki ekstrelerinin, çeşitli biyoanaliz ve hayvan modellerinde antikanser potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Hatta dünyanın çeşitli yerlerinde baharat gibi besin maddesi olarak tüketilen ürünlerin tatlandırıcı, renklendirici veya koruyucu özellikleri dışında kanser dahil bir çok hastalığın korunmasında ve iyileştirilmesinde kullanıldığı belirtilmektedir (1-8).

Nigella sativa L., Ranunculacea (Düğünçeğigiller) ailesinden yıllık bir bitki olup ülkemizde Afyon, Burdur, Isparta’da yetişir ve siyah tohumu “çörek otu” olarak bilinir. Dünyada genellikle Akdeniz, Pakistan, Hindistan ülkelerinde yetişen ve özellikle Doğu Akdeniz ülkeleri gibi dünyanın birçok ülkesinde kültürü yapılan bir bitkidir. Çörek otunun çay, kahve, ekmek gibi besinlere ilave edilerek besinsel olmak üzere, farmasötik alanda da kullanımı bulunmaktadır. Çörek otu yağı her ne kadar Arap ve Akdeniz ülkelerine özgü olsa da binlerce yıl Akdeniz, Hindistan, Asya, Orta ve Uzak Doğu ülkelerinde baharat, gıda koruyucusu veya günlük doğal koruyucu ve tedavi edici bir seçenek olarak geleneksel kullanımı bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda çörek otu tohumunun %36-38’in karışık yağlardan oluştuğu ve uçucu yağ kısmının ana içeriğinin timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol olduğu saptanmıştır. Çörek otu uçucu yağın majör biyoaktif bileşeni timokinon olup aktivitesi antioksidan özelliğine bağlıdır. Yapılan çalışmalarda timokinonun çok

geniş bir koruyucu ve/veya tedavi edici özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Kanseri başta olmak üzere böbrek, immün sistem, gastrointestinal sistem, kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu ve tedavi edici etkisinin yanı sıra antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkilerinin de bulunduğu gösterilmiştir (9-19).

Sisplatin, alkilleyici ajanlar sınıfından iyi bilinen bir antineoplastik ilaç olarak karsinomlar, germ hücre tümörleri ve lenfomalar ve sarkomalarda kullanılmaktadır. Özellikle over, meme, beyin, testis, baş-boyun solid tümörlerinde; yumuşak doku, kemik, kas ve kan damarları sarkomalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Sisplatin tek başına kullanılabildiği gibi tedavi sırasındaki etkisini arttırmak, özellikle böbrekte kendini gösteren sitotoksitesi ve sisplatine karşı rezistansı en aza indirmek için diğer ilaçlar veya takviyelerle birlikte kullanılabilmektedir (20-22).

Yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere yüzyıllardır geleneksel tedavide kullanılan timokinonun sisplatin ile birlikte kullanımına bağlı oluşan etkiye ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında timokinonun insan serviks kanseri (HeLa) hücre hattında sisplatinin sitotoksitesi üzerindeki etkileri metil tiyazol tetrazolyum (MTT) yöntemi ile araştırılmıştır. Tez çalışmamızda belirli konsantrasyonlarda timokinonun ve sisplatinin farklı inkübasyon zamanlarında HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri incelendikten sonra timokinonun ve sisplatinin bir arada uygulanmasını takiben sisplatin sitotoksitesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda, hızlı bir yayılım gösteren kanserin tedavisinde timokinon ile sisplatin kombinasyonunun kullanımı hakkında bir görüş oluşması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Timokinon

2.1.1. Çörek Otu Tohumu ve Geleneksel Kullanımı

“Çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* L. Ranunculacea (düğünçiçeğigiller) familyasında yer alır, Güney Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika’da yetişir ve ülkemizde çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilir (23).

Çörek otu bitkisi doğrusal mızrak şeklinde yapraklara sahiptir, 5-10 petalli ve genellikle sarı, beyaz, pembe, soluk mavi ve mor renkli hassas çiçekleri bulunmaktadır (Şekil 2.1.). Birleşmiş folikülden oluşan kapsül şeklindeki bitki meyveleri geniştir. Kapsül sayısı genelde 3-7 adettir ve her bir kapsül yassı, oblong, angular ve huni biçimli, 0.2 cm boyundaki ve 0.1 cm genişliğindeki birçok siyah tohum içerir (24, 25).



Şekil 2.1. *Nigella sativa* bitkisi ve tohumu.

Tohumları baharat olarak ve geleneksel tıpta farklı formlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (26). Geleneksel tedavide astım, öksürük, bronşit, inflamatuvar hastalıklar, ateş, ağrı, baş dönmesi, böbrek ve karaciğer işlev bozuklukları, sinir sistemi hastalıkları, diyabet, egzema, mide-barsak sistemi problemleri, hipertansiyon, kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde kullanılabildiği

belirtilmektedir (27). Kanser hastalarında kemoterapiyle birlikte tamamlayıcı ve alternatif tıpta kullanılabileceği bildirilmektedir (26).

Çörek otu tohumunun besin değeri yüksektir. Çörek otu tohumunun yapısında başlıca doymuş/doymamış sabit yağlar (%31-35,5), uçucu yağlar (%0,4-0,45), karbonhidratlar (%33-34), proteinler (%16-19,9), amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, mineraller (kalsiyum, çinko, fosfat), vitaminler (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) bulunmaktadır (Tablo 2.1.) (28).

Tablo 2.1. *Nigella sativa* L. tohumunun genel içeriği (28).

İçerik	% (a/a)
Yağ	31-35,5
Protein	16-19,9
Karbonhidrat	33-34
Lif	4,5-6,5
Saponin	0,013
Nem	5-7
Kül	3,7-7

Doymamış yağ asitleri (~% 85); linolenik (omega-6) asit, oleik asit, linoleik asit, araşidonik asit, palmitoleik asit ve eikozadienoik asittir. Doymuş yağ asitleri (~%18); palmitik asit, stearik asit ve miristik asittir (28).

Çörek otu tohumu uçucu yağlarından çeşitli farmakolojik aktif kimyasal bileşenleri başlıca timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timoldür, ayrıca p-simen, d-limonen, α ve β -pinen, trans-anetol, karvakrol ve nigellon de içerir (Tablo 2.2.) (24, 26, 29).

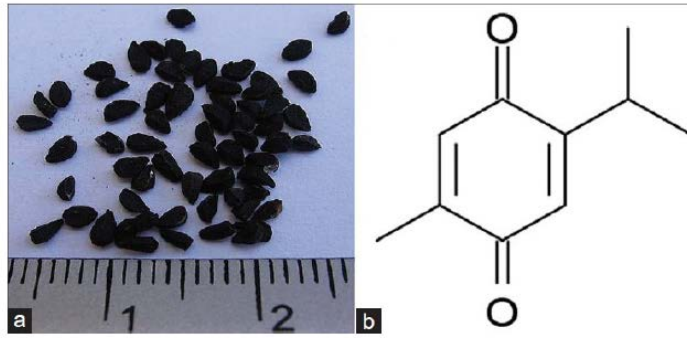
Tablo 2.2. *Nigella sativa* L. tohumu uçucu yağının kimyasal bileşenleri (30).

Uçucu sekonder metabolit	% Alan	Uçucu sekonder metabolit	% Alan
α -Tuyen	5,09	Longifolen	3,24
α - Pinen	1,00	Timohidrokinon	2,40
Sabinen	0,44	Nonil allil okzalat	0,24
β -Pinen	1,31	Sulforuz asit, 2-etilhekzil izohekzil ester	0,32
Terpinolen	0,56	1. 2,3-epoksi-gerianial	0,45
p-Simen	27,80	2-metil hekzanoik asit	0,16
α -Terpinen	5,23	4-Tridesen	0,92
cis-4-Metoksituyan	0,44	Sitronellil n-bütirat	0,88
trans-4-Metoksituyan	3,62	cis-11,14-Eikosaienoik sit metil ester	0,81
2E,4Z-Dekadienal	0,14	9-Undekenal, 2,10-dimetil	11,54
Terpinen-4-ol	0,21	2,6,11,15-Tetrametil-hekzadeka-2,8,8,10,14-pentaen	0,47
(+)-Dihidrokarvon	0,58	2,4-Oktadienal, (E,E),	0,15
Timokinon	28,70		
Karvakrol	2,44		
Asetamid, N-(2-hidroksi-3-pentenil)-	0,22		
Longipinen	0,61		

Çörek otu tohumu gıdalarda yiyecek, koruyucu ve baharat olarak kullanılmakla beraber, geleneksel olarak uzun yıllar çörek otu tohumu ve yağı çeşitli hastalıkların tedavisinde dünyanın her yerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çörek otunun aktif bileşenlerinin kanser dahil birçok hastalığa iyi geldiği bildirilmiştir. Antiinflamatuar, antialerjik, antihistaminik, antimikrobiyal, diüretik gibi çeşitli etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (24, 29, 31). Çörek otu tohumunun halk arasında kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık, karaciğer, böbrek ve solunum sistemi problemlerini düzeltebileceği ve geleneksel tıbbi kullanımında faydalı olabileceği düşünülmektedir (26, 27). Ayrıca çörek otu tohumundan yapılan tentürün ishal, dismenore, hazımsızlık, iştah kaybı, amenore ve kurt ve deri döküntüsünün tedavisinde kullanıldığı, kusmanın önlenmesinde çörek otu tohumlarının kavruarak dahilen verildiği ve yağının ise haricen antiseptik olarak kullanıldığı kayıtlıdır (31).

2.1.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri

Timokinon ilk olarak *Nigella sativa* L.'den 1963 yılında El-Dakhakhany tarafından ekstre edilen bir monoterpen bir bileşiktir (32). Molekül formülü $C_{10}H_{12}O_2$ ve molar ağırlığı 164,20 g/mol olan timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1, 4-kinon), tohumun uçucu yağının en biyoaktif majör bileşenidir. Enol, keto ve karışık formlardan oluşur. Hidrofobik özelliği, biyoyararlanımını ve ilaç formülasyonlarında kullanımını kısıtlamaktadır (32). Kimyasal analizlerde çörek otu tohumu uçucu yağın %27.8'e kadar ulaşabilen oranlarda timokinon içerebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.2.) (33).



Şekil 2.2. Çörek otu tohumu ve timokinonun kimyasal yapısı (1, 34).

Timokinonun 0,1 N hidroklorür, su ve PBS (pH 5; 7,4 ve 9,0'da) çözeltilerinde çözünürlüğünün aynı olduğu görülmüştür. HPLC kullanılarak yapılan analizlerde timokinonun düşük pH'da daha stabil olduğu ve pH artışına bağlı olarak stabilitenin azaldığı belirlenmiştir. Işık ile ilgili olarak, kısa süreli maruziyette bile timokinonun yüksek hassasiyet gösterdiği belirtilmiştir. Timokinonun fotoliz kinetiği etanol kullanılarak çalışılmıştır ve çalışmalar timokinonun %70'inden fazla bir oranda hızlıca bozulduğunu göstermiştir (35).

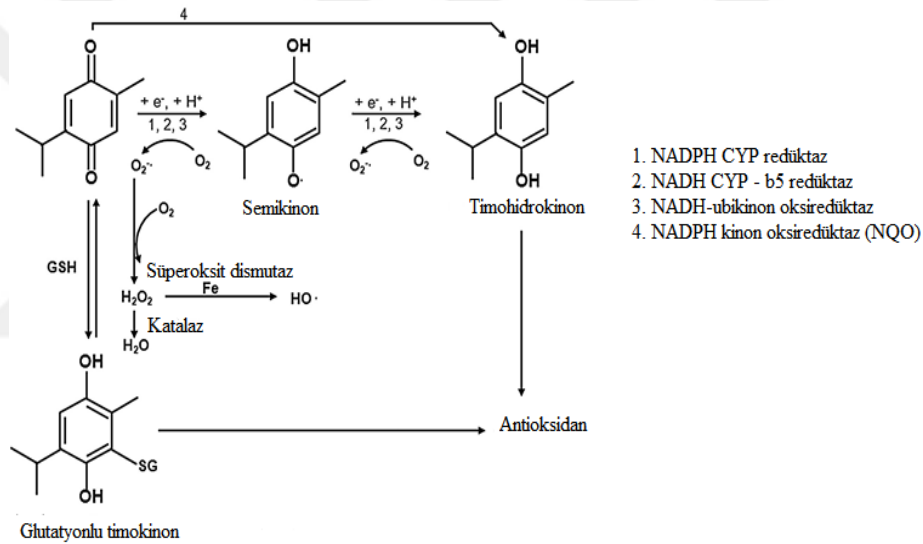
2.1.3. Timokinonun Farmakokinetik Özellikleri

Timokinonun oral, intraperitoneal (i.p.), subkütan (36) ve intravenöz (i.v.) (37) uygulamaları bulunmaktadır.

Alkharfy ve ark. (38)'nin 2.5-3 kg ağırlığındaki sağlıklı 10 Vole erkek

tavşanında yaptığı çalışmada 5 mg/kg i.v. ve 20 mg/kg oral hedef doza kadar, timokinonun tüm hayvanlar tarafından tolere edildiği gösterilmiştir. İntravenöz uygulama sonrasındaki ortalama plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi, oral uygulama sonrasındakinden yüksek çıkmıştır ($7,49 \pm 0.24$ 'e karşı $3,48 \pm 0.12$ µg/ml). Timokinonun oral uygulanmasından sonra plazma konsantrasyonu 2 saat içinde maksimum düzeye ulaşarak hızla artmıştır (38).

Timokinonun ağız yolu ile alınmasını takiben karaciğer enzimleri (DT-diaforaz (kinin redüktaz) ile metabolize edilerek hidrokinona indirgendiği ve hidrokinonun konjüge edilip daha sonra merkaptürik asite dönüştürülerek idrarla atıldığı bildirilmektedir (Şekil 2.3.) (27).



Şekil 2.3. Timokinonun redoks döngüsü (39).

Timokinon proteinlere yüksek oranda bağlanır ve timokinon-protein bağlanmasının tahmini yüzdesi tavşanlarda %99.19, insanlarda %98.99 olarak bildirilmiştir (38).

Birçok terapötik uygulamaları olmasına karşın yüksek hidrofobik özelliği ve düşük çözünürlüğünden dolayı timokinonun ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi açısından sınırlandırıcı etki yaratmaktadır (40). Timokinonun bu problemi, nanopartikülat enkapsülasyon sistemleri ile çözülmüştür. Timokinonun biyoyararlanımı ve aktivitesi arttırılarak, son yıllarda yeni analoglar elde edilmiştir

(katı lipid nanopartiküller, timokinon-yüklü nano-yapılı lipid taşıyıcılar, timokinon-yüklü lipozomlar bu analogların bazılarıdır) (27, 41, 42).

2.1.4. Timokinonun Moleküler Etki Mekanizmaları

Timokinonun tüm etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamakla beraber oldukça karmaşıktır. Yapılan çalışmalarda ortaya koyulan genel moleküler etki mekanizmaları; inflamasyon aracıları ve oksidatif parametreler, peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler (PPARs), apoptoz, transkripsiyon faktörleri üzerine etkileri şeklinde ortaya çıkmaktadır.

Çörek otu yağının en zengin bileşeni timokinonun antioksidan, antiinflamatuvar, kemokoruyucu etkileri raporlanmıştır. Normal hücrelere minimum toksik etki göstererek, kolorektal karsinom, meme adenokarsinom, osterosarkom, overian karsinom, miyeloblastik lösemi ve pankreatik karsinomanın da dahil olduğu çeşitli tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (43-45).

a. İnflamasyon aracıları üzerine etkisi

COX1 ve COX2, prostanoid yapımında rol alan rol alan sikloosigenaz (COX) enzim tipidir (46). COX2'nin fazla ekspresyonu akciğer, mide, meme ve pankreatik gibi birçok kanserde görülen bir durumdur (47). Bu durum prostaglandinin (PG) anjiyogenezisi up-regüle etmesi ve apoptoza direnci arttıracığından kritik bir öneme sahiptir (48, 49). COX2 inhibisyonu tümörün olmadığı diğer dokular üzerinde bazı yan etkilere neden olduğundan; son yıllarda COX2 inhibisyon mekanizmasıyla kanser koruyuculuğu seçeneğinde doğal ürünlere ilgi artmıştır (35).

Timokinon farede alerjik solunum yolu inflamasyonunda COX2 ekspresyonun ve PG üretiminin azalmasında önemli bir etki sağlamıştır (50). Timokinon p47PHOX fosfor peptitlerinin Ser-304 ve Ser-328'indeki fosforilasyonun bozulmasıyla indüklenmiş FLMP inflamasyonunu azaltmıştır (51).

b. Peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler üzerine etkisi

PPARs ligandları, PPARs'lerin aktivasyonu ve up-regülasyonu aracılığıyla çeşitli genetik yolları düzenleyerek potansiyel kanser koruyucu etki göstermiştir.

Timokinonun PPAR- γ üzerinde up-regülasyonu sağladığı ve hücre ölümünde ve meme kanser hücrelerinin devamlılığı mekanizmalarında rol oynayan genlerde ise down-regülasyonu gösterilmiştir (52). Bulgular, timokinonun antikanser aktivitesi aracılı PPAR- γ aktivasyonunu ortaya koymuştur (46).

c. Oksidatif parametreler üzerindeki etkisi

Reaktif oksijen türleri (ROS) süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (OH $\cdot$), peroksil ($RO_2\cdot$) ve alkoksil (RO $\cdot$) radikallerini içeren kısa ömürlü oksijen kaynaklı küçük moleküllerdir. Singlet oksijen (1O_2), ozon (O_3), hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi non-radikal türler okside edici ajanlar gibi rol oynar ve kolaylıkla radikallere dönüşürler (53). ROS oluşumu genellikle mitokondriyal solunum esnasında tekli elektron transferi ile oksijenden süperoksit üretimi ile başlayan olaylar dizisi sonucu meydana gelir ve hidroksil radikallerinin majör kaynağıdır. Süperoksit hızla spontan olarak özellikle düşük pH'da veya süperoksit dismutaz tarafından katalize edilme sonucu olarak hidrojen perokside dönüştürülür. Hidrojen peroksit nükleer membranı aşar, metal iyonları ile Fenton reaksiyonuna girer ve hidroksil radikalleri oluşur (54). Demir ve bakırın hidroksil radikali oluşumunu teşvik ediyor olabileceği öngörülmektedir (55).

Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* hayvan modelinde oksidatif stresi başlatan serbest radikallere karşı timokinonun serbest radikal süpürücü özelliği gösterilmiştir. Güçlü antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinden dolayı timokinonun, oksidatif hasara, organ bozukluklarına ve böylece çeşitli hastalıkların patogeneze yol açan çeşitli çevresel toksinler ve ksenobiyotiklerin yan etkilerini azaltabileceği gösterilmiştir (56, 57). Ayrıca timokinonun, SOD'un aktivitesini arttırdığı ve çeşitli deneysel patolojik koşullar altında GSH'ı indükleyerek hücrel oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (58-60).

d. Apoptoz üzerindeki etkisi

Timokinonun, tümör supressör genleri aktive ederek kansere karşı korunmada önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (35). Timokinon, p53 (kanserlerin %50'sinde değişikliğe uğrar), p21 ve p27 gibi tümör supresör genlerin modülasyonunda önemli bir rol oynar (61, 62). Timokinonun p53 bağımlı yolak aracılığı ile insan kolon

kanser hücreleri ve hayvan modellerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (63). Timokinon tedavisi aynı zamanda DNA disintegrasyonu, kaspazın uyarılması ve PARP klevajı (süpürülme) ile apoptozu düzenlemektedir (64).

e. Transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi

Transkripsiyon faktörü Nrf-2, GST, SOD, CAT, NOQO ve HO-1 gibi hücre koruyucu antioksidan enzimlerin işleyişini düzenleyen bir hücre sinyal transkript faktördür. Oksidatif strese karşı, hücreler reaktif elektrofillerin konsantrasyonunu düşüren ve karsinojenleri detoksifiye eden faz 1 ve faz 2 enzimlerini indükler. Faz 2 enzimlerinin ekspresyonu antioksidan yanıt göstergesi ve transkripsiyon faktörü nükleer faktör E2 p45 ilgili faktör (Nrf-2) tarafından regüle edilir (65).

Timokinon hücreler arası sinyal iletimini etkilemek suretiyle oksidatif savunma proteinlerinin ekspresyonlarını ve faz 2 ilaç metabolize edici enzimleri etkilemektedir. Bu enzimler zararlı maddeleri vücutta detoksifiye eder ve sisplatin gibi anti-kanser ilaçlara karşı sitoprotektif etkilerde güçlü bir rol oynarlar. Timokinonun, Nrf-2 faktörünün up-regülasyonu ile fare modelinde indüklenmiş siklofosamid hemorajik sistitte organ koruyucu olduğu bildirilmiştir (57).

2.1.5. Timokinonun Farmakolojik Etkileri

Yapılan çeşitli çalışmalarda timokinonun farmakolojik olarak birçok etki gösterdiği ortaya koyulmuştur.

- Antioksidan etkisi

Süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit, hidroksi radikal ($OH^\cdot$) ve hipoklorik asit içeren reaktif oksijen türevlerinin (ROS), hücrelerdeki normal metabolik prosesle oluştuğu ve oksijenin zararlı etkisinin bu yüksek reaktif ve toksik türlere indirgenmesi sonucu oluştuğu bilinmektedir (66).

Oksidatif stresin oluşmasının en büyük nedeninin; süperoksit ve nitrit iyonları gibi ROS tarafından tetiklenen, oksidan düzeyi ile fizyolojik antioksidan arasındaki dengesinin bozulması olduğu bildirilmiştir (67). *İn vitro* ve *in vivo* birçok çalışmada timokinonun güçlü antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir (68, 69).

Bazı hastalıklarda ROS düzeylerinin yükselmesinden kaynaklanan yan etkileri timokinonun antogonize edebildiği ve bu özelliğini timokinonun oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan savunmayı arttırarak gösterebildiği bildirilmektedir. Timokinonun antioksidan etki potansiyelinin, molekül yapısındaki kinonun redoks özellikleriyle ve timokinonun fizyolojik bariyerlerden ve subelüler kompartmanlara kolay geçmesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (27). Timokinon antioksidan etkisini 3 yolla göstermektedir:

1) Serbest radikal süpürücü etkisi

Timokinonun nano ve mikro konsantrasyonlarında serbest ve süperoksit radikallerin uzaklaştırıldığı bildirilmiştir. Ayrıca dozun artışıyla beraber değişkenlik gösteren demire bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe ettiği bulunmuştur (70). Timokinonun ayrıca P44/42 ve p-38 proteinlerini inhibe ederek nitrik oksit sentaz (NOS) transkripsiyonunu ve süperoksit ile birleştiğinde peroksinitrit oluşturan nitrik oksit (NO) üretimini baskıladığı bildirilmiştir. Peroksinitritin tirozin rezidülerinin nitrasyonu ile doku hasarı meydana getirdiği bildirilmiştir (71).

2) Antioksidan enzim sistemini harekete geçirmesi

Antioksidan enzimlerin iç ve dış faktörler tarafından oluşturulan serbest radikallere karşılık verdiği ve timokinonun SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (G-Px) ve glutatyon-S-peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin üretimini kontrol eden genlerin mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (72). Ayrıca Nagi ve Almakki (2009) fare karaciğeri üzerinde timokinonun kinon redüktaz ve glutatyon transferaz üretimini arttırdığını göstermişlerdir (73).

Timokinonun lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi ve güçlü bir süperoksit radikal püskürtücü olarak rol almasından dolayı süperoksitlere karşı süperoksit dismutaz kadar etkili olduğu bildirilmiştir (70, 73, 74).

Badary ve ark. (70)'nın yaptığı çalışmada timokinonun, ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle süperoksit anyon üretiminin doza bağlı timokinon kullanılmasıyla önemli derecede inhibe olduğu ancak bunun ksantin oksidaz aktivitesinin inhibisyonu ile sağlanmadığı gösterilmiştir (70).

Timokinonun, katalaz (CAT) aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir ve timokinon tedavisinin iskemi-reperfüzyon (I/R) yaralanmasına karşı karaciğer dokusunu koruyabileceği ileri sürülmüştür (75).

Timokinonun terbutilepoksit ile oksidatif strese maruz bırakılan izole edilmiş sıçan hepatositlerinde azalan hücre içi glutatyon düzeyini arttırarak ve oluşan piridin nükleotidlerinin oksidasyonunu engelleyerek hepatosit hücre membran bütünlüğünü koruyabildiği gösterilmiştir (76).

Timokinon, oksidatif strese rolü olan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu engelleyebildiği ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırabildiği, ayrıca, NADH düzeyini ve NADH-NAD⁺ değişimini azaltarak hepatositlerde lipojenez inhibisyonuna neden olduğu da gösterilmiştir (77).

Timokinon oksidatif hasara karşı birden fazla hücre, doku ve organ üzerinde koruyucu etkilere sahiptir. Timokinonun sisplatin, doksorubisin, gentamisin, vankomisin ve civa klorürün neden olduğu böbrek toksisitesine, karbon tetraklorür, siklofosfamid, asetaminofen ve aflatoksin B1 ile indüklenen hepatotoksositeye ve siklofosfomid ve doksorubisinin kalp toksisitesine karşı koruyucu etkileri bulunur. Timokinonun siklofosfamid, toluen ve bleomisin kaynaklı akciğer hasarını azalttığı, benzopiren kaynaklı mide tümörlerini engellediği ve gentamisin ototoksitesini engelleyerek koruyucu rol aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (27).

3) Mitokondriyel fonksiyon artışı

Timokinon ile substrat kullanımının ve/veya oksidatif fosforilasyonun önemli derecede indüklendiği ve beraberinde mitokondriyel işlevi arttırarak daha çok enerji (ATP) üretimini de arttırdığı bildirilmiştir (78).

- Antimikrobiyal etkisi

Nigella sativa tohumu yağının *in vitro* antibakteriyel etkileri *S. mitis*, *S. mutans*, *S. cosntellatus*, *G. haemolysins*'te ve çok seyreltik oranlarda bile *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella niger* ve *Vibrio cholera*'nın dahil olduğu birçok gram pozitif ve gram negatif organizmada gösterilmiştir (79, 80).

Timokinonun antioksidan ve antiinflmatuvar etkileri ile *Pseudomonas aeruginosa* kaynaklı akut bakteriyel prostatitleri düzeltebildiği gösterilmiştir (81).

Timokinonun *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı antitüberküloz aktiviteye sahip olduğu, *Candida krusei*, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* ve patojenik

dermatofit suşlara (*Trichopyton mentagrophytos*, *Microsporum canis* gibi) karşı antifungal aktivite gösterdiği bildirilmektedir (82, 83).

- Antiinflamatuvar etkisi

Timokinonun antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Siklooksijenazı ve lipooksijenazı engellemesi, ROS oluşumunu ve sitokin üretimini azaltması başlıca antiinflamatuvar etkisinden sorumlu mekanizmalardır.

Timokinonun inflamasyona karşı etkisini dozdan bağımsız olarak, inflamasyona aracılık eden COX ve lipooksijenaz (LO) enzimlerinin arakidonat yolaklarını inhibe ederek; proinflamatuvar sitokinlerin serbest bırakılmasına, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretilmesini engelleyerek etki gösterdiği belirtilmiştir (84, 56, 85, 50). Timokinon, deneysel alerjik ensefalomiyelit, kolit ve artriti içeren çeşitli inflamatuvar hastalıklarda antiinflamatuvar etki göstermiştir (86 - 88).

Timokinonun koruyucu etkisinin IL-1 β ve tümör nekroz faktörünü (TNF- α) azaltarak, NF- κ B'yi inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir (86, 89).

Yapılan çalışmalarda timokinonun antiinflamatuvar etkileri alerjik akciğer inflamasyonlu fare modelinde gösterilmiştir. Timokinonun akciğerdeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, Th2 sitokinleri ve akciğer eozinofilisini azaltarak alerjik astımda pulmoner inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir (90, 91).

Timokinonun bazı antiinflamatuvar etkileri histamin üretimi ve/veya salınmasının inhibisyonuna bağlıdır. Timokinon OVA maruziyetli farelerde histamini düşürerek alerjik konjunktivitinin belirtilerini hafifletmiştir (92). Ayrıca, timokinonun sıçanlarda histamin ve platelet aktive edici faktör salınımını inhibe ederek asetik asit ile oluşan koliti engellediği gösterilmiştir (87).

- Antikanser etkisi

İnsan kanser hücrelerinde selektif sitotoksitesini gösterdiği yerlerde timokinonun hücre büyümesini engelleyici ve hücre ölümü ile sonlanan anti kanser etkisini belirlemek üzere çeşitli prelinik çalışmalar yapılmıştır (93). Timokinonun NF- κ B'yi, Akt aktivasyonunu ve hücre dışı kinaz sinyal yollarını baskılayarak tümör hücrelerinde apoptozu sağladığı raporlanmıştır. Timokinonun anjiyogenez, invazyon

ve metastaz dahil diğer tümörojenik proseslerle de ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (94). Tümörögeneze veya ilaç direnci geliştirmeye dahil olan ve karsinojen madde metabolize edici enzimler, transkripsiyon faktörler, hücre döngüsünü düzenleyici proteinler olmak üzere timokinonun çoklu hedefleri tanımlanmıştır. Birçok *in vivo* hayvan modelli çalışma, timokinonun kolonda, ön midede, karaciğerde, deride, ağız boşluğunda indüklenmiş karsinogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Bkz. Tablo 2.3.) (39).

Tablo 2.3. Timokinonun *in vivo* çalışmalardan elde edilen antikanser etkileri.

Deneysel model	Uygulama yolu	Doz	Bulgular
APC ^{min+} farede kolorektal tümör oluşumu	Günlük oral beslenme	12 hafta boyunca 375 mg/kg b.w	İntestinde geniş polip sayısında ↓, aktiflenmiş GSK-3β, β-kateinin membran lokalizasyonu↑, c-myc'nin nükleer ekspresyonu↓
İndüklenmiş DMBA Hamster bukkal kese karsinogenezi	Günaşırı oral uygulama	DMBA'dan 1 hafta önce başlayarak ve 14 hafta devam eden 30 mg/kg b.w	Bukkal skuamöz hücre karsinomları↓, hücre yüzey glikokonjugatlarının indüklenmiş DMBA düzeylerinde ↓
İsviçreli albino farede indüklenmiş B[α]P ön mide bölümü karsinogenezi	İçme suyunda	B[α]P öncesi, sonrası ve sonrası tedavide %0,01	Tümör insidansında %70 ve çeşitliliğinde %60 orandında ↓, indüklenmiş hepatatik antioksidan enzim aktivitesi
İndüklenmiş NDEA sıçan hepatokarsinogenezi	NDEA'dan 2 hafta önce başlamak üzere veya 10 haftalık NDEA maruziyetinden sonra 5 haftalık oral uygulama	Tedavi öncesinde haftada 3 olmak üzere 18 hafta boyunca veya tedavi sonrasında son 5 hafta boyunca 20 mg/kg b.w	Hepatik modül ortalamasında ↓, tümör işaretleyici ekspresyonlarında ↓, p21 ekspresyonunda ↑, majör karaciğer enzimleri aktivitesinde ↓
Wistar sıçanlarında indüklenmiş DMH'li kolon karsinogenezinin	Günlük intraperitoneal enjeksiyon	10 veya 20 hafta boyunca DMH maruziyetinden	TK ile tedavi öncesi ve sonrası, kolon tümörlerinin insidansı

başlaması ve artması		önce veya sonra, 5 mg/kg b.w	ve çeşitliliğinde ↓, indüklenmiş DMH’li oksidatif strese düzelme
Balb/c dişi farelerinde indüklenmiş DMH kolon karsiyogenezisi	İntraperitoneal enjeksiyon	DMH maruziyetine başlamadan 10, 20, 30 hafta veya sonrasında 10 hafta boyunca 5 mg/kg b.w	ACF sayı ve büyüklüğünde ↓, kolon adenomalarının çeşitliliğinde ↓, tümörlerde büyümüş kaspaz-3 ekspresyonunda ↓
NMRI faresinde HCT116 kolon kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	Haftada 3 defa intraperitoneal enjeksiyon	3 hafta boyunca 20 mg/kg b.w	Ksenograft tümör ebatında ↓, indüklenmiş apoptoz ve inhibe olmuş tümör hücre proliferasyonu
PyVT fare memeli tümörünün akciğer metastazından elde edilen ve ortotopikal olarak fareye enjekte edilen L129 hücrenin büyümesi	Günlük intraperitoneal enjeksiyon	10 gün boyunca 40 mg/kg b.w	Ortotopikal olarak enjekte edilen fare memeli tümör hücrelerinin hacim ve ağırlığında ↓
Erkek İsviçreli albino farede indüklenmiş 20-MC fibrosarkoma	Günlük içme suyu	MC tedavisinden 1 hafta önce başlayarak ve tedavi sonrasında devam ederek %0,01	Tümör insidansında %43 inhibisyon ve tümör yükünde %34 inhibisyon
C3HHf/Bu Zgr/Hr faresinde <i>in vivo</i> fibrosarkoma (FsaR) ve skuamöz hücre karsinom büyümesi	İntratümöral enjeksiyon	1.,4.,5. ve 11. günlerde 5 mg/kg b.w	FasR ksenograft tümör hücre büyümesinde %43 ve SSC VII ksenograft tümör hücre büyümesinde %52 azalma
Çıplak farede MDA-MB-231 göğüs kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	2 hafta boyunca haftada 6 gün intraperitoneal enjeksiyon	4 veya 8 mg/kg b.w	Ksenograft tümör hacminde ↓, hepatik CAT ve SOD aktiviteleri ↑, Ki67, XIAP, Bcl-2, Bcl-xl, survivin ekspresyonunda ↓, fosforilasyonda ve p38 MAP kinazda ↑

SCID erkek farede PC3 prostat kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	Subkütan enjeksiyon	15 gün boyunca günlük 6 mg/kg b.w	Tümör ebatında, ağırlığında ve tümör kan damarı sayısında ↓
Çıplak farede C4-2B prostat kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	Subkütan enjeksiyon	31 gün boyunca günlük 20 mg/kg b.w	Tümör ebatında ↓, AR, E2F1 ve siklin A ekspresyonunda ↓
SCID faresinde NCI-460 akciğer kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	Subkütan enjeksiyon	3 hafta boyunca haftada 3 kez boyunca günlük 6 mg/kg b.w	Tümör hacminde ↓, NF-κB aktivitesinde ↓
Çıplak farede SaOS-2 hücrelerinin ksenograft tümör büyümesi	İntragastrik uygulama	15 gün boyunca günlük 6 mg/kg b.w	Tümör hacminde ↓, CD34 ve VEGF, NF-κB, Ki67, XIAP ekspresyonunda ↓, büyümüş kaspaz-3 ve Smac ekspresyonunda ↑
Çıplak farede gastrik kanser hücre ksenograft tümör büyümesi	4 hafta boyunca haftada 3 defa intraperitoneal enjeksiyon	20 mg/kg b.w	Ksenograft tümörlerin hacim ve ağırlığında ↓, TUNNEL pozitifliğinde ↑
Farede kuyruk damarı ile enjekte edilen B16F10 melanoma hücrelerinin akciğer metastazı	Günlük gavaj	3 hafta boyunca 20 mg/kg b.w	Akciğerdeki tümör nodul sayısında ↓

Timokinonun kanser koruyucu mekanizmaları: 1) kanserli dokulardaki apoptotik hücre ölümünü, apoptotik gen ekspresyonunu up-regüle ve anti-apoptotik gen ekspresyonunu down-regüle ederek azaltarak, 2) kanserli hücrenin sağkalımını engellemek için Akt aktivasyonunu baskılayarak, 3) onkogenik ekspresyonu kontrol etmek için NF-kappa B yolağını deaktive ederek, 4) antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak, 5) kanser tedavisinde normal hücreleri koruyarak, 6) CYP450 enzimlerini hasardan koruyarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Şekil 2.4.) (23).

fareye 8 mg/kg/gün timokininonun verildiği çalışmada karaciğerin biyokimyasal ve histolojik hasar parametrelerinde düzelme sağladığı gösterilmiştir (97).

Al-Malki ve ark. (98)'nın yaptığı çalışmada timokininonun sisplatin ile indüklenmiş hepatotoksisitenin başlamasında ve ilerlemesinde koruyucu bir etki sağladığını göstermiştir.

- Antidiyabetik etkisi

Deneyssel ve klinik çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda timokininonun diyabet üzerinde olumlu etkileri gösterilmektedir. Timokininonun tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrol ve diyabet komplikasyonlarında iyileşme sağlayabileceği bildirilmektedir. Timokininonun 100 mg/gün konvansiyonel diyabet tedavisinin üç ay boyunca izlendiği klinik araştırmaya göre, düşük glukoz düzeyleri ve endotel işlevlerinde iyileşme olduğu ve bir aylık timokininon takviyesinin glikozillenmiş hemoglobin düzeylerini belirgin oranda düşürdüğü belirtilmiştir (99).

Çörek otunun hayvanlardaki deneyssel (alloxan ile indüklenmiş) diyabet üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalarda 50 mg/kg *N. sativa* tohumu uçucu yağının intraperitoneal olarak uygulanmasını takiben 4-6 saat içinde açlık kan şekeri düzeyinde önemli bir azalma sağladığı ve insulin konsantrasyonunun etkilenmediği gösterilmiştir (100). 2 ay boyunca *N. sativa* ekstraktının uygulanması sonucunda glukoz ve lipid peroksidaz konsantrasyonlarında azalma, glutatyon ve seruloplazminde artma ve biyokimyasal ve histokimyasal karaciğer hasar göstergelerinde iyileşme sağlandığı belirtilmiştir (101).

Yapılan bir çalışmada günlük oral timokininonun verilmesinde (30 gün 50 mg/kg) streptozosin ile indüklenen diyabetik hamsterlarda hızlı kan glukoz artışını ve glikozlanmış hemoglobin seviyesini önemli derecede azaltmıştır (102).

Timokininonun (80 mg/kg) sıçanlarda oral yolla 6 hafta uygulanmasının plazma glukozunda önemli azalma ve insülin seviyesinde artma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (103). Timokininon ile STZ diyabetik sıçanlarda tedavi COX-2 enzimlerinin ekspresyonu, lipid peroksidasyonu ve MDA seviyelerinin artmasını engellemiştir ve pankreatik dokuda SOD seviyesini arttırmıştır (104).

- Bağışıklık yanıtını düzenleyici etkisi

Al-Sa'aidi ve ark. (105)'nın immunosupresyon oluşturulmuş erkek tavşanlarda yaptığı çalışmada *N. sativa* tohumları alan grupta lenfosit, monosit ve eosinofil yüzdelерinin önemli derecede azaldığı, azalan fagosit aktivitesi ve kemik iliğı mitotik indeksinin normale döndüğü ve immunoglobulin M (IgM) titresinin arttığı gözlenmiştir (105). *N. sativa* tohumlarının interlökin (IL), IL-3 salımı ve artan IL-4 üretimi için T-lenfositleri aktive ettiği bildirilmiştir (106).

Buna göre timokinonun baskılanan bağışıklık yanıtını düzenleyebileceğı düşünülmektedir.

- Antifibrotik etkisi

Timokinon fibroz oluşuma karşı koruyucu etkiye sahiptir. Sıçan karaciğer hücrelerinde yapılan çalışmada tiyoasetamidinin neden olduğı karaciğer fibrozu ve inflamasyonuna karşı timokinonun PI3K'yı engelleyerek ve TLR4 sinyal yolağını düzenleyerek karaciğer fibrozunu azalttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada timokinon tarafından apopitozun indüklendiğı, CD14 ve TLR4 ekspresyonunun ve kollajen-I ve PI3K ekspresyonunun azaldığı, Akt fosforilasyonunun baskılandığı, serum ALT ve AST düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (107).

Timokinonun parasetamol maruziyetine bağı karaciğer sirozu ve fibrozunun oluşumunu engellediğı bildirilmiştir (42).

- Üreme sistemi üzerine etkisi

Kadmiyumun fare ve sıçan testislerinde büyük ölçüde toksik etki yarattığı ve memeli testislerinde de bazı morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (108). Sayed ve ark. (109)'nın yaptığı çalışmada sadece kadmiyuma maruz bırakılanlar ile kadmiyum ve timokinonun birlikte uygulandığı sıçanlardaki sperm sayısında ciddi bir azalma görülmüştür. Sadece kadmiyum alan sıçanların sperm mortalitesi ve anormallikleri de önemli bir derecede artış, epididimisinde histopatolojik değişiklikler, prostat, intestinal ödem, lenfomatik infiltrasyon gelişirken; kadmiyumla beraber timokinonun uygulandığı sıçanlarda sperm mortalitesi ve anormalliklerinde iyileşme, normal bir epididimis ve normale yakın ödem gözlenmiştir (109).

- Renal koruyucu etkisi

Nefrotoksik ilaç olan sisplatinin uygulanmasından 30 dakika önce 50 mg/kg çörek otu tohum ekstresinin uygulandığı çalışmada, timokinon uygulamasının biyokimyasal ve fizyolojik nefrotoksisite indislerinin iyileştirilmesinde etkili olduğu görülmüştür (110). Koruyucu etkinin nedeni kesin olarak açıklanamasa da ekstrenin antioksidan etkisi ile nefrotoksik ilacın serbest radikal oluşturma etkisini azalttığı şeklinde olabileceği ileri sürülmüştür (34).

Böbrek ve renal alogreftlerin kompleks bir fizyolojisi olarak tanımlanan renal iskemi üzerine timokinonun etkinliğine ilişkin yapılan çalışmada, *N. sativa* yağının uygulanması ile serum kan üre nitrojeni, MDA, NO, protein karbonil içeriği ve kreatinde azalma görülürken; SOD, CAT, GSH-Px ve total antioksidan kapasitesinde artış gözlenmiştir (111).

- Gastrointestinal sistem üzerindeki etkisi

Batı toplumlarında %10-20 oranında görülen ve yaşam kalitesinde düşüğe neden olan ve kronik tedavi gerektiren gastrik lezyon, gastrik mukozal hasar, kolit, ülser, kronik pankreatit gibi gastrointestinal hastalıkların tedavisinde genel olarak kullanılan ilaçların yan etkilerinden dolayı bu hastalıklarda doğal ürünlerin kullanılması üzerine ilgi artmıştır. *N. sativa* yağının ve aktif bileşeni timokinonun bu hastalıkların belirtilerini azalttığı gösterilmiştir (112).

Çörek otu yağının *Schistosoma mansoni* ile enfekte edilmiş farelerde antioksidan etkisi ve konakçı immunolojik sistemi etkileyerek, ALT, gamma-glutamil-transferaz (GGT) ve alkalik fosfataz (ATP) aktivitelerindeki önceden meydana gelen değişiklikleri, ayrıca serum albumin içeriğini de kısmen düzelttiği gösterilmiştir (113).

- Antinosiseptif etkisi

N. sativa'nın antinosiseptif etkisi hayvan modellerinde geniş bir şekilde araştırılmıştır ve birkaç çalışmada da insanlar üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (114).

Hot-plate (kızgın levha) testi, kıvrınma testi, kuyruk kıştırma testi ve formalin testine tabi tutulan, 50-400 mg/kg oranında oral verilen *N. sativa* yağının;

kızgın levha ve kuyruk kısırtma testlerinde nosiseptif cevap latensini önemli derecede arttırdığı, kıvranma testinde de kıvranma hareketlerini azalttığı görülmüştür. Formalin testinin erken dönemlerinde *N. sativa* yağı, nosiseptif cevabı önemli derecede baskılarken, geç dönemlerinde cevabı azaltmamıştır (36).

- Kalp üzerindeki koruyucu etkisi

Kardiyovasküler hastalıklar ölüm nedenleri arasında ilk sıralardadır. Lipid profillerindeki değişiklikler, diyabet ve hipertansiyon en sık görülen kardiyovasküler hastalıklar olarak belirtilmektedir (115, 116). Oksidatif stresle ilişkilendirilen hipertansiyonun, antioksidan koruma mekanizma ile serbest radikal oluşum arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklandığı bilinmektedir (117). Epidemiyolojik çalışmalarda önemli bir kardiyovasküler hastalık olan hipertansiyonun geleneksel tedavisinde çörek otu tohumu kullanımı kan basıncını düzenleyebildiği bildirilmektedir. Diüretik etkilerinden olduğu tahmin edilen ekstrenin köpeklerde kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (118).

Ragheb ve ark. (119)'nın yaptıkları bir çalışmada nazogastrik tüp ile uygulanan 20 mg/kg/gün dozundaki timokinonun oksidatif stresi azalttığı ve lipid profilini düzelttiği ve hiperkolesterolemik hayvanlarda koroner arter hastalıklarının ana nedeni olarak gösterilen aterosklerozisinin gelişmesini engellediği gösterilmiştir.

Timokinonun i.v. olarak uygulanmasını takiben doza bağlı olarak arteriyel kan basıncında ve kalp atış hızında azalma gözlenmiştir (120).

Siklosporin A ile maruz bırakılan farelerde çörek otu yağının etkisi kalp ve böbrek üzerinde değerlendirilmiştir. Kalp ve böbrek dokusunda SOD, CAT ve GSH-Px'in aktivitelerini arttırarak ve MDA, nitrik oksit ve protein karbonil seviyelerini azaltarak çörek otu yapının siklosporin A'nın neden olduğu doku hasarını azaltabildiği gösterilmiştir (121).

- Antihistaminik etkisi

Etanol ile indüklenmiş mide mukozasında, miyeloperoksidaz aktivitesi ve karın dokularında gastrik histamin içeriği arttırılmış olan farelerde etanol uygulama öncesinde 10 ml/kg çörek otu yağı ve 10 mg/kg timokinon uygulandığında, her iki durumda da miyelopreksidaz aktivitesi ve gastrik histamin içeriği önemli derecede

azalmıştır; ancak timokinon çörek otu yağı ile karşılaştırıldığında daha az bir düşüş sağladığı belirlenmiştir (122).

- **Antihelmintik etkisi**

İki hafta boyunca 2,5 ve 5,0 ml/kg oral çörek otu yağının uygulanmasını takiben karaciğerdeki *Schistosoma mansoni* kurtçuklarının sayısında, karaciğer ve barsakta biriken yumurtaların sayısında azalma olduğu gösterilmiştir (113).

- **Sinir sistemi üzerindeki etkisi**

Timokinonun, parkinsonlu hastalardan elde edilen hücre kültürlerinde birincil dopaminerjik nöronlarda koruyucu olduğu bildirilmiştir.

Timokinonun sıçan birincil hipokampal ve insan indüklenmiş pluripotent kök hücreden kaynak alan nöron hücrelerinde koruyucu etkileri gösterilmiştir (123).

Timokinonun 40 ve 80 mg/kg peritoneal uygulanması sonucunda miyelitik nöbet süresinde azalma ve başlangıcında gecikme olduğu bildirilmiştir. Timokinonun yapılan çalışmalar ile antikonvülsan etkileri gösterilmiştir (124).

Timokinon, GABAerjik ve nitrierjik modülasyon aracılığıyla anksiyolitik aktivite göstermiştir. Timokinon (20 mg/kg), stresli farelerde plazma nitritte azalma ve beyin GABA içeriğinin azalmasının tersine çevrilmesiyle anksiyolitik etkiler göstermiştir. Ayrıca, timokinon antidepresan etkiler göstermiştir (125).

- **Solunum sistemi üzerindeki etkisi**

Çörek otu tohumları solunum yolu problemlerine karşı iyi edici etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Timokinonun sıçanlarda akut respiratuvar sendromu tedavisinde faydalı olabileceği gösterilmiştir (126).

Üretan ile anestezi yapılan kobaya 4-32 ml/kg intravenöz çörek otu uçucu yağının uygulanması sonucu doz bağımlı olarak solunum ve intratekal basınçta artış gözlenmiştir. 1.6-6.4 mg/kg intravenöz timokinon uygulanması takiben solunum oranında hiçbir etki oluşmadan intratekal basınçta önemli bir artışa yol açmıştır. Uçucu yağ ile indüklenen solunum etkilerine histaminerjik mekanizmalarının doğrudan dahil olması ve muskarinik kolinerjik mekanizmaların dolaylı aktivasyonu ile histamin salınmasının aracılık ettiği öne sürülmüştür (120).

- Antiviral etkisi

Konakçı hücrelerde lenfosit deplesyonuna yol açarak viral enfeksiyonlar apoptoza neden olur; antioksidanların hedef hücrelerde viral replikasyonu ve virusler tarafından indüklenen apoptozu inhibe edebildiği bildirilmiştir (127). Çörek otu yağının intraperitoneal olarak uygulandığı farelerde enfeksiyonun 3. gününde dalak ve karaciğerdeki virus titresinin tamamen inhibe olduğu gösterilmiştir (128).

Hepatit C olan ancak IFN- α kullanmaya uygun olmayan bir hasta üzerinde yapılan bir araştırmada 3 ay boyunca günde 3 defa 450 mg çörek otu yağı kapsülü kullanıldığında, viral yükünde önemli derecede azalma ve antioksidan aktivitesinde artma sonucu oksidatif strese azalma görülmüştür (129).

2.1.6. Timokinonun Toksisitesi ve Güvenliliğinin Değerlendirilmesi

N. sativa tohum ekstreleri ve bileşenleri düşük toksisiteye sahiptir. Timokinon toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda, toksik etkileri ancak çok yüksek dozlarında gösterilebilmiştir.

5 gün boyunca 50 mg/kg intraperitoneal *N. sativa* tohum ekstresi uygulaması sonrasında; karaciğer ve renal işlevlerden sorumlu enzim ve metabolit aktivitesi üzerinde önemli hiçbir etki göstermediği belirtilmiştir (110). Tohum yağının 10 ml/kg oral dozunun uygulanması sonrasında bir mortalite ve hedef hepatik enzimler dahil olmak üzere belirgin bir toksiste gözlenmemiştir (58, 130).

Timokinonun farede akut oral uygulamasını takiben gözlenen LD₅₀ değeri 2.4 g/kg'dır. Subkronik deneyde, içme suyu ile %0.01, %0.02, %0.03 konsantrasyonlarında ve günlük alım dozlarına eşdeğer 30, 60, 90 mg/kg miktarlarda 90 günlük timokinon takviyesinin mortaliteye veya önemli toksikolojik değişikliklere neden olmadığı; dokudaki GSH içeriği, toplam protein, üre, kreatin, trigliserid plazma düzeyleri, ALT, LDH, kreatin fosfokinaz enzim aktivitesi üzerinde önemli etki göstermemiş; ne bütünsel ne de mikroskobik doku hasarı gözlemlenmemiştir.

Bir diğer çalışmada timokinonun sıçanlarda 2-3 g/kg (yüksek doz) uygulanmasını takiben 24 saatte karaciğer, böbrek ve kalp dokularındaki indirgenmiş GSH düzeylerinde önemli bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Timokinon uygulaması ayrıca kreatin fosfokinaz, laktat dehidrogenaz (LDH), alanin amino

transferaz (ALT) gibi çeşitli enzimlerin katalitik aktivitesinde ve plazma üre ve kreatin düzeylerinin önemli derecede yükselmesine neden olmuştur. (131).

Timokinonun 4, 8, 12,5, 25 ve 50 mg/kg dozlarında i.p. olarak uygulanması sonucu serum ALT, aspartat transaminaz (AST) ve LDH enzim aktiviteleri gibi biyokimyasal değişiklikler üzerine önemli etki oluşturmamış; ancak 50 mg/kg üzerinde uygulanan dozlarda 90,3 mg/kg LD₅₀ değeri ile letal etki oluşturduğu belirtilmiştir (132).

Timokinonun dişi ve erkek fare ve sıçandaki LD₅₀ değerinin tespit edilmesi için yapılan çalışmada, farede intraperitoneal uygulama sonrasında LD₅₀ değeri 104,7 mg/kg, oral uygulama sonrasında ise LD₅₀ değeri 870,9 mg/kg; sıçanda intraperitoneal uygulama sonrasında LD₅₀ değeri 57,5 mg/kg, oral uygulama sonrasında ise LD₅₀ değeri 794,3 mg/kg bulunmuştur. Timokinonun oral olarak uygulandığında daha güvenli olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada timokinonu i.p. enjeksiyon yoluyla uygulanan hayvanlarda abdominal kas kasılması ve ataksi birkaç saat sürmüştür, 6.saatte yanıtlar azalmıştır ve uyuşukluk gözlenmiştir ve 24. saatte bu belirtiler düzelmiştir (133).

Akut toksisite çalışmalarında (Tablo 2.4.), timokinonun farelerde oral LD₅₀ 2,4 g/kg olarak ve sıçanlarda i.p. LD₅₀ değeri 10 mg/kg olarak bildirilmiştir (4,96). Al-Ali ve ark. (133) tarafından, farelerdeki i.p. LD₅₀ değeri 104,7 mg/kg ve oral LD₅₀ değeri 870,9 mg/kg; sıçanlarda ise i.p. LD₅₀ değeri 57,5 mg/kg ve oral LD₅₀ değeri 794.3 mg/kg olarak bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, 14 hafta boyunca 200 mg/kg/gün verilen çörek otu yağının, erkek sıçanların karaciğer, böbrek, dalak ve diğer organlarda patolojik değişikliklere neden olmadığı ve kan biyokimyasını etkilemediği bildirilmektedir (134). Sıçanlara 12 hafta boyunca 2 ml/kg/gün çörek otu yağının oral dozu verilerek yapılan bir kronik toksisite çalışmasında histopatolojik modifikasyonlar, ALT, AST ve GSH dahil karaciğer enzim düzeylerinde değişiklikler gözlenmemiştir.

Tablo 2.4. Timokinon ve çörek otu yağının LD₅₀ değerleri.

	Deney hayvanı	Uygulama yolu	LD ₅₀
Timokinon	Sıçan	i.p.	57,5 mg/kg (133)
Timokinon	Sıçan	i.p.	10 mg/kg (27)
Timokinon	Fare	i.p.	104,7 mg/kg (133)
Timokinon	Fare	i.p.	90,3 mg/kg (132)
Timokinon	Sıçan	oral	794,3 mg/kg (133)
Timokinon	Fare	oral	794,3 mg/kg (133)
Timokinon	Fare	oral	2,4 g/kg (70)
Çörek otu yağı	Fare	i.p.	2,06 ml/kg (134)
Çörek otu yağı	Fare	oral	28,8 ml/kg (134)

Sıçanlarda intraperitoneal uygulama sonrasında üreme toksisitesi açısından NOAEL 15 mg/kg olarak bildirilmiştir (135). İntraperitoneal uygulama ile erkek ve dişi sıçanlardaki maksimum tolere edilen doz (MTD) sırasıyla 22,5 mg/kg ve 15 mg/kg; oral uygulamada ise her iksinde 250 mg/kg olarak bildirilmiştir (27). Akut 2 g/kg ve daha yüksek doz uygulaması sonucu hipoaktivite ve solunum güçlüğü ortaya çıkmıştır (34, 131).

Oral ve dermal maruziyetinde güvenliliğine dair bilgi olmadığından hamilelikte ve emzirme döneminde kullanımı güvenli değildir. Uterus düz kas kasılmasını sıçan ve kobaylarda konsantrasyona bağımlı inhibe ettiği gösterilmiştir (136). Timokinonun anti-anjiojenik etkisi nedeniyle hamilelikte kullanımının sakıncalı olduğu ileri sürülmüştür (53).

2.2. Sisplatin

2.2.1. Sisplatinin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı

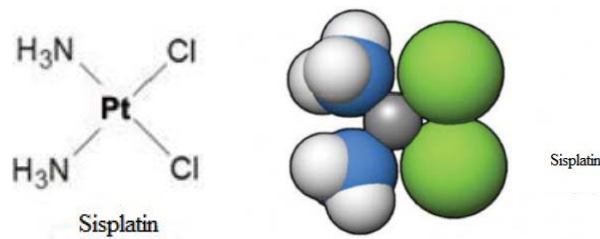
Sisplatin, *cis*-[Pt(II)(NJ3))(2)Cl(2)], [PtCl₂(NH₃)₂, CDDP], 1845 yılında ilk kez sentezlenmiş ve 1893 yılında Alfred Werner tarafından ilk olarak CDDP yapısına indirgenmiştir. 1965 yılında Rosenberg ve ark. (137), platin elektrodunun elektrolizinin, sisplatin oluşumu ile sonuçlandığını keşfetmişlerdir (137, 138). 1971 yılında ilk defa kanser hastalarına uygunlanmış ve 1978’de ise önce Kanada, kısa bir

süre sonra Birleşik Devletler ve sonrasında tüm dünyada klinik kullanıma hazır hale gelmiştir (139). Sisplatin ile tedavi 1971 yılında başlamış, 1978 yılında FDA tarafından platin grubu taşıyan kemoterapötiklerin kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (140, 141). Kanser tedavisinde geniş bir kullanım alanı olan en güçlü kemoterapi ilaçlarından biri olarak sisplatinin keşfedilmesi, platin (II) ve diğer metal içerikli bileşiklerin potansiyel antikanser ilaç olarak kullanılmalarına olan ilginin artmasını sağlayan bir köşe taşı olmuştur. Sisplatinin klinik kullanımının sarkoma kanserleri, yumuşak doku, kemik, kas ve damar kanserleri dahil olmak üzere farklı birçok kanseri başarılı bir şekilde tedavi ettiği belirtilmiştir. (137, 138).

Sisplatinin antitümör etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ancak, genel olarak sisplatinin hidrolize olduğu ve monoakua kompleksin, hedeflenmiş DNA ile reaksiyona giren nihai sitotoksik ajanı olduğu belirtilmektedir (142, 143).

Sisplatin beyaz veya sarı kristal bir toz olup suda az, dimetilpirimidin ve N, N-dimetilformidte tam olarak çözünür. Molekül ağırlığı 301,1 g/mol, yoğunluğu 3,74 g/cm³ ve kaynama noktası 270°C olan, kare oluşturacak şekilde platin iyonuna bağlı iki amin grubu ve iki klor grubundan oluşan nötr bir organik moleküldür (Şekil 2.5.). Amin grupları taşıyıcı ligandları, klor iyonları ise ayrılan grupları gösterir. Ayrılan grupların varlığı, sisplatinin biyolojik aktivitesi açısından esansiyeldir (144).

Sisplatin hem genotoksik hem de mutajeniktir. Ayrıca hayvanlarda karsinojenik olduğuna dair bilgiler yer alsa da insanlar için tek ajan olarak kullanıldığında karsinojenik olduğuna dair yeterli veri bulunmamaktadır (145, 146). IARC tarafından sınıf IIA olarak sınıflandırılmıştır (146).



Şekil 2.5. Sisplatinin moleküler yapısı (147, 21).

2.2.2. Sisplatinin Farmakokinetik Özellikleri

Sisplatinin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu çok zayıftır ve bu nedenle

sadece paranteral olarak (i.v. veya i.p.) uygulanmaktadır (148).

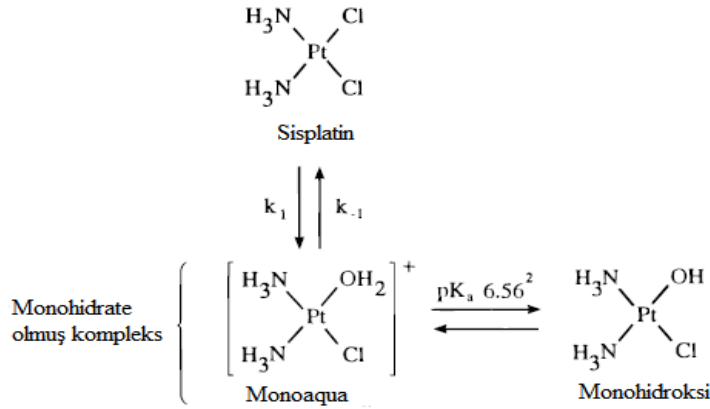
Sisplatin, plazma proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir ve intravenöz infüzyon sonrasında yaklaşık %90 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. İlacın toksisitesinden serbest platin bileşikleri sorumlu tutulmaktadır (149-151).

Sisplatinin intraselüler transportu açık olmamakla beraber hücreden hücreye değişiklik gösterebilir. Yakın zamanlı, kanserli hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda sisplatinin yarısının plazma membranları aracılığı ile pasif difüzyon ile diğer yarısının bilinmeyen taşıyıcılarla alındığı bildirilmiştir (152).

Sisplatin, vücut sıvılarına ve tüm dokulara hızlı dağılım göstermektedir (151). Özellikle böbrek, karaciğer ve prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunmakla beraber karaciğer, böbrek, mesane, böbrek üstü bezi, over, femur ve ince barsaklarda plazmadan daha yüksek oranda sisplatin belirlenmiştir (149). Kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçemez ve beyin omurilik sıvısında çok düşük konsantrasyonlarda bulunur (151).

Sisplatinin metabolizasyonu tam olarak anlaşılamamakla beraber enzimatik olmayan yollarla plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanan inaktif metabolitlerine dönüştürüldüğü bildirilmiştir (148). Siplatin glutatayon, metiyonin, sistein gibi düşük moleküler ağırlıklı; albumin ve nükleik asit gibi yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerle etkileşime girerek böbreklerde biyotransformasyona uğradığı belirtilmektedir (153).

Sisplatinin ana eliminasyon organı böbreklerdir. Sisplatin böbreklerde, glomerular filtrasyon ve tübüler sekresyon ile temizlenir. Böbreklerdeki sisplatin konsantrasyonu, kandakinden fazladır, bu da renal parankimal hücrelerce ilacın aktif birikimini göstermektedir (154).



Şekil 2.6. Sisplatin ve sulu solüsyonda monohidrate kompleks ilişkisi.

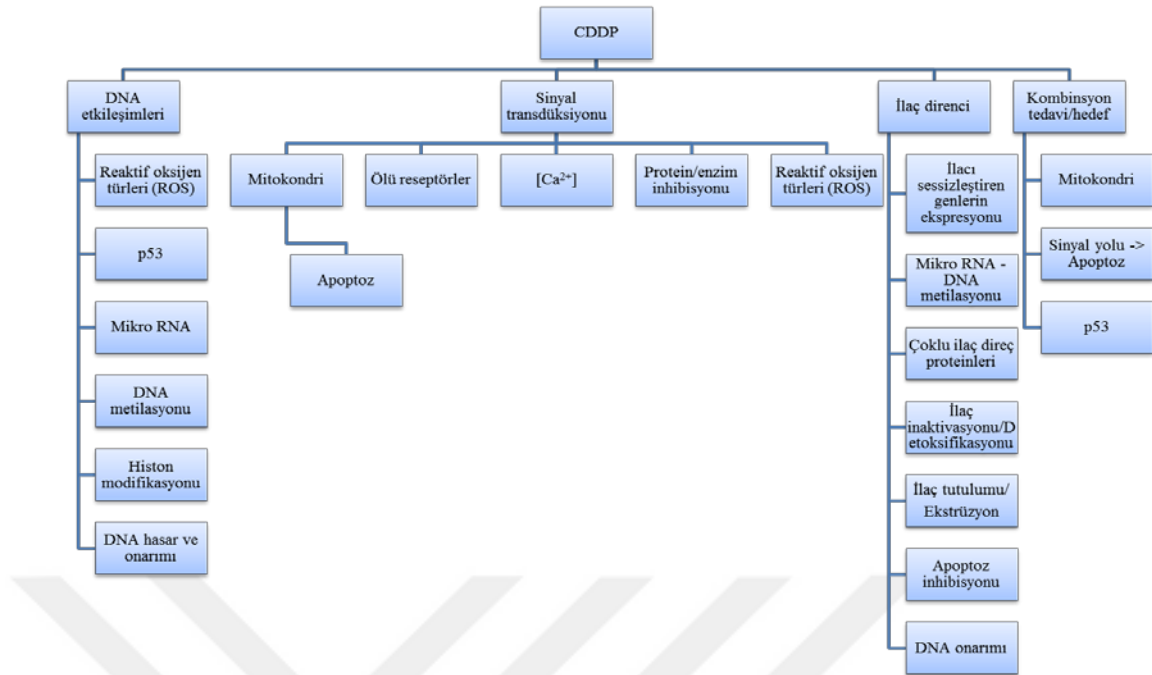
Anderson ve ark. (155)'nin yaptığı çalışmada 100 mg/m^2 salin çözeltisinde 1 saatlik intravenöz sisplatin uygulamasında sisplatin ve monohidrate olmuş bileşik bileşiğinin klerensi sırasıyla $0,32 \pm 0,05$ ve $0,27 \pm 0,11 \text{ l/dk/m}^2$ olarak bulunmuştur. Monohidrate olmuş bileşiğin görünür dağılım hacmi ($4 \pm 2 \text{ l/m}^2$) sisplatininkinden daha düşüktür ($11 \pm 2 \text{ l/m}^2$). Sisplatin ve monohidrate olmuş bileşiğin eliminasyon oranları sırasıyla $0.030 \pm 0.002 \text{ l/dk}$ ve $0.07 \pm 0.02 \text{ l/dk}$; yarılanma ömürleri 23 dk ve 10 dk; AUC ve $C_{\max}$ değerleri 15 ve %12 olarak bulunmuştur (Şekil 2.6.) (155).

İlacın yaklaşık %90'ından fazlasının (ilk 24 saatte yaklaşık %25'inin) idrarla ve yaklaşık %10'u ise safra yolu ile elimine edildiği tespit edilmiştir (151, 156).

Serbest platinlerin ortalama yarılanma ömrünün 20-45 dakika, toplam platinin ortalama yarılanma ömrünün 5 günden daha fazla olduğu belirtilmektedir (156).

2.2.3. Sisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları

Sisplatin, iplikler arası çapraz bağlar ve eklentiler oluşturmak üzere DNA'ya bağlanır. Sisplatin tarafından oluşturulan DNA eklentileri, apoptoz ile sonuçlanacak olan DNA replikasyon ve/veya transkripsiyonunu inhibe eder ve bazı sinyal transdüksiyon yollarını aktive eder (157). Sisplatinin (CDDP) hedef etkileri, bütünsel olarak Şekil 2.7.'de görülmektedir.



Şekil 2.7. Sisplatin hedefleri (158).

Sisplatinin neden olduğu toksik etkilerin altında yatan birçok mekanizma ileri sürülmektedir. Bu mekanizmalar aşağıdaki şekilde verilebilir;

- Oksidatif stres

Normal fizyolojik şartlar altında hücreler ROS düzeyini, ROS oluşum ve onları elimine eden süpürücü sistem arasındaki dengeyle kontrol etmektedir. Ancak kanserli hücreler, onkojenik stimülasyon, artan metabolik aktivite ve mitokondriyel malformasyondan dolayı normalden daha çok ROS üretir.

Oksidatif stres, en önemli sisplatin sitotoksik mekanizmalardan biridir. Sisplatin ile indüklenmiş oksidatif streste primer hedef mitokondridir; mitokondriyel protein sülfür grubu kaybı, kalsiyum alım inhibisyonu ve mitokondriyel membran potansiyelinde azalma ile sonuçlanır (159). ROS oluşumu sisplatin konsantrasyonuna ve maruziyet süresine bağlıdır (160). Hücreler arası redoks dengesi tiyol grubu (-SH) içeren moleküllerle sağlanmaktadır. Aşırı miktardaki ROS, hem ekstrinsik hem de intrinsik yolak aracılı apoptozu indükleyebilir (161). Daha da yüksek ROS, kanserli hücrede hem apoptoz hem de nekrozun oluşmasına neden olabilir (162). Ayrıca ROS, sitoplazmik bileşenlerin sekester oluşumunu içeren hücrenin kendi katabolik prosesi olan otofaji aracılı hücre ölümlerini de indükleyebilir (163).

- **Kalsiyum sinyal yollarının değiştirilmesi**

Sisplatinin düşük hücreler arası klor iyon konstrasyonlarında oluşturduğu hidrolize olmuş formlarının, sisplatinden bin kat daha reaktif olduğu ve oksidatif fosforilasyonu ayırarak mitokondriyel solunumu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum da kalsiyumun mitokondriden sızmasına ve hücrel kalsiyum düzeylerinin geçici süreli atışına neden olmaktadır. Sisplatinin kalsiyum dengesini bozmasıyla öncelikli olarak lipid peroksidasyon ve enzim inhibisyonu gibi olaylar gerçekleşir. Bu olaylar mitokondriyel hasar, mitokondriyel fonksiyon inhibisyonu, ATP ve diğer ko-faktörlerin tükenmesi aracılığıyla hücrelere zarar vermektedir (164, 21).

- **Apoptoz**

Apoptoz, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu, membran tomurcuklanması, fosfatidilserinin dışarı verilmesi ve kaspaz (sistein proteaz ailesinden enzim) aktivasyonuna neden olan enerji bağımlı kontrollü hücre ölümüdür (165).

Sisplatin öncelikli olarak apoptoz ile hücre ölümünü indükler ve apoptoz sinyalindeki bir hasar sisplatin direncinin oluşmasına neden olur. Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki büyük apoptotik hücre ölüm yolağı bulunmaktadır. Ekstrinsik yolak, ölüm ile indüklemiş sinyal kompleksi oluşturmak üzere ligandların TNF- α reseptörüne bağlanması, bunu takiben adaptör molekül aracılığı ile prokaspaz-8'in oligomerizasyon ile başlar. İntrinsik yolak ise, DNA hasarı gibi hücrel stres ile başlar ve prokaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanan mitokondriden sitokrom-c salınması ile sonuçlanır.

Sisplatinin klinik başarısının öncelikli olarak apoptozu tetiklemesinden mi geldiği sorusu halen tartışmaya açık olmakla beraber sisplatin ile indüklenmiş apoptoz için iki yolak önerilmiştir. Bunlardan birincisi tümör baskılayıcı protein 53'ü içerir; ikincisi ise P53-ilişkili p73 proteindir (166). p53, sisplatin ile indüklenmiş hücre ölümündeki en büyük aracı olarak belirtilmiştir. p53 tümör baskılayıcısı, hücre döngüsünü durdurma veya DNA hasarı, onkogen aktivasyonu ve hipoksiye cevaben apoptozu indükler (167).

İn vitro, düşük konsantrasyonlardaki sisplatin apoptotik hücre ölümüne neden

olurken, daha yüksek konsantrasyonlarda nekroza neden olmaktadır (168, 169). Sisplatin ile indüklenmiş renal epitelyal hücre ölümü nedenleri arasında; TNF gibi ölüm reseptörleri ile aktive olan ekstrinsik yolak, intrinsik mitokondriyal yolak ve endoplazmik retikulum stres yolağı da dahil olmak üzere birkaç apoptotik yolak tanımlanmıştır (170, 171).

- **Protein kinaz C aktivasyonu**

Hücrenin sisplatin hassasiyeti/direnci üzerindeki etkisi, protein kinaz izoenzimlerin şekline ve hücresel içeriğine bağlıdır. Sisplatinin protein kinaz c aktivasyonu ile apoptoza neden olabileceği bildirilmiştir (172).

- **Mitojen ile Aktiflenmiş Protein Kinaz (MAPK) aktivasyonu**

Sisplatinin bazı hücre tiplerinde ekstraselüler sinyal ile regüle olmuş kinazın (ERK) aktivasyonuna neden olduğu ve sisplatin ile indüklenmiş ERK aktivasyonu, sisplatin ile indüklenen DNA hasarının p53 aracılı onarımına bir zaman verdikten sonra, hücre döngüsünün durmasına yol açabileceği bildirilmiştir (173).

Çevresel stres, p38 MAPK gen ailesini aktive eder ve p38 MAPK, p53 ile etkileşerek apoptozu başlatmak için proapoptotik PUMA ve NOXA genlerinin transkripsiyonunu stimule ettiği gösterilmiştir (174).

- **Jun Amino-Terminal Kinaz (JNK) aktivasyonu**

c-Jun N-terminal kinaz veya stres ile aktiflenmiş kinaz, DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli stres uyarıcıları tarafından aktive edilir. Sisplatinin hem cis hem de trans formları JNK yolağını aktif hale getirir. P53'ün proapoptotik formu olan p73, sisplatin ile indüklenmiş apoptoza yol açmak üzere JNK ile bir kompleks oluşturur (175).

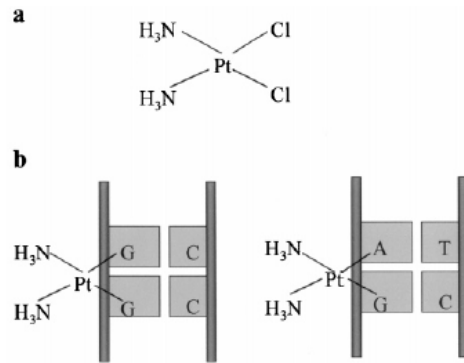
- **Akt aktivasyonu**

Akt, fosfotenisid 3-kinaz yönünde hareket eden serin/treonin kinaz ailesindendir ve hücre canlılığında önemli bir rol oynamaktadır (176). Sisplatin ile indüklenmiş DNA hasarının, ser136'da Akt aracılı BAD fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Temel olarak BAD, sisplatin ile indüklenmiş DNA hasarı olan

hücrelerde fosforile olur ve BAD'ın bu fosforilasyonu hem sisplatine duyarlı hem de dirençli olan hücrelerin sislatin ile tedavisi sonrasında hücre canlılığı için gereklidir (177).

- DNA katım ürünü oluşturma

CDDP öncelikli olarak hücresel DNA ile çeşitli bifonksiyonel eklentiler oluşturarak DNA hasarı oluşturan bir antikanser ilaç olarak düşünülmüştür (178). Sisplatin reaktivitesi etrafındaki klor konsantrasyonlarından etkilenmektedir. Kanda ve hücreler arası sıvılardaki fizyolojik klor konsantrasyonu yaklaşık 100 mM ve dolayısı ile sisplatin nispeten daha az aktiftir. Hücre içinde klor miktarı birkaç milimolara düşer ve sisplatinin aktivitesi artar. Sulu solüsyonlarda sisplatin içindeki klor iyonları, bileşiğin aktif formlarını gösteren sulu türlerin oluşumuna izin vermek için ayrılır. Çiftleşmemiş elektronlu oksijen, nitrojen ve sülfür içeren nükleofilik gruplar, klor iyonları yerine platine bağlanır. Bu gruplar birçok amino asit zincirinde ve DNA veya RNA'nın purin bazlarında bulunur (Şekil 2.8.) (179).



Şekil 2.8. Sisplatinin DNA eklentisi oluşturma (179).

Sisplatin ile reaksiyona giren diğer bir güçlü nükleofil, glutatyondur. Glutatyondun sisplatin ile etkileşimi sonucu adenozin trifosfat (ATP) bağımlı dışa atım pompası ile hücreden atılması kolaylaşan bir bileşik oluşur. Böylece glutatyon, sisplatinin DNA'ya ulaşmadan önce reaktif platin içeriklerini engelleyerek sisplatin direncine neden olabilir (179).

Sisplatinle modifiye edilmiş β -galaktosidaz enzim habercisi genin insan veya hamster hücrelerine eklenmesiyle transkripsiyonda üç kat azalma görüldüğü

bildirilmiştir (180).

- İnflamatuvar yanıt

İnflamatuvar yanıtın sisplatin sitotoksitesinde önemli bir role sahip olduğu son yıllardaki çalışmalarda gösterilmiştir. Bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α üretiminden sorumlu NF- κ B de olmak üzere, birçok çalışmada sisplatinin bazı inflamatuvar sitokin ve kemokini arttırdığı da bildirilmektedir. Sisplatinin sitotoksitesi, ROS dışında sitokin ve kemokinler tarafından da arttırılmaktadır (181, 182).

Sisplatinin uzun ve kısa dönemli etkileri çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir (Tablo 2.5.) (183).

Tablo 2.5. Sisplatin metabolizması ve toksisitesini etkileyen faktörler.

Toksik durum	Faktörler
Hücrel faktörler/DNA hasar cevabı	-Hücrel senesans - Hücrel ölüm (apoptoz, nekroz) - Hücre disfonksiyonu Genom instabilitesi
Doku farklılıkları	-Metabolizma - Farmakokinetik - Proliferatif durum - DNA hasar cevabı
Sistemik farklılıklar	-Beslenme durumu - Hormonal (cinsiyet) - İmmunolojik etkiler - Yaş - Etnisite
İleri yaş	- Ototoksiste - Nörotoksiste - Nefrotoksiste
Kanser	-Sekonder malignansi (akut lösemi gibi)

2.2.4. Sisplatin Toksisitesi

- İşitme sistemi üzerine toksisitesi

Sisplatin, bilinen en ototoksik ilaçtır. Sisplatin pediyatrik solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır ve çocuklarda doz sınırlandırıcı en büyük toksisite duyma kaybıdır. Tedavi olan hastaların %10 – 90’ında değişen düzeylerde duyma kaybı gelişir. Bu değişiklikler geri dönüşümsüzdür ve pediyatrik hastalar bu duruma çok yatkındır (184, 185). Bu bozulma, Corti organındaki işitme sensör hücrelerini etkiler ve hem duyma hem de vestibüler fonksiyonlar etkilenebilmektedir (186). Ototoksisite geri dönüşümsüzdür ve bu etki hipoalbumemi, uygulanan diğer tedaviler, genetik faktörler, renal yetmezlik ve hastanın yaşı ile ilişkilidir (187).

Rademarker-Lakhai ve ark. (188), işitsel toksistenin NSCL karsinomu olan hastalarda sisplatin/gemcitabinin doz ve program yoğunluğu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. İşitme kaybı temel olarak yüksek sıklıklarda ve daha çok her iki haftada bir uygulandığında görülmüştür (188).

- Böbrek üzerine toksisitesi

Nefrotoksisite, sisplatinin dozunu sınırlayan önemli bir diğer toksisitedir. Sisplatin nefrotoksisitesi sisplatinin renal epitelyal hücrelere girişi, nükleer ve mitokondriyel DNA’yı hasara uğratması, çoklu hücre ölümü, yaşam yollarını aktive etmesi, güçlü bir inflamatuvar cevap oluşturması dahil bu etkilerin bütünsel bir sonucu olarak ortaya çıkar (189).

Sisplatin uygulanmasından birkaç gün sonra başlangıçta kendini serum kreatinin ve kan üre nitrojenin konstrasyonundaki artış ile renal yetmezlik kendini gösterir. İdrar çıkış sıklığı azalır (oligurik olmayan), idrarda glukoz ve proksimal tübüler yetersizliğinin belirtici olarak da az miktarda protein içerebilir. Hipomagnesemia da yaygındır ve genellikle glomerular filtrasyon hızında düşüş olmasa bile tekrarlayan sisplatin dozlarından sonra görülür. Genellikle 2-4 haftalık bir periyot sonrasında renal fonksiyonların iyileştiği bildirilse de iyileşmenin olmadığı durumlar da raporlanmıştır. Progresif ve kalıcı nefrotoksisite, koruyucu önlemlere rağmen sisplatin tedavi kürlerinin sonucunda görülebilmektedir (190, 191).

Doz, sıklık, kümülatif doz, ileri yaş, kadın olmak, sigara, hipoalbuminemi varolan renal yetersizlik (insanlarda sınırlı veri bulunmaktadır) durumları nefrotoksisiteyi arttıran faktörler arasında yer alır. Ayrıca diyabetin (insanlarda kesin değildir) ve organik katyon taşıyıcısı (OCT2) polimorfizm varlığının da nefrotoksisiteyi arttırabileceği ileri sürülmüştür (192). Yapılan bir çalışmada 50 mg/m² vücut yüzey alanından yüksek sisplatin dozu uygulandığında, glomerular filtrasyon hızı ile plazma magnezyum konsantrasyonunun düştüğü gösterilmiştir (193).

Son zamanlardaki raporlar, sisplatin nefrotoksisitesine (deneysel) doğrudan aracılık eden T lenfositler ile sisplatinin inflamatuvar patojenizini desteklemektedir. Sisplatin kanser hastalarında uygulandığında, hedeflenmiş T lenfositleri bu yan etkileri azaltabilmektedir (194).

Araştırmacılar, sisplatin ile indüklenen nefrotoksisitenin insan ve sıçan böbrek kesitlerinde morfolojik olarak gen ekspresyonu ve fonksiyonel değişiklikler ile karakterize olduğunu bildirmiştir. Böbrek geni ekspresyonundaki değişiklikler, sisplatinin DNA hasarına, hücre büyümesinin engellenmesine ve apoptozun tetiklenmesine işaret etmektedir. Protein hasarına uğrayan genler, sisplatin taşıyıcıların hasarına, kalsiyum homeostazının ve hücrel metabolizmanın bozulmasına ve oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir (195).

- Sinir sistemi üzerine toksisitesi

Periferik nöropati, sisplatinle ilişkili doz sınırlayıcı en önemli sorundur (196). Sisplatin alan hastaların yaklaşık olarak %50'sinde periferik nöropati geliştiği, ancak 300 mg/m²'den daha yüksek bir kümülatif doza ulaşılan kadar toksisite oluşmadığı belirtilmiştir (197, 198). Periferik nörotoksisitenin belirti ve semptomları; üst ve alt ekstremitelerde titreşim hissi kaybı, pozisyon hissi kaybı, karıncalanma, parastezi, halsizlik, tremor ve tat kaybını içerir (199-201). Nöbet ve lökoensefalopati de tanımlanmıştır (202, 203). Tedavinin kesilmesinden sonra nörolojik bozuklukların kademeli olarak düzelebildiği ve bir süreliğine veya tamamen kalıcı da olabildiği belirtilmektedir (204).

- Karaciğer üzerine toksisitesi

Sisplatinin yüksek dozları hepatotoksisiteye neden olabilir. Oksidatif stresin,

sisplatin ile indüklenmiş karaciğer hasarında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (205). Sisplatin tedavisi, dolaşımdaki transaminaz ve bilirubin artışı ile ilişkilendirilmiştir (206).

Sisplatinin sıçanlarda lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve dokuların tiol durumunu değiştirdiği ve buna eşlik eden enzimatik antioksidan değişikliklerine yol açtığı bildirilmiştir. Sisplatin uygulamasından sonra glutatyon ve glutatyon redüktaz düzeylerinin önemli derecede azaldığı, glutatyon peroksidaz, gamma-glutamil transpeptidaz ve katalaz enzim düzeylerinin ise önemli derecede artış gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca sitokrom P450 düzeyi artarken sitokrom b(5) düzeyi azalmaktadır (207).

Son yapılan çalışmalar, yüksek dozda selenyum ve vitamin E uygulamalarının sisplatinin karaciğer hasar etkilerinde koruyucu etki oluşturduğunu göstermiştir (208).

- **Hematolojik sistem üzerindeki toksik etkisi**

Yapılan çalışmada sisplatin uygulanmasına bağlı olarak anemi, trombositopeni ve nötrojeni gelişmiştir (169).

- **Gastrointestinal sistem üzerindeki toksik etkisi**

Sisplatinin doz bağımlı olarak uygulanmasından sonra bulantı ve kusmaya neden olduğu bildirilmiştir (209).

- **Kardiyovasküler sistem üzerine toksisitesi**

Sisplatin tedavisi kardiyotoksikite ile ilişkilendirilmiştir. Sisplatinin neden olduğu kardiyotoksikite, elektrokardiyografik değişim, ventriküler aritmi, supraventriküler taşikardi, atrial fibrilasyon, sinüs bradikardisi ve atriyoventriküler blok gibi bulgularla gösterilmiştir (181).

Sisplatin ile antineoplastik tedavi sonucunda uzamış QT aralığının da dahil olduğu elektrokardiyogram değişikliklerine neden olabildiği bildirilmiştir (210).

Sisplatin tedavisinde vasküler endotelial hasar, akut miyokard infarktüsü, otonomik kardiyovasküler disfonksiyon, hipertansiyon ve hipotansiyonun da görüldüğü bildirilmiştir (181).

Kardiyak membranların sisplatin ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunu sonucu kardiyak miyositlerden LDH ve kreatin kinaz sızıntısı oluşarak kardiyotoksisteye neden olabileceği bildirilmiştir (211).

- Üreme sistemi üzerindeki toksik etkisi

Deneyssel olarak çok sayıda antikanser ilaç, sperm kromozomlarında değişikliklere yol açmaktadır. Sisplatinin düşük dozunda Leyding hücre fonksiyonlarında olumsuz bir etki yaratmadığı, fakat kemoterapinin kümülatif yüksek dozunda kalıcı hasar oluşturduğu belirtilmektedir (193).

Ciftci ve ark. (212)'nin yaptığı çalışmada, sisplatinin doz bağımlı oksidatif ve histolojik hasarı artırarak üreme sistemi üzerinde toksisiteye, serum testosteron düzeylerinde azalma ve negatif yönde değişmiş sperm özelliklerine neden olduğu gösterilmiştir (212).

Sisplatin, plasentayı geçerek fetal hasara neden olabilmektedir. Sisplatinin deney hayvanlarında teratojenik ve embriyotoksik olduğu gösterilmiştir (193). İnsanlarda fetal risk yarattığından dolayı FDA gebelik risk kategorisinde D sınıfı olarak belirlemiştir.

- Alerji ve İmmünolojik etkileri

Sisplatinin ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonların yanı sıra fasiyal ödem, bronkokonstrüksiyon, taşikardi ve hipotansiyon ile karakterize edilen anaflaktik reaksiyonlara da sebep olabileceği raporlanmıştır (150, 209).

Astolfi ve ark. (213)'nin St. Anna Üniversitesi Hastanesi, Ferrara'da 123 hastanın katıldığı ve 6 yıl süren çalışmalarında, sisplatin uygulamasına bağlı gelişen istenmeyen etkileri raporlamışlardır (Tablo 2.6.) (213).

Tablo 2.6. Sisplatin uygulamasına bağlı gelişen istenmeyen etkiler.

Toksisite	İstenmeyen etki
Gastrointestinal bozukluklar	Bulantı, kusma, diyare, konstipasyon, epigastralji, pirozis, disfazi, yemek sonrası midede şişkinlik hissi, beyaz dil, tad alma duyusunda bozukluk, tad bozukluğu
Hematolojik toksisite	Anemi, lökopeni, nötropeni ve trombositopeni
Dermatolojik bozukluklar	Alopesi, kaşıntı, döküntü, ödem, kol flebiti, mukozit
Nörotoksisite	Sefaljinin takip ettiği parastezi, konuşma bozuklukları, afazi, agnozi, bayılma, konvülsiyon, panik ve geçici iskemik ataklar, görme bozukluğu, motor sensor eksikliği, motor koordinasyon bozuklukları
Nefrotoksisite	Elektrolit değişiklikleri, kan nitrojeninde, kreatin ve ürede artış, pollakiüri, hematuria, oliguri, poyuri, üriner trakt infeksiyonları ve renal yetmezlikte böbrek spazmları
Hepatik toksisite	Hematogali ve hepatik enzimlerde artış (transaminaz, bilirubin, γ -glutamil transpeptidaz
Solunum bozuklukları	Öksürük, dispne, polipne ve göğüs ağrısı
Genital apparatus bozuklukları	Vajinal boşalma gibi kadın jinekolojik semptomları
Diğer	Hiposteni ve asteni, ateş, kilo kaybı, tat kaybı

2.3. Sitotoksisite Belirleme Yöntemleri

Sitotoksisite, hücre işlevlerinde ve yapısında önemli hasar meydana gelmesidir (214). Sitotoksisitenin belirlenmesinde *in vitro* olarak farklı testler/yöntemler geliştirilmiştir. Sitotoksisite testleri ile hücrenin yaşamsal olaylarında meydana gelen değişiklikler ve hücrelerdeki hasar derecesi belirlenir. Bu testler, bir kimyasal maddenin olası toksik etkilerinin değerlendirilmesini sağlar ve hücre canlılığı, hücre bölünmesi, hücre zarı ve organel hasarı, protein ve DNA sentezi gibi hücresel olaylar hakkında bilgi verir (215, 216).

Sitotoksosite testlerinde farklı hücre kültürleri kullanılmaktadır ve özellikle toksisitenin değerlendirilmesinde çok önemlidir. Hücre kültürleri, primer hücre kültürleri, sonlu hücre kültürleri ve sürekli hücre kültürleri olarak sınıflanabilirler. Özellikle ilaç etkinliğinin ve kimyasal maddelerin toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, farklı hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* testlerin kullanılabilirliğinin ve geçerliliğinin arttığı görülmektedir. *In vitro* test sistemlerinin avantajları yanında dezavantajları da vardır.

Avantajları: Moleküler düzeyde çalışmaların yapılmasını sağlar. Hücrelerde oluşan değişimler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilir; hücrenin bulunduğu ortamın koşulları değiştirilerek, hücrelerde ortaya çıkabilecek değişiklikler izlenebilir; insan hücre kültürleri kullanılarak, hücre tipine göre, hücrenin büyüme ve çoğalması için gereksinim duyduğu koşullar daha çabuk ve kolay belirlenir; farklı hücre tiplerinde farklı kimyasal maddeler ile ortaya çıkabilecek toksik etkiler daha az maliyet ve zaman harcanarak incelenebilir; hücresel olaylarda özelleşmiş bir işlevin değerlendirilmesine ve uygun hücre tipi seçilerek istenen organdaki etkinin incelenmesine olanak sağlar.

Dezavantajları: Türler arası farklılıklar nedeniyle, bazı hayvan hücre kültürleri insan hücreleriyle benzer yanıt vermeyebilir. İnsan hepatositleri gibi bazı kültürlerin de bulunması zor ve pahalıdır. Bazı hücre tipleri klonal büyüme göstermediklerinden kültür ortamlarında kısa sürede canlılıklarını kaybedebilir. Bu hücre kültürlerinin kronik toksisite testlerinde kullanılmaları olanaksızdır. Bazı hücreler yavaş çoğalır ve bu hücreler kısa sürede fenotipik değişikliklere uğrayabilir. Tek bir test sistemi için tek bir hücre kullanılması ve bu durumda *in vitro* testlerin *in vivo* test sonuçlarını tam olarak yansıtması beklenemez. *In vitro* toksisite testleri için düzenleyici kuruluşlar ve bilim çevrelerince yayınlanmış kesin ve kabul edilmiş az sayıda kılavuz bulunmaktadır.

Hücre kültüründe hücrelerin canlılığının belirlenmesinde kullanılan sitotoksosite testlerinde, membran bütünlüğü bozulan hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin veya naftalin siyahı gibi boya ile ya da membran bütünlüğü bozulmamış sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan, nötral kırmızı gibi boyalar kullanılır. Sitotoksitenin değerlendirilmesi dört ana başlık altında incelenebilir: (215, 217)

- a. Hücre canlılığının değerlendirilmesi
- b. Yaşamsal devamlılığının değerlendirilmesi
- c. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi
- d. Metabolik sitotoksitenin değerlendirilmesi

2.3.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Bu yöntemlerde membran bütünlüğü bozulan hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile ya da membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan ya da nötral kırmızı gibi boyalar kullanılmaktadır. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan testler ile akut toksik etkiler belirlenir (218).

- Nötral kırmızı alım testi

Nötral kırmızı boyasının canlı hücrede hücre içine alınması ve lizozomda birikmesi esasına dayanır. Boyanan hücreler hemositometre üzerine yerleştirilir, optik mikroskop altında canlılık yüzdesi tespit edilir. Ayrıca boyanan hücreler spektrofotometrik olarak da ölçülebilir (219).

- Tripan mavisi testi

Tripan mavisinin membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerde birikmesi esasına dayanır. Nötral kırmızı testinde olduğu gibi hemositometre ile boyanan hücrelerin oranı tespit edilir (219).

- Floresan metodu

Canlı hücre içerisine girebilen diasetil floresan boya veya membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine girebilen propidyum iyodür floresan boya kullanılır. Floresan boyalar ile boyanmış hücreler flow sitometri veya floresan mikroskobu ile değerlendirilir (219).

2.3.2. Yaşamsal Devamlılığının Değerlendirilmesi

Yaşamsal devamlılığın değerlendirilmesinde kronik toksik etkiler incelenir. Toksik etkilere maruz kalan hücrelerde etkiler birkaç saat, gün veya daha geç görülebildiğinden ve kısa dönemde ortaya çıkan toksik etkiler geri dönüşümlü

olabileceğinden canlılık oranının belirlenmesinde, uzun dönem testleri kullanılmaktadır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi belirlenmektedir (218).

2.3.3. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Sitotoksik etki profili araştırılan maddenin hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla uygulanan testler arasında ^3H -timidin testi ve 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) immünohistokimyasal yöntem yer alır.

- ^3H -timidin testi

Hücre proliferasyonu esnasında uygulanan bir radyoizotop olan ^3H -timidin hücre içine alınması ve radyoaktivite ölçümü ile yeni DNA sentezi tespiti esasına dayanır (218).

- BrdU immünohistokimyasal teknik

Bu teknik, BrdU aracılığı ile immünohistokimyasal olarak antikorların işaretlenerek hücre ve doku antijenlerinin gösterilmesi esasına dayanır. BrdU uygulanan proliferasyon dönemindeki canlı hücreler anti-BrdU monoklonal antikorlar ile boyanarak sayım yapılabilir ya da ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kiti kullanılabilir (220).

2.3.4. Metabolik Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Metabolik sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan testler ile hücre sayısındaki net artış, total protein miktarı, DNA artışı, metabolik aktivite belirlenebilir. Bu test yöntemleri yüksek yoğunluğa sahip hücrelerin değerlendirilmesinde tercih edilir (215). Bu testler, uzun dönemde oluşabilecek toksik etkiyi belirleyebilen, hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçen, ucuz ve hızlı yöntemlerdir.

- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi

Mosmann tarafından (1983) geliştirilen MTT yöntemi, makrofaj aracılı sitotoksitenin nicel olarak belirlemede yaygın olarak kullanılan ve hızlı, kolay uygulanabilir kolorimetrik bir test yöntemidir (221). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen ortamlarda hazırlanan çözeltisi sarı renklidir. Yöntemin esası, sarı renkli MTT çözeltisinin, çözünmeyen menekşe-mor renkli formazan kristallerine dönüştüren canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanır (221). Canlı hücrelerde süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin metabolik aktiviteleri ile tetrazolyum halkası açılarak suda çözünmeyen mor formazan MTT kristalleri oluşturulur. Bu kristaller yalnızca aktif mitokondrinin aktivitesinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür (221-223). Organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyon- bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülen bir absorbans verir. Bu ölçülen absorbans değerleri dolaylı olarak hücrelerin canlılığını yansıtır. MTT yönteminde, hücre içi mitokondrinin metabolik aktivitesi değerlendirilirken, hücreler arası aktivitelerin değerlendirilmesine olanak vermez (224).

XTT ve WST testleri, MTT testinde olduğu gibi, bu maddelerin solüsyonlarında bulunan tetrazolyum tuzunun, hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanarak renkli formazon kristaline indirgenmesiyle gerçekleşen metabolik aktivitenin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (215).

- *Laktat dehidrogenaz (LDH) testi*

Kolorimetrik sitotoksite değerlendirme yöntemi olan LDH test yöntemi, hücrede membran hasarı veya sitoliz durumunda hasarlı hücreden hücre besiyeri ortamına salınan sitozolik bir enzim olan LDH ölçümü esasına dayanır (215, 220).

- *Alamar mavisi testi*

Alamar mavisi boyası ile hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği hem florometrik hem de kolorimetrik renk değişimlerinin tespit edildiği, metabolik aktivitenin belirlendiği bir yöntemdir. Alamar mavisinin indirgenmesi ile medyumdaki rengin maviden (okside) pembeye (indirgenmiş)

dönüşmesi esasına dayanır. Alamar mavisi testi, MTT testine göre pahalı bir yöntemdir (215, 217).

- *Sülforodamin B testi*

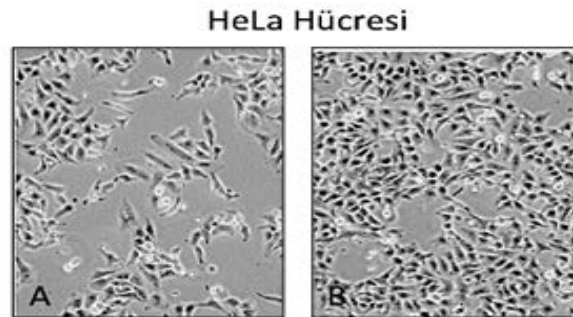
Hücre proteinlerinin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanır. Belirlenen protein miktarı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (215, 217).

2.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

İnsan serviks (rahim ağzı) kanseri hücreleri (HeLa)

Amerika Birleşik Devletlerin’de 1951’de ilk defa insandan köken alan kanser hücreleri, servikal adenokarsinomalı olan 31 yaşındaki kökenini Afrika’dan alan ve adı “Henrietta Lacks” olan hasta kadından alınmıştır ve kültür ortamında üretilmiştir. Hücrelerin alındığı yıl hasta, kanserin yayılım göstermesinden dolayı ölmüştür, fakat hastadan alınan hücrelerin ölümlü olmadığı raporlanmıştır ve hastanın anısına hücre hatlarının adına HeLa hücre serileri denilmiştir. Serviks kanser hücre hatları, ölümsüzlüklerinin anlaşılmasından sonra standart hücre soyu olarak kullanılmış ve 1951 yılından sonra çok sayıdaki araştırmalarda hücre modeli olarak seçilmiştir ve kullanımla beraber bilimsel gelişmelerde çok önemli veriler elde edilmiştir. Kanser araştırmaları için günümüzde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Şekil 2.9.) (225,226).

Adheran özelliğe sahip olan HeLa hücreleri, epitel karakterli şekiller sergilemekte olup yeni bir jenerasyonu takriben 24 saatte üretebilecek hızda proliferasyon olabilmektedirler. Düşük P53 ekspresyonu olan HeLa hücrelerinin normal retinoblastoma baskılayıcı gen ekspresyonları vardır (225-228).



Şekil 2.9. HeLa hücrelerinin (A) düşük konsantrasyonlarda, (B) yüksek konsantrasyonlarda mikroskopik görünimleri (227).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinoma) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
Timokinon ($\geq$ % 80)	Sigma
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
Penisilin-Streptomisin	PAA
Timokinon®	Horphag Research (İsviçre)
RPMI-1640	Sigma
Sisplatin	Koçak Farma®
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Derin Dondurucu (-20 ⁰ C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80 ⁰ C)	Revco
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), 6-/96-kuyucuklu plaka, pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15, 50 mL)	Corning
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar akımlı kabin	Heraeus
Mikrofiltre	Millipore® Merck
Mikropipet, 8 kanallı (5-300 µl)	Eppendorf
Mikropipetler (0.5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml)	Finnpipette, Gilson, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü (1.5ml)	Eppendorf
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
Pipet ucu, 0.5-10, 10-200, 100-1000µl'lik	Eppendorf

Santrifüj	Heraeus, Hettich
Spektrofotometre	SpektraMax M2
Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Vakum Pompası	Welch Vacuum
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler

3.3. Çalışma Çözeltileri

HeLa besiyeri

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besiyeri (vasat) için; 500 ml RPMI1640 (L-Glutamin içeren RPMI1640 vasatı) üzerine 50 ml FBS (~%10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (~%1) eklenir. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklanır.

MTT stok çözeltisi (5 mg/ml)

5 mg MTT, 1 ml PBS içinde çözülür. Elde edilen MTT stok çözeltisi Millipore (0,2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edilir ve ışıktan uzak tutulur. 4° C’de en fazla 4 gün saklanabilir. Uzun süre saklanacaksa -20°C’de saklanılır.

Sisplatin çözeltisi

10 mg sisplatin (MA: 300,01 g/mol) 20 ml enjektabl preparat içinde (Koçak Farma®) çözünmüş halde ve steril olarak bulunmaktadır. Bu çözelti 1,665 mM sisplatin içerir. 1,665 mM sisplatin çözeltisinden 1201 µl litre alınır ve 2 ml’ye vasat ile tamamlanarak 1 mM sisplatin çözeltisi hazırlanır.

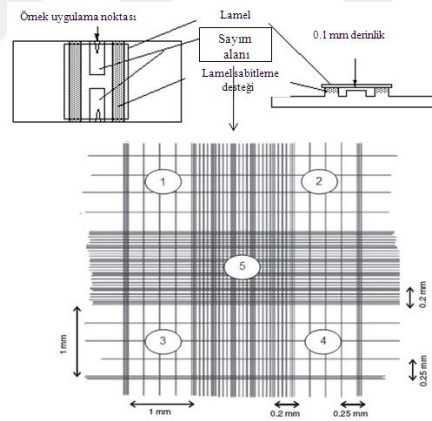
1 mM Timokinon çözeltisi

10 mM timokinon çözeltisinden 100 µl alınır ve üzerine 900 µl hücre vasatı ilave edilerek 1 mM timokinon çözeltisi elde edilir (%0,5 DMSO içerir). Çözelti taze olarak hazırlanmalı ve ışıktan uzak tutulmalıdır.

3.4. Hücrelerin Çoğaltılması

1. -80°C’de, %10 DMSO içeren besiyerinde saklanan HeLa hücreleri, çalışma öncesinde 37°C’ye getirilen su banyosunda 1 dk bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra yapılan her işlem steril şartlarda ve hava akışlı steril kabin ortamında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak gereçler %70’lik etanol ile sterilize edildi.
2. Su banyosunda 37°C’ye getirilen besiyeri (9 ml) ile hücreler (1 ml) steril bir tüp içinde süspande edildikten sonra 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj uygulandı ve üstteki berrak kısım (süpernatant) atıldı. Bu şekilde hücre ortamı yıkanarak saklama ortamındaki DMSO uzaklaştırıldı.
3. Kalan hücre pelleti, uygun besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²’lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde (37°C $\pm$ 1°C, % 90 $\pm$ % 5 nem, % 5,0 $\pm$ 1 CO₂/hava) büyümeleri sağlandı.
5. Çoğalmaya bırakılan hücrelerin besiyeri her 3 günde bir değiştirildi ve besiyerinin, kontaminasyon ve doygunluk durumu mikroskopta kontrol edildi.
6. Mikroskobik olarak değerlendirilen hücreler tüm kültür ortamını kapladıklarında, ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.
7. Hücreler 2 kez 5 ml 37°C’ye getirilmiş PBS ile yıkandı.
8. Hücrelerin üzerine 2-5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5-10 dakikalık tripsin inkübasyonundan sonra hücrelerin yapıştıkları yerden kalkmaları sağlandı. Kalkmayan hücreler için toksik olan tripsin ile uzun süre bekletilemeyeceği için kültür kabının tabanına hafifçe vuruldu. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop altında kontrol edildi.
9. Eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin iki katı kadar besiyeri ortama ilave edilerek hücreler nazıkçe süspande edildi. Hücre süspandesi steril bir tüpe aktarılarak 1200 devir/dk hızda 25°C’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile nazıkçe süspande edilerek 10 µl’si steril bir ependorf tüpte 90 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) ile iyice süspande edildi.

11. Neubauer tipi hücre sayım lamı (hemasitometre) ve bir lamel yardımı ile hücre süspansiyonu kapiler etki ile dolduruldu (Şekil 3.1.).
12. Hücre sayımı; ışık mikroskobu altında hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin iki kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz görüntülü canlı hücreler sayılarak gerçekleştirildi.
13. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:
 A: Yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldıktan sonra toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı elde edilir)
 B: Seyreltme faktörü = 10/1 (Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi karışımı)
 Yaşayan hücre konsantrasyonu (hücre/ml) = $A \times B \times 10^4$
14. Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan (sayılan hücre sayısı $\times 10^5$ hücre/ml) sonra hücre süspansiyonu besiyeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.



Şekil 3.1. Neubauer hücre sayım lamı.

3.5. Timokinonun HeLa Kanser Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

1. Laminer kabinin ultraviyole ışığı çalışmadan önce ve sonra 20 dakika açık bırakıldı. Çalışma ortamı ve gereçler kullanım öncesi ve sonrası %70'lik

etanol ile sterilize edildi. Tüm işlemler steril şartlarda ve hava akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirildi.

2. Madde 3.4'de anlatıldığı üzere uygun besi ortamında çoğaltılan ve sayılan hücreler, çoklu pipet yardımı ile 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 200 µl besiyeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin kuyucuklar içinde tutunup çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Tüm hücre hatlarında geniş konsantrasyon aralığında sisplatin ve timokinon tek başlarına 24 ve 48 saat maruziyetin sitotoksitesisi incelendi.
Sisplatin için 0,49-250 µM; Timokinon için 1,95-1000 µM konsantrasyon aralıklarında dozları uygulandı.
4. Maddelerin IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra timokinonun sisplatin ile kombinasyonlarının sitotoksitesisi araştırıldı.
 - Timokinonun sisplatin sitotoksitesisine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile uygulanan konsantrasyon aralıkları;
 - HeLa hücresinde, 24 saat inkübasyon için; 20 µM sisplatin + 7,8-250 µM timokinon ve 48 saat için 10 µM sisplatin + 7,8-250 µM timokinon kombinasyonları incelendi..
5. Negatif kontrol olarak, sisplatin ve timokinon için hücre besiyeri uygulandı.
6. İnkübasyon sonunda hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı.
7. İnkübasyon sonunda (24 ve 48. saatlerde) madde çözeltileri atıldı. Her bir kuyucuğa 90 µl besi ortamı ve hazırlanan 5 mg/ ml MTT çözeltisinden 10'ar µl ilave edilerek (0,5 mg/ml MTT ortamında) 4 saat inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrasında kristal oluşumu mikroskopik olarak gözlemlendi.
9. MTT çözeltisi dikkatli bir şekilde atıldı.
10. Kuyucuklara 200 µl PBS çözeltisi ile ilave edilerek yıkama yapıldı.
11. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 100 µl çözme solüsyonu (DMSO) eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 5 dakika süreyle çalkalandı.
12. Multiplak okuyucu spektrofotometrede örneklerin absorbens değerleri 570 nm dalga boyunda ölçüldü.
13. Çalışma farklı zamanlarda üç kez tekrarlandı ve sonuçlar üç çalışmanın

ortalaması olarak hesaplandı.

14. Işığa duyarlı bir yöntem olduğundan dolayı deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta gerçekleştirildi.
15. Her bir madde konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin, kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı elde edildi.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (A\ddot{o}/A_k) \times 100$$

(A $\ddot{o}$: Örneğin absorbansı; A_k: Kontrol grubunun absorbansı)
16. Konsantrasyona karşı gelen hücre canlılığı her madde için grafiğe geçirildi. Grafikten elde edilen denkleme göre hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalaması $\pm$ SS (standart sapma) olarak verilmiştir. Kontroller ve madde grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar “SPSS 10.5 for Windows” paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle yapıldı. Grup farklılıkları tek yönlü varyans alanizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi. Deneyler 3 kez tekrar edildi. $p < 0,05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Timokinonun HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

HeLa hücrelerinde timokinonun, 1,95-1000 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1., Tablo 4.2. ve Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.

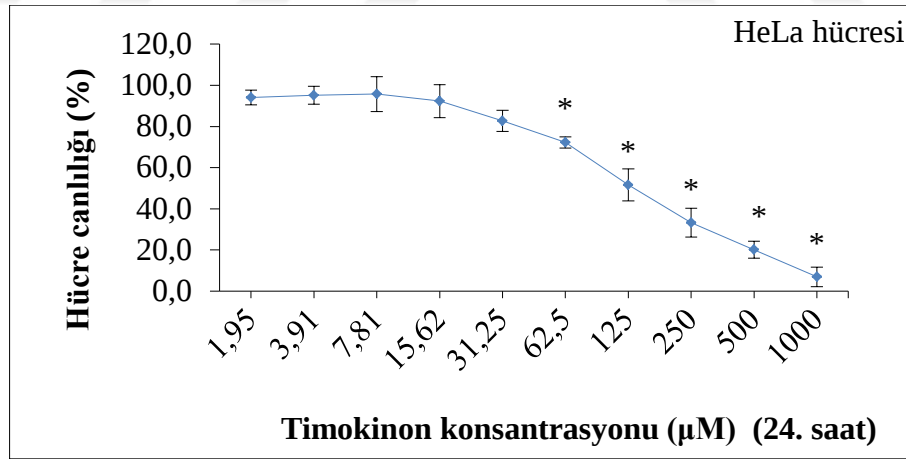
24 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun 1,95-31,25 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 62,5 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0,05$). HeLa hücrelerinde timokinona ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 143,7 μM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun 1,95-15,62 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 31,25 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0,05$). HeLa hücrelerinde timokinona ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 67,5 μM bulunmuştur.

Tablo 4.1. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	1,95 µM TK	97,8	93,8	90,6	94,1±3,6
3	3,91 µM TK	99,8	91,2	94,3	95,1±4,4
4	7,81 µM TK	105,1	93,7	88,4	95,7±8,5
5	15,62 µM TK	101,5	88,8	86,7	92,3±8,0
6	31,25 µM TK	82,8	87,9	77,5	82,7±5,2
7	62,5 µM TK	72,3	75,0	69,5	72,3±2,8 ^a
8	125 µM TK	48,1	46,2	60,5	51,6±7,8 ^a
9	250 µM TK	26,0	39,9	33,7	33,2±7,0 ^a
10	500 µM TK	16,0	19,9	24,4	20,1±4,2 ^a
11	1000 µM TK	2,3	6,9	11,7	6,9±4,7 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^ap<0,05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

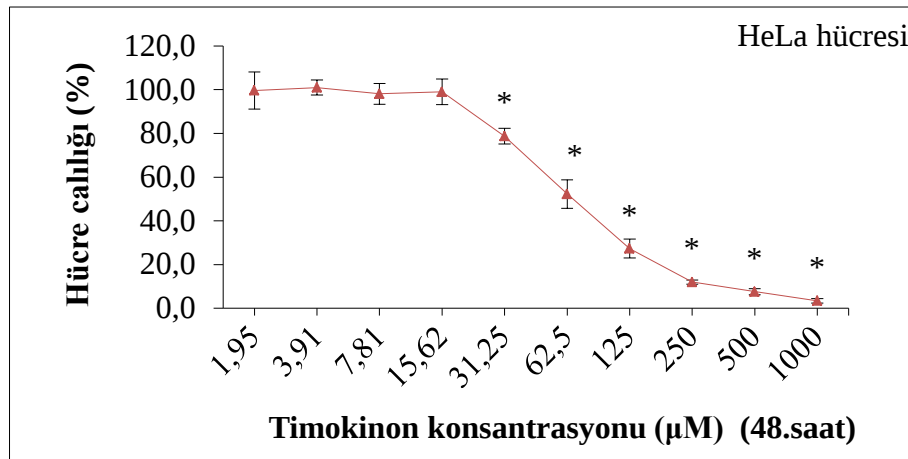
**Şekil 4.1.** HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^ap<0,05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

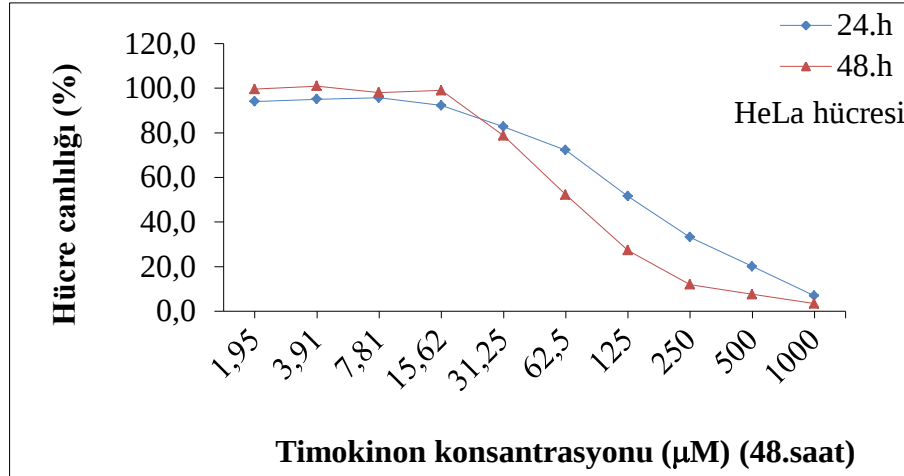
Tablo 4.2. HeLa hücre canlılığı üzerine timokininonun 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	1,95 µM TK	98,8	108,5	91,7	99,6±8,4
3	3,91 µM TK	102,7	97,0	103,2	101,0±3,4
4	7,81 µM TK	102,5	93,0	98,8	98,1±4,8
5	15,62 µM TK	105,3	93,8	97,8	99,0±5,8
6	31,25 µM TK	77,6	82,7	75,8	78,7±3,6 ^a
7	62,5 µM TK	59,3	46,6	50,9	52,3±6,5 ^a
8	125 µM TK	32,1	23,8	26,1	27,3±4,3 ^a
9	250 µM TK	11,6	11,2	13,1	12,0±1,0 ^a
10	500 µM TK	8,2	6,0	8,6	7,6±1,4 ^a
11	1000 µM TK	3,3	4,5	2,5	3,4±1,0 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^ap<0,05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.2.** HeLa hücre canlılığı üzerine timokininonun 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^ap<0,05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0,05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2. Sisplatinin HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

HeLa hücrelerinde sisplatinin 0,49-250 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.3. ve Tablo 4.4. ve Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.' da verilmiştir.

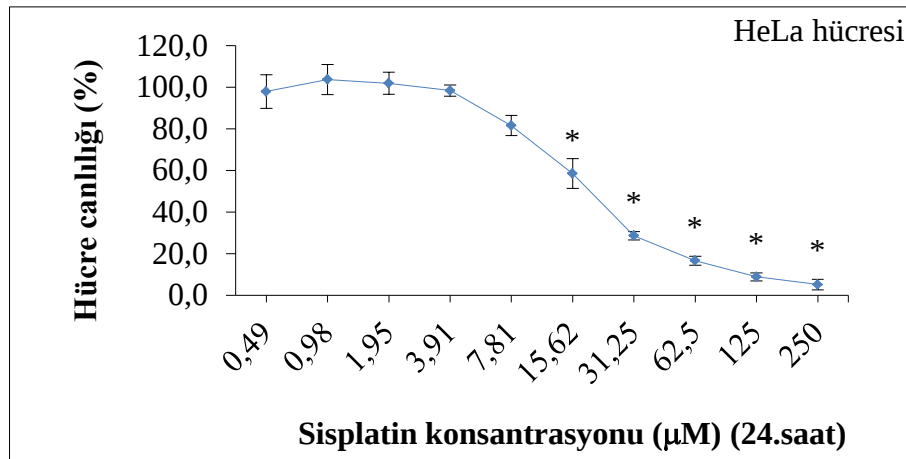
24 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 0,49-7,81 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 15,62 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$). HeLa hücrelerinde sisplatine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 20,31 μ M bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 0,49-3,91 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 7,81 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$). HeLa hücrelerinde sisplatine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 12,9 μ M bulunmuştur.

Tablo 4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	Negatif Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	0,49 µM Sisplatin	97,8	106,1	90,0	98,0±8,1
3	0,98 µM Sisplatin	104,9	110,4	96,1	103,8±7,2
4	1,95 µM Sisplatin	98,8	108,0	98,9	101,9±5,3
5	3,91 µM Sisplatin	95,7	98,8	101,0	98,5±2,7
6	7,81 µM Sisplatin	76,5	86,1	82,2	81,6±4,8
7	15,62 µM Sisplatin	58,3	51,5	65,8	58,5±7,1 ^a
8	31,25 µM Sisplatin	28,7	30,6	26,7	28,7±2,0 ^a
9	62,5 µM Sisplatin	14,9	16,0	19,1	16,7±2,2 ^a
10	125 µM Sisplatin	6,7	9,6	10,4	8,9±1,9 ^a
11	250 µM Sisplatin	4,0	3,6	8,1	5,2±2,5 ^a

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO uygulandı. ^a $p<0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

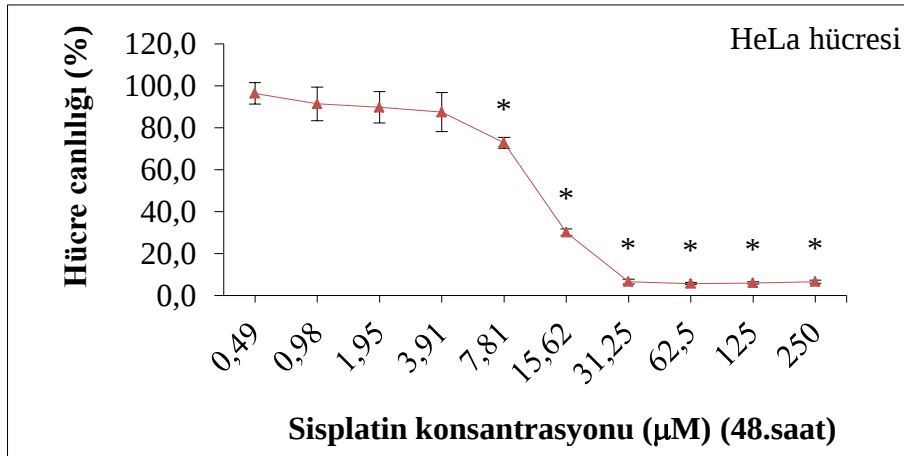
**Şekil 4.4.** HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO uygulandı. ^a $p<0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

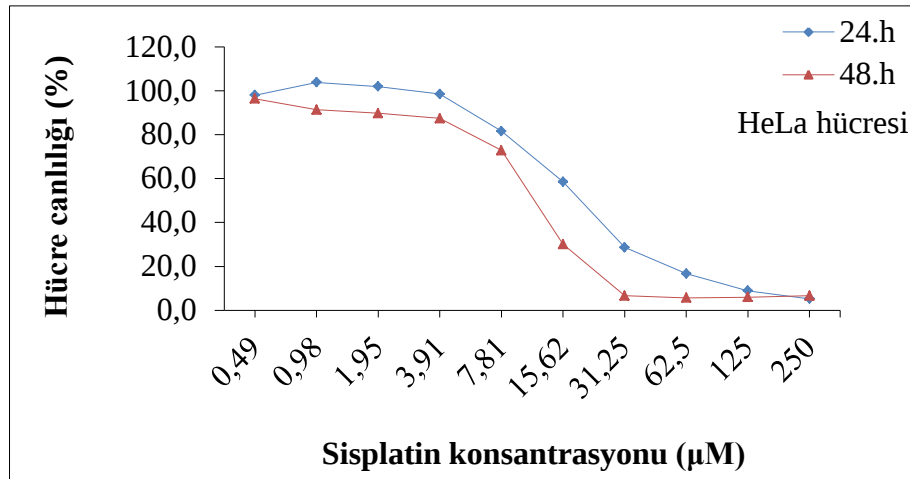
Tablo 4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	Negatif Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	0,49 µM Sisplatin	102,0	95,0	92,1	96,4±5,1
3	0,98 µM Sisplatin	96,6	95,4	82,1	91,4±8,1
4	1,95 µM Sisplatin	98,1	87,3	83,8	89,7±7,5
5	3,91 µM Sisplatin	98,1	83,3	81,0	87,4±9,3
6	7,81 µM Sisplatin	75,2	70,1	73,2	72,8±2,6 ^a
7	15,62 µM Sisplatin	30,2	28,6	31,7	30,1±1,6 ^a
8	31,25 µM Sisplatin	7,6	6,8	5,5	6,6±1,1 ^a
9	62,5 µM Sisplatin	6,3	5,5	5,2	5,7±0,6 ^a
10	125 µM Sisplatin	6,5	6,0	5,5	6,0±0,5 ^a
11	250 µM Sisplatin	7,3	6,6	5,8	6,6±0,8 ^a

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO uygulandı. ^a $p<0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.5.** HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO uygulandı. ^a $p<0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine cisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.3. Timokinonun HeLa Hücrelerinde Cisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Timokinonun HeLa hücrelerinde 7,8-250 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda cisplatin sitotoksitesi üzerine etkileri Tablo 4.5. Tablo 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

HeLa hücrelerinde timokinonun 7,8-250 μ M konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, cisplatinin IC_{50} değerini (20 μ M) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında doz bağımlı (7,8 μ M, 15,6 μ M, 31,3 μ M, 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M için sırasıyla %20,6, %33,3, %46,8, %56,5, %70,8, %84,2) istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$).

HeLa hücrelerinde timokinonun 7,8-250 μ M konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, cisplatinin IC_{50} değerini (10 μ M) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında doz bağımlı (15,6 μ M, 31,3 μ M, 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M için sırasıyla %41,6, %44,2, %62,2, %71,1, %81,9) istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.5. HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

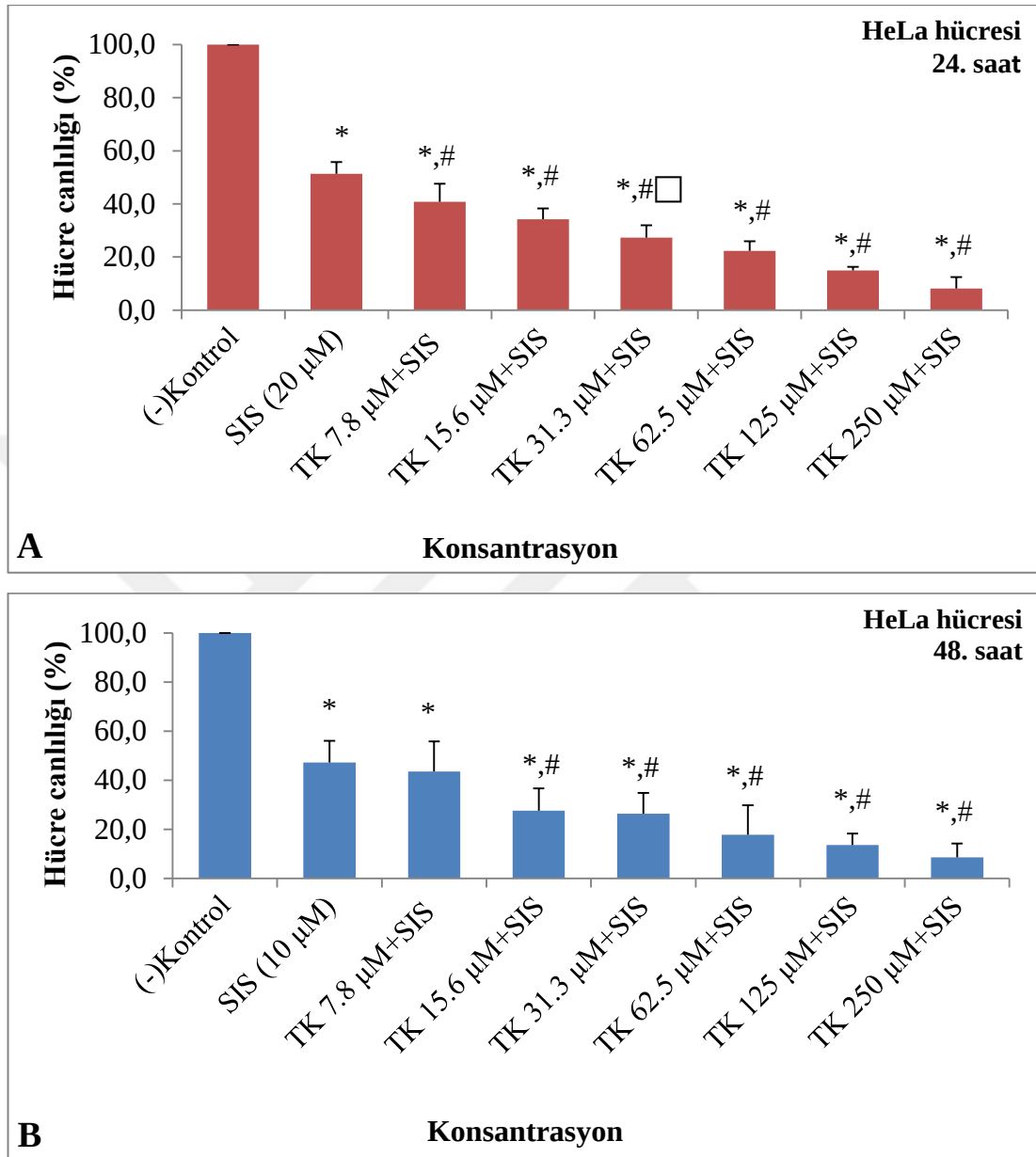
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	(-)Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	SIS (10 µM)	47,8	51,4	54,8	51,3±3,5 ^a
3	TK 7,8 µM+SIS	41,0	39,2	42,1	40,8±1,5 ^{a,b}
4	TK 15,6 µM+SIS	34,8	36,5	31,4	34,2±2,6 ^{a,b}
5	TK 31,3 µM+SIS	29,8	29,2	23,0	27,3±3,8 ^{a,b}
6	TK 62,5 µM+SIS	23,0	21,6	22,4	22,3±0,7 ^{a,b}
7	TK 125 µM+SIS	14,6	16,2	14,2	15,0±1,1 ^{a,b}
8	TK 250 µM+SIS	8,1	2,3	14,0	8,1±5,8 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0,05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0,05$, sisplatin (20 µM) ile karşılaştırıldı. SIS: sisplatin; TK: timokinon.

Tablo 4.6. HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Hücre canlılığı
1	(-)Kontrol	100	100	100	100,0±0
2	SIS (10 µM)	50,8	44,1	47,0	47,3±3,3 ^a
3	TK 7,8 µM+SIS	43,9	41,0	45,7	43,5±2,4 ^a
4	TK 15,6 µM+SIS	28,3	27,1	27,4	27,6±0,6 ^{a,b}
5	TK 31,3 µM+SIS	26,4	26,6	26,2	26,4±0,2 ^{a,b}
6	TK 62,5 µM+SIS	20,9	14,6	18,1	17,9±3,2 ^{a,b}
7	TK 125 µM+SIS	13,7	13,9	13,4	13,7±0,3 ^{a,b}
8	TK 250 µM+SIS	7,2	9,5	9,0	8,6±1,2 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0,05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0,05$, sisplatin (10 µM) ile karşılaştırıldı. SIS: sisplatin; TK: timokinon.



Şekil 4.7. HeLa hücreleri üzerinde timokininin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

*Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0,05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0,05$, sisplatin (20 µM ve 10 µM) ile karşılaştırıldı. SIS: sisplatin; TK: timokinin.

5. TARTIŞMA

Ranunculacea (Düğünçiçeğigiller) familyasında yer alan ve ülkemizde “çörek otu tohumu” olarak bilinen *Nigella sativa* tohumları çay, kahve, ekmek gibi besinlere ilave edilerek besinsel olmak üzere kullanıldığı gibi geleneksel olarak astım, öksürük, bronşit, inflamasyon, diyabet, mide-barsak problemleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun yıllar kullanıldığı bilinmektedir.

Çörek otu tohumu uçucu yağının yapısında bulunan farmakolojik olarak aktif başlıca temel bileşik timokinondur. Timokinonun serbest oksijen radikallerini süpürerek oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan savunmayı arttırabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda timokinonun oksidatif hasara karşı böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide üzerinde koruyucu etkilere sahip olabildiği ve çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antikarsinojenik, antiinflamatuvar, analjezik, hipoglisemik, bağışıklık sistemini güçlendirici gibi çeşitli faydalı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (24-27). Yapılan çalışmalarda timokinonun çok geniş bir koruyucu ve/veya tedavi edici özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir Bu geniş etkilerine ait rağmen, söz konusu etkilerin mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar yeterli değildir.

Kadınlarda meme ve serviks kanseri dünyadaki ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Kanser tedavisinde kemoterapinin yüksek maliyeti ve potansiyel toksisitesinden nedeniyle doğal olarak bulunan, yüksek etkiye sahip ve farmasötik bileşenlere oranla daha düşük yan etki riskine sahip fitokimyasal maddelere ilgi artmaktadır. Yapılan deneysel araştırmalarda doğal bileşenlerin ve bitki ekstraktlarının, antikanser potansiyele sahip olduğunu gösterilmiştir.

Sisplatin, iyi bilinen bir antineoplastik ilaç olup özellikle over, meme, beyin, testis, baş-boyun solid tümörlerinde ve ayrıca yumuşak doku, kemik, kas ve kan damarları sarkomalarında sıklıkla kullanılır.

Yapılan çalışmalara göre uzun yıllar geleneksel tıpta kullanılan timokinonun sisplatin ile birlikte kullanımına bağlı oluşan etkiye ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltmak ve vücut içi etkilerini arttırmak amacıyla kombine olarak bitki ekstraktlarının kullanımı araştırılmaktadır.

Batı dünyasında yumurtalık kanseri, zayıf prognozdan veya erken dönem

belirtilerin olmayışından olasılıklı olarak jinekolojik kanserlerden en çok ölüme yol açan kanser olarak tanımlanmıştır (229, 230). Sisplatin gibi platin içerikli ilaçlar rutin olarak yumurta kanserinde kullanılsa da yan etkileri ve kendilerine karşı geliştirilen ilaç direnci düşük bir sağkalımla sonuçlanmaktadır (231).

Son zamanlarda kanser hücrelerinin büyümesini engellemek için kemoterapötik ajanlarla beraber daha az yan etkilere sahip olduğundan özellikle fitokimyasallar gibi besinsel kemokoruyucu ajaların kullanımına ilgi artmıştır. Tümöre karşı besinsel bileşenler, antitümör aktivitelerini platin içerikli ilaçlardan farklı olarak hücre sinyal yollarını düzenleyerek gösterdiğinden platin içerikli ilaçlarla besinsel bileşenlerin birlikte kullanılmasıyla sinerjistik etkinin oluşabileceği ve antitümör aktivitesinin artacağı ve/veya yan etkilerin kompanzasyon olacağı ön görülmüştür (232). Serviks kanser hücrelerinde hücre ölümünü veya apoptozisi indükleyen doğal bileşenlerin olası etki mekanizmaları birçok *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (233).

Bu tez çalışmasında önemli biyolojik etkileri olduğu bilinen ve son yapılan çalışmalarda önemi gittikçe artan timokinonun antikanser ilaç sisplatinle birlikte kombine kullanımının serviks kanser hücreleri (HeLa) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Tez çalışmamızda belirli konsantrasyonlarda timokinonun ve sisplatinin farklı inkübasyon zamanlarında HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri incelendikten sonra timokinonun ve sisplatinin bir arada uygulanmasını takiben sisplatin sitotoksitesisi üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

MTT yöntemi, *in vitro* koşullarda sitotoksiteyi değerlendirmek için uygulanan ve mitokondriyal enzim aktivitesini ölçen kolorimetrik bir test yöntemidir. MTT ve diğer tetrazolyum tuzlarının, solunum zinciri ve diğer elektron taşıma sistemleri tarafından hücre içinde suda çözünmeyen menekşe renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanır (234).

Sitotoksiste çalışmamızda HeLa hücreleri uygun çoğalma hızına ve mükemmel koloni oluşturma özelliklerine sahip olması ve ayrıca pek çok kimyasal maddeye karşı hassasiyet göstermesi gibi birçok nedenden dolayı tercih edilmiştir. Ayrıca bu hücre hattı kanser araştırmaları için günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır.

Yapılan birçok çalışmada timokinonun kanser hücrelerine seçici sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterilmektedir. Timokinonun seçici olarak tümör hücrelerini

öldürebileceği tartışılmaktadır (27).

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun 31,25 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı ve IC_{50} değerlerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için sırasıyla 143,7 μM ve 67,5 μM olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre timokinon HeLa hücrelerine sitotoksitesinin hem doz bağımlı hem de zaman bağımlı olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 15.2 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında; 24 saatlik inkübasyonları için 7,81 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı ve IC_{50} değerlerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için sırasıyla 20,31 μM ve 12,9 μM olduğu belirlenmiştir.

HeLa hücrelerinde timokinonun sisplatinin IC_{50} değerini negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24 saatlik inkübasyonda (7,8 μM , 15,6 μM , 31,3 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM için sırasıyla %20,6, %33,3, %46,8, %56,5, %70,8, %84,2) ve 48 saatlik inkübasyonda (15,6 μM , 31,3 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM için sırasıyla %41,6, %44,2, %62,2, %71,1, %81,9) doz bağımlı istatistiksel anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Sonuçlarımız timokinonun HeLa hücrelerinde sisplatin sitotoksitesini hem doz bağımlı hem de zaman bağımlı olarak arttırdığını göstermektedir.

Timokinonun üzerine yapılan bir *in vitro* çalışmada 1 mM konsantrasyonda uygulandığında dakikalar içinde nükleer büzüşme ve plazma membran kabarcık oluşumlarına yol açarak hızlı bir sitotoksik etki oluşturduğu ve daha düşük konsantrasyonlarda yapılan çalışmada ise 100 μM konsantrasyondaki timokinonun saatler içinde hücre ölümüne yol açtığı, 50 μM ve 2 μM konsantrasyonlarda 48 saat içinde akut sitotoksisiye neden olduğu gösterilmiştir. 10 μM ve 20 μM konsantrasyonlardaki timokinonun kontrole kıyasla nekroz düzeyinde artışı tetiklediği görülmüştür. Daha düşük dozlar, daha az toksik olmakla beraber nekroz düzeyi, kromozomal aberasyon sıklığı ve mikroçekirdek oluşumu gibi toksik etkilerin ortaya çıkışını tetiklediği görülmüştür (235).

Timokinonun kanser büyümesini ve ömrünü azaltan çoklu moleküler etki

mekanizmaları: PTEN ve p21 gibi tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu, proinflamasyonu ve NF- κ B'nin uyarılmasının inhibisyonu ile anjiogenik uyarıların azaltılması şeklindedir (94, 236-238).

Kanser hücrelerinde platin bileşiklerine bazı direnç mekanizmaları tanımlanmıştır (238). Bunlardan birinde; NF- κ B inhibitörlerinin çeşitli sitotoksik ajanların antitümör aktivitesini potansiyelize ettiği ve sisplatin ise NF- κ B'yi tetikleyerek hücre ölümünü azalttığı belirtilmiştir. Diğer mekanizmada ise sisplatinin DNA içine eklenerek DNA çift zincir kırıklarını indüklediği yolakta ancak over kanser hücrelerinde bu etkisinin azaldığı tesbit edilmiştir (239).

Erkek albino sıçanda timokinonun, 15 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanan doksorubisinden önce ve doksorubisin ile birlikte 5 gün boyunca günde 10 mg/kg oral yolla içme suyunda uygulandığı *in vitro* bir çalışmada, doksorubisin ile indüklenmiş kardiyotoksisitenin azaldığı görülmüştür. Bu olumlu etki, doksorubisin uygulamasından 24 saat sonra artan serum LDH enzim düzeyini önemli derecedeki azaltması ile gösterilmiştir. Doksorubisinin kardiyotoksisitesinin süperoksit serbest radikaller oluşturmamasından kaynakladığı, timokinonun koruyucu etkisinin ise fotokimyasal, biyokimyasal veya baskılanmış polimorfonükleer lökositlerden kaynaklanan süperoksit serbest radikallere karşı etki etmesinden ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesinden olduğu gösterilmiştir (240).

Köpek osteosarkoma (COS31) ve onun sisplatine (CDDP) dirençli varyantı (COS31/ τ CDDP), insan meme adenokarsinom (MCF7), insan yumurtalık adenokarsinom (BG-1) ve Madin-Darby köpek böbreği (MDCK) hücre hatlarının kullanıldığı çalışmada timokinonun etkisi araştırılmıştır. 12., 24. ve 48. saatlerde 0-100 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda timokinonun uygulandığı hücre hatlarında, timokinonun konsantrasyondan bağımsız olarak 7,7-101 μ M arasındaki IC₅₀ değerleri ile COS31, COS31/ τ CDDP, MCF7, BG-1 ve MDCK hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. MDCK hücreleri timokinonun inhibisyon etkisine en dirençli hücreler olduğu gösterilmiştir. MDCK hücrelerindeki timokinonun IC₅₀ değeri 101 μ M, BG-1 hücrelerinde IC₅₀ değeri 39,65 μ M, MCF7 hücrelerinde IC₅₀ değeri 10,32 μ M'dir. Sisplatine dirençli varyant COS31/ τ CDDP hücreleri 7,7 μ M IC₅₀ değeri ile tüm hücreler arasında timokinonun inhibisyon etkisine en hassas hücre hattı olduğu ve kardeş hücre hattı COS31 hücrelerinde IC₅₀

değeri 34,8 μ M olarak gösterilmiştir (241).

Ng ve ark. (242)'nin çalışmasında, 24, 28 ve 72 saat boyunca 1,0-30 μ g/ml arasında değişen konsantrasyonlarda timokinon ve sisplatinin uygulandığı SiHa hücrelerinden 1,0 μ g/ml, 3,0 μ g/ml, 10 μ g/ml ve 30 μ g/ml'lik timokinon konsantrasyonuna maruz bırakılan ve iki bileşenin de kullanılmadığı kontrol gurubunda 72 saat boyunca hücre çoğalmasının olmadığı tespit edilmiştir. Timokinonun veya sisplatinin uygulandığı SiHa hücrelerinde 1,0 μ g/ml - 30 μ g/ml'lik konsantrasyonlarda 24., 48. ve 72. saatlerde, canlı hücre yüzdesinde önemli bir azalma olduğu görülmekle beraber timokinonun normal hücrelerde sisplatinden daha az sitotoksik olduğu bildirilmiştir (242).

En çok görülen iki akciğer kanser tipi olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) tedavisinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanın CDDP olduğu bildirilmiştir (243, 244). CDDP tek başına kullanıldığında NSCLC'de %20 yanıt oluştururken, ikinci bir ajanla kullanımında yanıtın %26 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir (245).

Jefri ve ark. (246)'nın yaptığı çalışmada NSCLC hücre hattı olarak NCI-H460'ı ve SCLC hücre hattı olarak da NCI-H146'yı kullanmışlardır. Hücrelere önceki deneyimlerden hesaplanan IC_{50} değerlerine dayanarak 80 μ M ve 100 μ M timokinon ve %0,1 DMSO, 125 μ M, 2,5 μ M ve 5,0 μ M sisplatin, belirtilen konsantrasyonlarda ayrı ayrı ve birlikte uygulanmıştır ve uygulamayı takiben 24., 48. ve 72. saatlerde hücre sayımı yapılmıştır. Timokinonun çalışılan tüm konsantrasyonlarında özellikle 24. saatte hücre proliferasyonunu önemli derece inhibe ettiği, 48. ve 72. saatlerde inhibisyon etkisinin azaldığı; sisplatinin 24. saatte timokinon kadar aktif olmadığı ancak 48. ve 72. saatlerde önemli derecede hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir; timokinon ve sisplatinin birlikte kullanımının hücre proliferasyonundaki etkisi 72. saatte de her iki bileşenin tek başına kullanımından daha yüksek olarak %89'a kadar bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar timokinon ve sisplatinin sinerjistik bir etki gösterdiği sonucuna varmışlardır (246).

Nessa ve ark. (247), A2780 yumurtalık hücre hattı ve onun sisplatine dirençli A2780^{CisR} hücre hattında sisplatin ve timokinonun sinerjistik etkisini araştırdıkları çalışmada, sisplatin ve timokinonun birlikte uygulanması sonrasında sinerjistik etki

gösterilmiştir. Hücre hatlarına uygulanan sisplatin konsantrasyonu A2780 ve A2780^{CisR} hücre hatlarına sırasıyla, sisplatin 0,26-4,09 μ M, 1,66-26,52 μ M ve timokinon 2,28-36,49 μ M, 1,93-30,83 μ M'dir. Çalışma dizaynında, iki bileşenin aynı anda ve birinin diğerinden önce eklenmesi göstermek üzere sekanslar belirlenmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında A2780 hücre hattında her üç sekans için zayıf, A2780^{CisR} hücre hattında daha güçlü bir sinerjistik etki görülmüştür. Her iki hücre hattında da bolus ilavenin en az sinerjistik etki gösterdiği, en yüksek sinerjistik etkiyi ise önce TK'nın sonra sisplatinin eklendiği sekansın gösterdiği belirtilmiştir (247).

Al-Malki ve ark. (98)'nin erkek Wister sıçanda yaptığı çalışmada, bir grup normal, ikinci gruba 12 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanan sisplatin, üçüncü gruba da 1 ay boyunca günde 500 mg/kg oral timokinon uygulama sonrasında 12 mg/kg i.p. olarak uygulanan sisplatin verilmiştir. Çalışma sonunda başlangıç vücut ağırlıkları arasında önemli bir fark bulunmamıştır, ancak yalnız sisplatinin verildiği grupta vücut ağırlığında önemli bir azalma, timokinonun verildiği grupta ise önemli bir artış görülmüştür. Yalnız sisplatinin uygulandığı grupta ALT, ALP, AST, γ -GGT, total bilirubin ve LDH'nin hepatik düzeylerinde önemli bir artış olduğu ve serum albüminde önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Timokinonun uygulanması bazı hepatik biyogöstergelerinin olumsuz etkisini önemli derecede iyileştirdiği ve diğer toksik etkileri azalttığı gösterilmiştir. Glutasyon-S-transferaz aktivitesinin timokinonun uygulandığı grupta sisplatinin uygulandığı gruba kıyasla önemli bir derecede arttığı görülmüştür. Katalaz aktivitesi ise sisplatin grubunda önemli derecede azaldığı, oral uygulanmasına rağmen timokinonun verildiği grupta arttığı tespit edilmiştir. Sisplatinin verildiği grupta malondialdehit düzeyi önemli derecede artarken timokinonun verildiği grupta ise azalmıştır. GSH aktivitesi sisplatinin verildiği grupta azaldığı, timokinon uygulanması ile bu değişikliklerin düzeldiği gösterilmiştir. Sisplatin uygulanan grupta dozdan bağımsız olarak NO düzeyi artarken, timokinonun verildiği grupta bu etkiler önemli derecede azalmıştır. IL-1 β ve TNF α düzeyleri, sisplatin uygulanan grupta doza bağımlı olarak önemli derecede artarken, timokinonun uygulanması ile artan düzeyler önemli derecede azaltılmıştır (98).

Wilson ve ark. (248), over kanser hücrelerinde timokinon ve sisplatinin sinerjistik etkisini çalışmışlardır. Haftada üç defa 20 mg/kg timokinon ve haftalık 2

mg/kg sisplatin intraperitoneal yolla 30 boyunca uygulanmıştır. Sisplatin farede hücre proliferasyonunu önemli derecede azaltmıştır ve tüm kanser yükünün azalmasına yol açan tümör hücrelerinde apoptozu arttırmıştır. Sisplatinle timokinon birlikte kullanıldığında iki ilacın etkileri birleşerek bu indisler daha çok azalmıştır. Timokinonla kombinasyonda sisplatinin önemli bir antitümör etki mekanizması olan proapoptotik etkisini artmıştır. Timokinon ve sisplatin arasında sinerjistik etki gözlenmiştir (248).

Ng ve ark. (2)'nin yaptığı çalışmada timokinon yüklü nano yapıdaki lipid taşıyıcıların meme ve serviks kanser hücrelerindeki (HeLa ve SiHa) sitotoksitesi 24, 28 ve 72 saat boyunca gözlenmiştir. Timokinon yüklü nano yapıdaki lipid taşıyıcısının uygulanmasında doz bağımlı artan bir sitotoksite oluşturduğu, tek başına nano taşıyıcı lipidin uygulanması sonucunda canlı hücre sayısının %87'den fazla olduğu bildirilmiştir (2).

Hafıza ve ark. (233)'nin yaptığı çalışmada, HeLa, SiHa 3T3, Vero'dan oluşan farklı hücre hatlarında 3.0-200 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmış timokinonun sitotoksik etkileri 24., 48. ve 72. saatlik inkübasyon sonrası incelenmiştir. HeLa, SiHa 3T3, Vero hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen timokinonun IC₅₀ değerleri sırasıyla 119,2 μ M, 87,8 μ M, 70,6 μ M, 21,8 μ M; 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 72,1 μ M, 52,3 μ M, 69,3 μ M ve 17,7 μ M; 72 saatlik inkübasyon 29,6 μ M, 23,4 μ M, 61,7 μ M ve 17,4 μ M olarak gösterilmiştir. Timokinonun farklı hücrelerde ve farklı sitotoksik etkilerinin ortaya çıktığı bu çalışmada, tez çalışmamızla uyumlu olarak sitotoksistenin zaman ve doz bağımlı olduğu görülmektedir (233).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile gıda yoluyla sıklıkla alınan bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerden olan timokinonun HeLa kanser hücrelerinde, sitotoksitesi ve sisplatin ile birlikte kullanımında hücre canlılığını azaltıcı veya arttırıcı etkilerini ve güvenli kullanımını ortaya çıkararak konuya açıklık getirilmeye çalışılmıştır. Bu bulgular ile, sisplatinin antikanser tedavisinde timokinon ve sisplatin kullanımının kanser tedavisindeki olumlu yada olumsuz yönlerini ortaya çıkarabileceği ve antikanser tedaviye yeni bir bakış açısı katacağı düşünülmektedir.

Timokinon üzerine yapılan çalışmaların çoğunda timokinonun tedavi edici etkilerine odaklanılmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda timokinonun böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide gibi birçok organ sisteminde oluşan oksidatif stres kaynaklı hasarları düzeltebileceği bildirilmiştir. Timokinonun antikarsinojenik, antiinflamatuvar, analjezik, hipoglisemik, bağışıklık sistemini güçlendirici gibi birçok faydalı etkileri ileri sürülmektedir ve güvenli olduğu bildirilmektedir (27).

Timokinonun ve timokinonun güvenilirliği birçok klinik çalışma ile *in vivo* ve *in vitro* çalışma ile desteklense de uzun dönem toksisitesinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Timokinonun çeşitli insan kanserlerinin önlenmesinde ve tedavisinde önemi rol oynayabileceği, mevcut verilerin daha fazla klinik çalışma ile desteklenmesi gerektiği görülmektedir. Mevcut literatür çalışmaları ile uyumlu olarak çalışmamızda timokinonun doz ve zaman bağımlı olarak sisplatin sitotoksitesini arttırabildiği görülmektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız HeLa hücrelerinde timokinonun sisplatin sitotoksitesini arttırabileceğini göstermektedir. Kanser tedavisinde sisplatinle birlikte timokinonun kombine verilmesinin tedavi etkinliğini arttırabileceği ve umut vaad edici öngörülse de, kanser tedavisinde timokinonun sisplatinle birlikte etkinliği ve terapötik öneminin ortaya çıkarılması ve ayrıca etki mekanizmalarının aydınlatılması için daha kapsamlı *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmaların gerekli olduğu görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. AbuKhader MM. Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: fact or fiction? *Pharmacogn Rev.* 2013;7(14):117-120
2. Ng WK, Yazan LS, Yap LH, Hafiza WA ve ark. Thymoquinone-loaded nanostructured lipid carrier exhibited cytotoxicity towards breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7) and cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa). *Biomed Research International.* DOI: 10.1155/2015/263131.
3. Mostafa AGM, Hossain MK, Basak D, Bin Sayeed MS. Thymoquinone as potential adjuvant therapy for cancer treatment: evidence from preclinical studies. *Front Pharmacol.* 2017;8:295.
4. Majdalawieh AF, Fayyad MW, Nasrallah GK. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(18):3911-3928.
5. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future. *Nat rev Cancer.* 2002;2:143-8.
6. Gullett NP, Ruhul Amin AR, Bayraktar S, Pezzuto JM, Shin DM, Khuri FR ve ark. Cancer prevention with natural compounds, *Semin Oncol.* 2010;37:258-81.
7. Balachandran P, Govindarajan R. Cancer: An ayurvedic perspective. *Pharmacol Res.* 2005;51:19-30.
8. Sung B, Prasad S, Yadv VR, Aggarwal B B. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutr. Cancer.* 2012;64:173-197.
9. Nergiz C, Ötleş S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chemistry.* 1993;48:259-261.
10. Baytop B. Türkiye’de kullanılan tıbbi bitkiler. İstanbul Üniversitesi Yayınları. 1984;3255; 211-12.
11. Galli-Mustasib H, El-Najjar N, Schneider-Stocks R. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its component. *Advances in Phytomedicine.* 2006;2:133-153.
12. Jansen PCM. Spices, condiments and medicinal plants in Ethiopia, their taxonomy and agricultural significance. Addis Ababa: Center for Agricultural Publishing and Documentation. 1981;76-85.
13. Ramadan MF. Nutritional value, functional properties and nutraceutical application of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *IJFS Technol.* 2007;42:1208-1218.
14. Atta-ur Rahman MM, Malik S, Zaman K. Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of Natural Products.* 1992;55:676-678.

15. Al-Gaby AM. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (Black cumin) cake protein. *Nahrung*. 1998;42:290-294.
16. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch C*. 2003;58(9-10):629-631.
17. Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. Glossary of Indian medicinal plant. New Delhi: CSIR. 1956;175.
18. Nadkarni K. *Crocus sativus*, *Nigella sativa*. In: Nadkarni KM editor. *Indian materia medica*. Bombay, India: Popular Prakashan. 1976;386-411.
19. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009;20(5):741-752.
20. Cisplatin. [Internet]. DrugBank. [Erişim tarihi 23 Nisan 2018]. Erişim adresi: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00515>.
21. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378.
22. Cetin R, Devrim E, Kiliçoğlu B, Avci A, Candir O, Durak I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissue: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol*. 2006;26(1):42-46.
23. Khan A, Chen H, Tania M, Zhang D. Anticancer activities of *Nigella sativa* black cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8:226-232.
24. Forouzanfar F, Bazzaz BSF, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iran Journal of Basic Medical Science*. 2014;17(12):929-938.
25. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1749-1770.
26. Khader M, Eckl PM. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran Journal of Basic Medical Science*. 2014;17(12): 950-7.
27. Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh CA, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Res*. 2015;95-96:138-158.
28. El-Tahir KEH, Bakeet DM. The black seed *Nigella sativa* L. a min for multi cure: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2006;1:1-19.

29. Shafiq H, Ahmad A, Masud T, Kalem M. Cardio-protective and anti-cancer therapeutic potential of *Nigella sativa*. Iran Journal of Basic Medical Science. 2014;17(12):967-79.
30. Kalidasu G, Reddy GS, Kumari SS, Kumari AL, Sivasankar A. Secondary volatiles and metabolites from *Nigella sativa* L. seed. I J N P Res. 2017;8(2):151-158.
31. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. Protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. Iran Journal of Basic Medical Science. 2014;17(12):958-66.
32. Salomi M J, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. Nutr. Cancer. 1991;16(1): 67-72.
33. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). J Pharm Biomed Anal. 1999;19:757-62.
34. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytotherapy Res. 2003;17:299-305.
35. Goyal SN, Prajapati CP, Gore PR, Patil CR ve ark. Therapeutic potential and pharmacological development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. Front Pharmacol. 2017;8:656.
36. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, in mice. Eur J Pharmacol. 2000;400(1)89-97.
37. El Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in Guinea-pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. Gen Pharmacol. 1993;24(5):1115-1122.
38. Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RM, Al-Shagha WM. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit mode. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2015;40(3):319-323.
39. Kundu J, Chun KS, Aruoma OI, Kundu JK. Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. Mutat. Res. 2014;768:22-34.
40. Surekha R, Sumathi T. An efficient encapsulation of thymoquinone using solid lipid nanoparticle for brain targeted drug delivery: physicochemical characterization, pharmacokinetics and bio-distribution studies. I J P C Res. 2016;8(12):1616-1624.
41. Odeh F, Ismail SI, Abu-Dahab R, Mahmoud IS, Al Bawab A. Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. Drug Delivery. 2012;19(8):371-7.

42. Singh A, Ahmad I, Akhter S, Jain GK, Iqbal Z, Talegaonkar S ve ark. Nanocarrier based formulation of thymoquinone improves oral delivery: stability assessment, in vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces: B Biointerfaces*. 2013;102:822-32.
43. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B ve Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica*. 2008; 74:1560-1569.
44. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res*. 1998;18: 1527-32
45. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Shneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *IJBCB*. 2006;38:1249-1253.
46. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2004;63:901-910.
47. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM ve ark. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res*. 2001;7(4):861-867.
48. Costa C, Soares R, Reis-Filho J, Leitão D, Amendoeira I ve Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J. Clin. Pathol*. 2002;55(6):429-434.
49. Santos CI, Costa-Pereira AP. Signal transducers and activators of transcription-from cytokine signalling to cancer biology. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1816(1):38-49.
50. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC ve Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol. Lett*. 2006;106(1): 72-81.
51. Boudiaf K, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Marie JC, Derradji Y, Benboubetra M ve ark. Thymoquinone strongly inhibits fMLF induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo. *Biochem. Pharmacol*. 2016;104:63-73.
52. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K ve ark. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-839.
53. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y ve ark. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;7(7):1789-96.
54. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:647-652.

55. Frelon S, Douki T, Favier A, Cadet J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol* 2003;16:191-197.
56. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2004;19(5):431-436.
57. Kanter M. Effects of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochem. Res*. 2008;33(1):87-96.
58. Khanna T, Zaidi FA, Dandiya PC. CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia*. 1993;5:407-410.
59. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO, Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1997;75(12): 1356-1361.
60. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J. Ethnopharmacol*. 1999;67(2):135-142.
61. Lei X, Lv X, Liu M, Yang Z, Ji M, Guo X ve ark. Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012;417(2):864-868.
62. Paramasivam A, Sambantham S, Shabnam J, Raghunandhakumar S, Anandan B, Rajiv R ve ark. Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP. *Toxicol. Lett*. 2012; 213(2): 151-159.
63. Galli-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A ve ark. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int. J. Oncol*. 2004; 25(4): 857-866.
64. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, Maitichoudhury S ve ark. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and disogenin in squamous cell carcinoma. 2012;7(10):e46641.
65. Giudice A, and Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays* 2006; 28: 169-181.
66. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*. 2006;5:14.
67. Singh A, Ahmad I, Akhter S, Ahmad MZ, I. Khan Z, J. Ahmad F. Thymoquinone: major molecular target, prominent pharmacological action and drug delivery concern. *Current Bioactive Compounds*. 2012;8(4):334-344.

68. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 2000;14: 323-328.
69. Sankaranarayanan C, Pari L. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β -cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chem. Biol. Interact.* 2011; 190(2-3):148-154.
70. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem. Toxicol.* 2003;26(2):87-98.
71. Nagi MN, Almakki HA, Sayed-Ahmed MM, Al-Bekairi AM. Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48:2361-2365.
72. Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA, Hafez MM. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2010;3(4):254-261.
73. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother. Res.* 2009;23(9):1295-1298.
74. Erboga M, Kanter M, Aktas C, Sener U, Erboga ZF, Donmez YB, Gurel A. Thymoquinone ameliorates cadmium-induced nephrotoxicity, apoptosis, and oxidative stress in rats is based on its anti-apoptotic and anti-oxidant properties. *Biol. Trace. Elem. Res.* 2016;170:165-172.
75. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H ve ark. *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World Journal of Gastroenterology.* 2008;14(33):5204-9.
76. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 1998;95:23-29.
77. Khalife KH, Lupidi G. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free Radical Research.* 2007;41(2):153-61.
78. Sayed-Ahmed MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007;34(5-6):399-405.
79. Harzallah HJ, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chem.* 2011;129(4):1469-1474.
80. Agrawal R, Kharya MD, Shrivastava R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol.* 1979;17(11):1264-1265.

81. Rifaioğlu MM, Nacar A, Yuksel R, Yonden Z, Karcioglu M, Zorba OU, ve ark. Antioxidative and anti-inflammatory effect of thymoquinone in an acute *Pseudomonas prostatitis* rat model. *Urologia Internationalis*. 2013;91(4): 474-81.
82. Piras A, Rosa A, Marongiu B, Porcedda S, Falconieri D, Dessi MA ve ark. Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*. 2013;46:317–323.
83. Mahmoud H, Sepahvand A, Jahanbakhsh S, Ezatpour B, Ayatollahi Mousavi SA. Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. *Journal de Mycologie Médicale*. 2014;24(4):e155-61.
84. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7908-7916.
85. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med*. 1995;61(1):33-36.
86. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F ve ark. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum* 2003;39:440-445.
87. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett*. 2003;143:133-143.
88. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytother Res*. 2007;21:895-897.
89. Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *J. Cell Biochem*. 2011;112:107-117.
90. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*. 2006;6(7):1135-42.
91. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1760(7):1088-95.
92. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. *Current Eye Research*. 2011;36(7):591-8.

93. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N ve Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*. 2004;15(4): 389-399.
94. Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying X Z ve ark. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol. Rep*. 2013;29(2):571-578.
95. Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *IUBMB Life*. 1999;47:153-159.
96. El-Dakhakhny M. Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. Sativa* L. seeds. *Planta Medica*. 1963;11:465-470.
97. Al-Gharably NM, Badary O, Nagi M ve ark. Protective effect of thymoquinone against carbon tetra-chloride-induced hepatotoxicity in mice. *Res Comm Pharmacol Toxicol*. 1997;2:41-50.
98. Al-Malki AL, Sayed AAR. Thymoquinone attenuates cisplatin- induced hapatotoxicity via nuclear factor κ pp- β . *BMC Complement. Altern. Med*. 2014;14:282.
99. Al-Naqeep G, Ismail M, Allaudin Z. Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by thymoquinone in Hep G2 cells. *Journal of Nutrigenetics and nutrigenomics*. 2009;2(45):163-72.
100. Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog*. 1993;31:96-100.
101. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *J Vet Med A*. 2001;48:593-599.
102. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. 2005;79(3):219-23.
103. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*. 2009;85(23-26):830-4.
104. Al Wafai RJ. *Nigella sativa* and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas*. 2013;42(5):841-9.
105. Al-Sa'aidi JAA, Dawood KA, Latif AD. Immunodulatory effect of *Nigella sativa* seed extract in male rabbits treated with dexamethasone. *IJV Scien*. 2012;26:141-149.

106. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar K ve ark. *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocyte activity. *Immunopharmacology*. 1995;30:147-155.
107. Bai T, Yang Y, Wu YL, Jiang S, Lee JJ, Lian LH ve ark. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice. *International Immunopharmacology*. 2014;19(2):351-357.
108. Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol*. 2008;25(1):84-88.
109. Sayed MM, Hassanein KM, Senosy W. Protective effects of thymoquinone and L-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Tox Reports*. 204;1:612-620.
110. El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Pharm Belg*. 1998;53(2):87-93.
111. Bayrak O, Bavbek N, Karatas OF, Bayrak R, Catal F, Cimentepe E, Akbas A, Yildirim E, Unal D, Akcay A. *Nigella sativa* protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2008;23:2206-2212.
112. Shakeri F, Gholamnezhad Z, Megarbane B, Rezaee R, Boskabady MH. Gastrointestinal effects of *Nigella sativa* and its main constituent, thymoquinone: a review. *Avicenna J Phytomed*. 2016;6&1):9-20.
113. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002;79:1-11
114. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (*Nigella sativa*) and its constituent, thymoquinone. *Journal of Pharmacocuncture*. 2017;20(2):107-111.
115. Ahmad S, Beg ZH. Elucidation of mechanisms of actions of thymoquinone-enriched methanolic and volatile oil extracts from *Nigella sativa* against cardiovascular risk parameters in experimental hyperlipidemia. *Lipids Health Dis*. 2013;12:86.
116. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001;104(22):2746-2753.
117. Leong X-F, Rais Mustafa M, Jaarin K. *Nigella sativa* and its protective role in oxidative stress and hypertension. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;1-9.
118. Salama RHM. Clinical and Therapeutic Trials of *Nigella sativa*. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2010;9(5):513-522.

119. Ragheb A, Elbarbry F, Prasad K, Mohamed A, Ahmed MS, Shoker A. Attenuation of the development of hypercholesterolemic atherosclerosis by thymoquinone. *Int J Angiol.* 2008;17(4):186-192.
120. El-Tahir KEH, Ashour MMS, Al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen Pharmacol.* 1993;24:1115-1122.
121. Uz E, Uz B, Selcoki Y, Reyhan B, Kaya A, Faruk TH ve ark. Cardioprotective effects of *Nigella sativa* oil on cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2008;103(6):574-80.
122. Kanter M, Coskun O, Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arch Toxicol.* 2006;80:217-224.
123. Alhebshi AH, Odawara A, Gotoh M, Suzuki I. Thymoquinone protect cultured hippocampal and human induced pluripotent stem cells-derived neurons against α -synuclein-induced synapse damage. *Neuroscience Letters.* 2014;570: 126–131.
124. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine.* 2004;11: 56-64.
125. Gilhotra N, Dhingra D. Thymoquinone produced an anxiety-like effects in mice through modulation of GABA and NO levels. *Pharmacological Reports.* 2011;63:660–69.
126. Isik AF, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery.* 2005;28(2):301–305.
127. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J Nutr.* 1997;127:962S-965S.
128. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(9):729-740.
129. Bakarati EMF, El Wakeel LM, Hagag RS. Effects of *Nigella sativa* on outcome of hepatitis C in Egypt. *World J Gastroenterol.* 2013;19(16):2529-2536.
130. Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine.* 2002;9: 69-74
131. Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Elmazar M. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Res.* 1998;44:56-61.
132. Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf H. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon

tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2001; 110(3-4): 239-252.

133. Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD₅₀ of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad.* 2008; 20(2):25-27.
134. Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer.* 2003;45(2):195-202.
135. AbuKhader MM, Khater SH, Al-Matubsi HY. Acute effects of thymoquinone on the pregnant rat and embryo-fetal development. *Drug and Chemical Toxicol.* 2013;36(1):27-34.
136. Aqel M, Shaheen R. Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. *Journal of Ethnopharmacology.* 1996;52(1):23-6.
137. Rosenberg B. In nucleic acid-metal ion interactions. Spiro TG, editor. Vol. 1. John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA. 1980;1-29.
138. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;42(3):317-325.
139. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer.* 1998;34(10):1522-1534.
140. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
141. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep.* 2003;10(6):1663-82.
142. Bancroft DP, Lepre CA, Lippard SJ. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans- diaminedichloroplatinum(II) binding to DAN. *J. Am. Chem. Soc.* 1990;112(19):6860-6871.
143. Johnson NP, Hoeschele JD, Rahn RO. Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans- dichlorodiamineplatinum(II) to DNA. *Chem Biol Intrac.* 1980;30:151-169.
144. Horáček P, Drobník J. Interaction of cis-dichlorodiammineplatinum (II) with DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1971;254:341-347
145. Sanderson BJ, Ferguson LR, Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutation Res.* 1996;355:59-70.
146. IARC, International Agency for Research on Cancer. Summaries and evaluation. 1987;2. [Erişim tarihi 30 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/cisplatin.html>.

147. Petrovic M, Todorovic D. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Medicine and Biology*. 2016;18(1):12-18.
148. Crom WR, Barnhart AMG, Rodman JH, Teresi ME, Kavanagh RE, Christensen ML ve ark. Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clinical Pharmacokinetics*. 1987;12:168-213.
149. O'dwyer PJ, Stevenson JP, Jhonson SW. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*. 2000;29(4):19-27.
150. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opinion Pharmacotherapy*. 2003;4(6):889-901
151. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M ve ark. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*. 2013;24(10):1007-19.
152. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer*. 1993;67(6):1171-1176
153. Farris FF, King FG, Dedrick RL, Litterst CL. Physiological model for the pharmacokinetics of cis-dichloroplatinum (II) (DDP) in the tumored rat. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharm*. 1985;13(1):13-39.
154. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Nat. Aca. Sci U.S.A*. 2002;99(22):14298-14302.
155. Anderson A, Fagerberg J, Lewensohn R, Ehrsson H. Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in human. *J Pharm Sci*. 1996;85(8):824-827.
156. Go RS1, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*. 1999;17(1):409-22.
157. Yen HC, Tang YC, Chen FY, Chen SW, Majima HJ. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1042:516-522.
158. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanism of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;1351-1371.
159. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2001;31(12):862-867.
160. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-359.

161. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007;96(9):2181-2196.
162. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997;414(3):552-556.
163. Shrivasta A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol. Cancer Ther.* 2011;10(7):1161-1172.
164. Aggarwall SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J. histochem. Cytochem.* 1993;41(7):1053-1073.
165. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997;91(4):443-446.
166. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000;57(8-9):1229-1235.
167. Bassett EA, Wang W, Rastinejad F, El-Deiry WS. Structural and functional basis for therapeutic modulation of p53 signaling. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(20):6376-6386.
168. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 1996;270:F700-F708.
169. Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1013-1023.
170. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17(25):3237-3245.
171. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995;14(22):5579-5588.
172. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* DOI:10.4061/2010/201367.
173. DeHaan RD, Yazlovitskaya EM, Persons DL. Regulation of p53 target gene expression by cisplatin-induced extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;48(5):383-388.
174. Cuadrado A, Lafarga V, Cheung PC, Dolado I, Lianos S, Cohen P, Nebreda AR. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 2007;26(8):2115-2126.
175. Jones EV, Dickman MJ, Whitmarsh AJ. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. J.* 2007;405:617-623.

176. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26(11):657-664.
177. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y ve ark. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.* 2000;60(21):5988-5994.
178. Wang ZH, Miao XP, Tan W, Zhang XR, Xu BH, Lin DX. Single nucleotide polymorphisms in XRCC1 and clinical response to platin-based chemotherapy in advanced non small cell lung cancer. *Ai Zheng.* 2004;23(8):865-868.
179. Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 1994;269(2):787-790.
180. Mello JA, Lippard S J, Essigmann JM. DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum (II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. 1995;34(45):14783-14791.
181. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology.* 2016;371:58-66.
182. Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF-alpha production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F812-9.
183. Nonnekens J, Hoeijmakers J. After surviving cancer, what about late life effects of the cure? *EMBO Molecular Medicine.* 2017;9(1):4-6.
184. Knoll C, Smith RJ, Shores C, Blatt J. Hearing genes and cisplatin deafness: a pilot study. *Laryngoscope.* 2006;116(1):72-74.
185. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer.* 2004;40:2445-2451.
186. Schaefer SD, Wright CG, Post JD, Frenkel EP. Cis-platinum vestibular toxicity. *Cancer.* 1981;47:857-859.
187. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol.* DOI:10.1155/2012/645460.
188. Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJ, van Zandwijk N, Schellens JH. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):918-924.
189. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* 2010;2490-2518.
190. Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RL, Schafer I, Hannigan EV. Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: A randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52(1):13-18.

191. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol*. 2005;148:107-121.
192. Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med*. 1978;65(2):307-314.
193. Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer*. 1999;83(6):866-869.
194. Liu M, Chien CC, Burne-Taney M, Molls RR, Racusen LC, Colvin RB, Rabb H. A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):765-774.
195. Vickers A, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney Slices of Human and Rat to Characterize Cisplatin-Induced Injury on Cellular Pathways and Morphology. *Toxicologic Pathology*. 2004;32(5):577-90.
196. Ozols RF, Young RC. High-dose cisplatin therapy in ovarian cancer. *Seminars in Oncology*. 1985;12:21-30.
197. Cersosimo RJ. Cisplatin neurotoxicity. *Cancer Treatment Reviews*. 1989;16(4):195-211.
198. Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJA ve ark. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *Journal of Clinical Oncology*. 1992;10(5):795-803.
199. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC. Cisplatin neuropathy. clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer*. 1984;54(7):1269-1275.
200. Roelofs RI, Hrushesky W, Rogin J, Rosenberg L. Peripheral sensory neuropathy and cisplatin chemotherapy. *Neurology*. 1984;34(7):937-938.
201. Von Hoff DD, Schilsky R, Reichert CM ve ark. Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man. *Cancer Treatment Reports*. 1979;63(9-10):1527-1531.
202. Bruck W, Heise E, Friede RL. Leukoencephalopathy after cisplatin therapy. *Clinical Neuropathology*. 1989;8(6):263-265.
203. Cattaneo MT, Filipazzi V, Piazza E, Damiani E, Mancarella G. Transient blindness and seizure associated with cisplatin therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1988;114(5):528-530.
204. Von Schlippe M, Fowler CJ, Harland SJ. Cisplatin neurotoxicity in the treatment of metastatic germcell tumour: time course and prognosis. *British Journal of Cancer*. 2001;85(6):823-826.
205. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicological Sciences*. 2006;89:515-523.

206. Işeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*. 2007;230(2-3):256-264.
207. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;532(3):290-293.
208. Liao Y, Lu X, Lu C, Li G, Jin Y, Tang H. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacological Res.* 2008;57:125-131.
209. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 8. Baskı, Cilt 1-2, Hacettepe- Taş Kitapçılık Ltd Şirketi, Ankara, 1998.
210. Keller GA, Ponte ML, Di Girolama G. Other drugs acting on nervous system associated with QT-interval prolongation. *Curr. Drug Saf.* 2010;5(1):105-111.
211. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Alesia AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitinedepleted rat model. *Pharmacol. Res.* 2006;53:278-286.
212. Ciftci O, Beytur A, Cakir O, Gurbuz N, Vardi N. Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platin-N-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;109:328-333.
213. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca S ve ark. Correlation of adverse effects of cisplatin administraction in patient affected by solid tumours: a retrospektive ealuation. *Oncology Reports.* 2013;29:1285-1292.
214. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*. Third edition, Humana Press, Totowa. 2005.
215. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg.* 2011;21(2):141-149.
216. Nicholson JW. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. The Royal Society of Chemistry, RSC Publishig, Cambridge. 2002.
217. Niles AL, Moravec RA, Hesselbeth PE ve ark. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry.* 2007;366(2):197-206.
218. R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition, John Wiley & Sons. 2005.
219. Jenkins N. *Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology* Totawa NJ, Humana Press. 2007.
220. Moharamzadeh K, Franklin KL, Brook IM, van Noort R. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. *J Periodontol.* 2009;80(5):769-75.

221. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
222. Hansen CH, Br  nner N. MTT-cell proliferation assay. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*. 2nd Ed. Academic Press. San Diego. 1998.
223. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol 2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-593.
224. Li Y, Huang W, Huang S, Du J, Huang C. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(1):85-90.
225. Ak  alı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının   nemi. *T  rk Onkoloji dergisi*. 2010;25(3):119-123.
226. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(4):315-9.
227. ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource center. [Erişim tarihi 27 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.lgcstandardatcc.org/Products/All/CCL-2.aspx?geo_country=tr.
228. Adey A, Burton JN, Kitzman JO, Hiatt JB, Lewis AP, Martin BK ve ark. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*. 2013;500(7461):207-11.
229. Gallion HH, Pieretti M, DePriest PD, van Nagell JR Jr. The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer*. 1995;76:1992-1997.
230. Schuijjer M and Berns EMJJ. TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):285-291.
231. Chan MM, Fong D. Overcoming ovarian cancer drug resistance with phytochemicals and other compounds. In: *Drug Resistance Neoplasms*. Varie EG (ed.). New York, Nova Science Publishers. 2007.
232. Sarkar FH, Li Y. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res*. 2006;66(7):3347-3350.
233. Hafiza WA, Latifah SY. Potential implications of GRP58 expression and susceptibility of cervical cancer to cisplatin and thymoquinone-based therapy. *Onco. Targets. Ther*. 2014;7:1375-1387.
234. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.
235. Khader M, Bresgen N, Eckl PM. In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food Chem. Toxicol*. 2009;47(1):129-133.

236. Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(6):1059-70.
237. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA ve ark. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: a miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(5):337-352.
238. Rahmani AH, Alzohairy MA, Khan MA, Aly SM. Therapeutic implications of black seed and its constituent thymoquinone in the prevention of cancer through inactivation and activation of molecular pathways. *Evid Based Complement Alternat Med.* DOI:10.1155/2014/724658.
239. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O ve ark. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869-1883.
240. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol. Res.* 2000;41(3):283-289.
241. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol.* 2003;22(1):107-113.
242. Ng WK, Yazan LS, Ismail M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHA cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicol in vitro.* 2011;25:1392-1398.
243. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl Med.* 2008;359(13):1367-1380.
244. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook James ve ark. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-Small Cell Lung Cancer. *NEJM.* 2002;346:92-98.
245. Klastersky J, Sculier JP, Bureau G, Libert P, Ravez P, Vandermoten G ve ark. Cisplatin versus cisplatin plus etoposide in treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1989;7(8):1087-1092.
246. Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:87.
247. Nessa MU, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. *Anticancer Res.* 2011;31(11):3789-3797.
248. Wilson AJ, Saskowski J, Barham W, Yull F, Khabele D. Thymoquinone enhances cisplatin-response through direct tumor effects in a syngeneic mouse model of ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2015;8:46.

8. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Songül YILMAZ

Doğum yeri ve tarihi: Hatay, 1981.

Uyruğu: T.C.

İletişim adresi: Yeşilpınar mah. Volkan sok. Öğretmen blokları B blok no.4
Alibeyköy/İstanbul

Yazışma adresi: biosongulyilmaz@gmail.com

Telefon: +902126508817

II. Eğitimi

Yılı	Derecesi	Üniversite	Öğrenim Alanı
2016-2018	Yüksek	Hacettepe Üniversitesi	Farmasötik Toksikoloji
2004	Lisans Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Biyoloji