

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

**SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD
KOMBİNASYONUNUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Ecz. Hediye Gamze Nur ÇELEBİOĞLU

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

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

**SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD
KOMBİNASYONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Hediye Gamze Nur ÇELEBİOĞLU

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ**

**ANKARA
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD KOMBİNASYONUNUN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Öğrenci: Hediye Gamze Nur Çelebioğlu

Danışman: Prof.Dr.Sevtap Aydın Dilsiz

Bu tez çalışması 26 Ocak 2022 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof.Dr.A. Nurşen BAŞARAN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof.Dr.Sevtap AYDIN DİLSİZ*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof.Dr.Ü. Pınar ERKEKOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof.Dr.Aylin ÜSTÜNDAĞ*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr.Gözde GİRGİN*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

01 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü 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.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

26 / 01 / 2021

Hediye Gamze Nur Çelebioğlu

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

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 zgn olduğunu, Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Hediye Gamze Nur elebioğlu

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığım dönem boyunca anlayış ile heyecanıma ortak olan, her konuda desteği ile beni yönlendiren, fikrimi destekleyerek çalışmalarımda beni cesaretlendiren danışman hocam Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e çok değerli emekleri için en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde değerli katkılarından dolayı Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen değerli aileme ve yüksek lisans yaptığım dönem boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili eşime teşekkür ederim.

ÖZET

Çelebioğlu, H.G.N. Serviks Kanserinde Timokinon ve Etoposid Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Serviks kanseri dünyada her iki dakikada bir kadının ölümüne neden olan ve kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür. Başlıca tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi yer alır. Bir topoizomeraz-II inhibitörü olan etoposid, akciğer kanseri, testis kanseri, akut miyelojenöz lösemi ve akut miyelomonositik lösemi, Hodgkin Lenfoması ve yüksek dereceli Hodgkin dışı lenfomalarda ve serviks kanserin tedavisinde etkili bir kemoterapötik ajandır. Araştırmalar, tedavi sonuçlarını iyileştirmek için yenilikçi ilaç stratejilerinin keşfine odaklanmaktadır. Alternatif ve tamamlayıcı tıpta bitkilerin kanser tedavisindeki olumlu etkileri ilgi odağı oluşturmuştur ve buna yönelik çalışmalar artmaya başlamıştır. Ülkemizde Ranunculacea (Düğünçiçeğigiller) familyasında yer alan ve “çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* türünden izole edilen timokinonun yapılan birçok çalışmada antikanserojenik, kardiyoprotektif, antiinflamatuvar, analjezik, antioksidan, bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Timokinonun serviks kanserinde etoposid ile birlikte etkinliğine dair çalışmalar yetersidir. Bu çalışmada serviks kanser hücre hattında (HeLa hücresi) timokinonla olan kombinasyonlarının etoposid sitotoksitesine etkisinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun hücre canlılığını 24 saatlik inkübasyon için 250 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında ve 48 saat inkübasyon için 125 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak anlamlı azaltmıştır ve IC₅₀ değeri sırasıyla 233,6 µM ve 145,5 µM bulunmuştur. HeLa hücrelerinde etoposide ait IC₅₀ değerleri 24 ve 48 saatlik maruziyette sırasıyla 167,3 µM ve 52,7 µM bulunmuştur. Timokinon etoposidin yaklaşık IC₅₀ değerini 24 saatlik inkübasyon için 15,63 µM ve üzeri dozlarında ve 48 saat inkübasyon için 31,5 µM ve üzeri dozlarında doz bağımlı olarak azaltmıştır. Sonuçlarımız timokinonun etoposidin kanser hücrelerinde sitotoksik etkisini arttırabileceğini göstermiştir; bu durum etopsidin antikanser etkisini arttırabileceğini düşündürmektedir, ancak bu konuda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olup yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Sitotoksosite, serviks kanseri, etoposid, timokinon, *Nigella sativa*

ABSTRACT

Celebioglu, H.G.N. Effects of Thymoquinone and Etoposide Combination on Cell Viability in Cervical Cancer. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2022. Cervical cancer is the second most common type of cancer in women, after breast cancer, that causes the death of a woman every two minutes in the world. Major treatment options include surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Etoposide, a topoisomerase-II inhibitor, is an effective chemotherapeutic agent in the treatment of lung cancer, testicular cancer, acute myelogenous leukemia and acute myelomonocytic leukemia, Hodgkin lymphoma and high-grade non-Hodgkin lymphoma, and cervical cancer. Research focuses on the discovery of innovative drug strategies to improve treatment outcomes. In alternative and complementary medicine, the positive effects of plants in cancer treatment have been the focus of attention and studies have begun to increase. In many studies, it has been suggested that thymoquinone, which is isolated from *Nigella sativa* species in the Ranunculaceae family known as "çörek otu", has anticarcinogenic, cardioprotective, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, immune system strengthening effects. Studies on the efficacy of thymoquinone together with etoposide in cervical cancer are insufficient. In this study, it was aimed to evaluate the effect of combinations with thymoquinone on etoposide cytotoxicity in cervical cancer cell line (HeLa cell) by MTT method. Compared to the negative control, thymoquinone significantly decreased cell viability in a dose-dependent manner at the concentrations of 250 μM and above for 24 hours incubation and 125 μM and above for 48 hours incubation, and the IC_{50} value were 233.6 μM and 145.5 μM , respectively, in HeLa cells. The IC_{50} values of etoposide in HeLa cells were 167.3 μM and 52.7 μM at 24 and 48 hours of exposure, respectively. Thymoquinone significantly decreased the approximate IC_{50} value of etoposide in doses of 15.63 μM and above for 24 hours incubation and 31.5 μM and above for 48 hours incubation in a dose-dependent manner. Our results showed that thymoquinone can increase the cytotoxic effect of etoposide in cancer cell, which suggests that etoposide may increase its anticancer effect, however comprehensive studies are needed on this subject. This study is a preliminary study and will contribute to the development of new treatment strategies.

Keywords: Cytotoxicity, cervical cancer, etoposide, thymoquinone, *Nigella sativa*

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	xvi
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Timokinon	4
2.1.1. Timokinonun Bulunuş Yeri ve Geleneksel Kullanımı	4
2.1.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri	5
2.1.3. Timokinonun Farmokokinetik Özellikleri	5
2.1.4. Timokinonun Farmakodinamik Özellikleri	5
2.1.5. Timokinonun Toksisitesi	17
2.1.6. Timokinonun Kanser Tedavisindeki Yeri	19
2.2. Etoposid	27
2.2.1. Etoposidin Fizikokimyasal Özellikleri	27
2.2.2. Etoposidin Farmakokinetik Özellikleri	27
2.2.3. Etoposidin Farmakodinamik Özellikleri	28
2.2.3. Etoposidin Toksisitesi	29
2.3. Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	33
2.4. İnsan Serviks Kanseri (HeLa Hücre Hattı) Özellikleri	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	38
3.3. Çalışma Çözeltileri	39

3.4. Hücrelerin Çoğaltılması	40
3.5. HeLa Kanser Hücresinde Timokinonun Etoposid Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	42
3.6. İstatistiksel Yöntemler	44
4. BULGULAR	45
4.1. HeLa Hücrelerinde Timokinonun Sitotoksitesinin Belirlenmesi	45
4.2. HeLa Hücrelerinde Etoposidin Sitotoksitesinin Belirlenmesi	50
4.3. HeLa Hücrelerinde Timokinonun Etoposid Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi	53
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER	80
EK-1: Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTAMALAR

7-AAD	Aminoaktinomisin
A	Aminoasit
Akt	Protein kinaz B
AKT	Protein kinaz B'nin alt türlerinden biri.
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	AMP ile aktive olan protein kinaz
ANOVA	Tek yönlü varyans alanizi
Anti-CD16	Ig süper ailesine ait bir tip 1 transmembran glikoproteini
Anti-CD2	Ig süper ailesine ait bir tip 1 transmembran glikoproteini
Anti-CD5	Ig süper ailesine ait bir tip 1 transmembran glikoproteini
Anti-CD56	Ig süper ailesine ait bir tip 1 transmembran glikoproteini
Anti-CD7	Ig süper ailesine ait bir tip 1 transmembran glikoproteini
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Eğri altında kalan alan
Aβ	Beta-amiloid
Bax	Bcl-2 regülatör protein ailesinin bir üyesi
Bcl-2	Apoptozu inhibe ederek veya indükleyerek hücre ölümünü düzenleyen Bcl-2 regülatör protein ailesinin kurucu üyesi
C4-2B	İnsan prostat kanser hücresi türü
CAM	Calcein-AM: kalsein asetoksimetil ester
CAT	Katalaz
Cmax	Maksimum plazma konsantrasyonu
COX	Siklooksijenaz
COX-2	Siklooksijenaz 2
CPK	Kreatin kinaz
CRA	<i>Chromium Release Assay</i>
CYP1A1	Sitokrom P450 A1
CYP1A2	Sitokrom P450 A2
CYP3A1	Sitokrom P450 A1

CYP3A4	Sitokrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNMT1	DNA metiltransferaz
DT	diaforaz kinin redüktaz
E2F-1	Yüksek ökaryotlarda bir transkripsiyon faktörleri (TF) ailesini kodlayan bir gen grubudur
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ETO	Etoposid
Eu3+	Europium
G	Glikoz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
GSTP1	Glutasyon S-transferaz P1
GSTT1	Glutasyon S-transferaz T1
HDAC	Histon deasetilaz
HDACi	HDAC inhibitörü
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma
HepG2	İnsan karaciğer kanser hücresi türü
HER-2/neu	Reseptör tirozin-protein kinaz erbB-2
HPV -CH2	Herpes simplex virüs metilen grubu
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon
IFN-γ	İnterferon gama
IgE	İmmunoglobulin E
IgG1	İmmunoglobulin G1
IL-13	İnterlökin 13
IL-1α	İnterlökin 1 α
IL-4	İnterlökin 4

IL-5	İnterlökin 5
IL-6	İnterlökin 6
iNOS	Nitrik oksit sentazlar
ip	Periton içi
iv	İntravenöz
JAM	<i>Jurkat Apoptosis Measurement</i>
KDM1B	Lisine özgü demetilaz 1B
KMT2A	Histon-lizin N-metiltransferaz 2A
LD₅₀	Popülasyonun % 50'sini öldüren doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
lncRNA	Genellikle proteine çevrilmeyen 200'den fazla nükleotid transkriptleri olarak tanımlanan bir RNA türü
LN35	İnsan akciğer kanser hücresi türü
LO	lipooksijenaz
LT	Lökotrien
LTB₄	Lökotrien B ₄
LTC₄	Lökotrien C ₄
mAb	Membrana bağlanan floresan monoklonal antikor
MAPK	mitojenle aktive edilen protein kinaz
MCF-7	İnsan kanser hücresi türü
MDA	Melanom farklılaşması ile ilişkili gen
MDA-MB-231	İnsan meme kanser hücre hattı türü
MDA-MB-435	İnsan meme kanser hücre hattı türü
miR34a	İnsanlarda MIR34A geni tarafından kodlanan bir MicroRNA
MMP	Matris metaloproteinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinyum
mRNA	Mesajcı RNA
MTD	Maksimum tolare edilen doz
MTG	MitoTracker Green
MTS	5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- (4-sülfofenil)

MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NF-κB	Nüklear faktör kappa beta
NOAEL	Yan etki gözlenmeyen doz
OVA	Ovalbümin
p21	Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
p53	Tümör protein 53
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz,
PC-3	Prostat kansei hücresi türü
PG	Prostaglandin
PI	Propidium iyodür
PI3K	Fosfoinositid 3 kinaz
PKH-2	Membrana bağlanan boya türü
PKH-26	Membrana bağlanan boya türü
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
Rac1	Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCC	Skvamöz hücreli karsinom
SIRT1	Sirtuin 1
SiHa	İnsan serviks skuamöz karsinom
SOD	Süperoksit dismutaz
SSAT	N-1-asetil-transferaz
SW-626	İnsan kolon kanser hücresi türü
TDL_o	En düşük toksik doz
Th2	İmmün sistemi düzenleyen T-yardımcı hücreler
TK	Timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon)
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TO-PRO-3	Floresan madde türü
Twist1	Twist transkripsiyon faktörü
UGT1A1	UDP-glukuronosiltransferaz 1
UHRF1	Ubikitin benzeri PHD ve RING parmaklarını içeren protein
VP-16	Vepesid

WST-1	4-[3-(4-Iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat
WST-8	2-(2-Metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H- tetrazolyum sodium tuzu
XTT	2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolyum-5- Carboksanilid

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Timokinonun kimyasal yapısı.	5
2.2. Timokinonun biyotransformasyonu	6
2.3. Türkiye’de en sık görülen 10 kanser, 100000 kişide, 2015.	22
2.4. Etoposid molekülünün kimyasal yapısı	27
2.5. HeLa hücresinin mikroskopik görünümü	37
2.6. Neubauer hücre sayım lamı	42
4.1 HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi	47
4.2 HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 48 saat maruziyette etkisi	49
4.3 HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 ve 48 saat maruziyette etkisi	49
4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine etoposidin 24 saat maruziyette etkisi	51
4.5. HeLa hücre canlılığı üzerine etoposidin 48 saat maruziyette etkisi	52
4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine etoposidin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi	53
4.7. HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) etoposid sitotoksitesine etkisi	56

TABLULAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Timokinonun antikanser aktivitesinde ileri sürülen mekanizmalar.	12
2.2.	Timokinon ve çörek otu yağının LD50 değerleri.	18
2.3.	Kadınlarda en sık görülen kanser türleri.	23
2.4.	Serviks kanser hücresinin özellikleri	36
4.1.	Timokinonun 24 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi	36
4.2.	Timokinonun 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi	48
4.3.	HeLa hücre canlılığı üzerine etoposidin 24 saat maruziyette etkisi	51
4.4.	Etoposidin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi	52
4.5.	HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 24 saat maruziyette etoposid sitotoksitesine etkisi	54
4.6.	HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 48 saat maruziyette etoposid sitotoksitesine etkisi.	55

1. GİRİŞ

Hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünüp, çoğalması ile ortaya çıkan kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında kompleks bir hastalıktır. Serviks kanseri, rahim ağzının yani uterusun vajinaya açılan boyun kısmının hastalığıdır. Serviks kanseri, dünyada kadınlarda meme ve kalın bağırsak kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür (1, 2). Ancak tarama testleri ile erken teşhis edilerek önlenildiği bilinmektedir (3).

Rahim ağzı kanseri herpes simplex virüs (HPV) ile ilişkili olup neredeyse tüm rahim ağzı kanserleri HPV enfeksiyonu (%99,7) nedeniyledir (2). Hastaların %70'inde HPV-16 ve HPV-18 pozitifdir. Bursal ve ark. leiomyosarkom olgusunda lenfadenektomi uygulanan hastaların hiçbirinde nodal hastalık bulunmadığını saptamışlardır (4). Malign lezyonlarda premalign lezyonlara kıyasla HER-2/neu'nun daha yüksek ekspresyonunun ve HER-2/neu onkoproteininin aşırı ekspresyonunun kötü prognoz, metastatik potansiyel ve agresif biyolojik davranış ile ilişkili olduğu bulunmuştur (5).

Serviks kanserinin yaklaşık %75'ini skuamöz hücreli karsinom (SCC), yaklaşık %25'ini ise adenokarsinom oluşturur (6). Serviks adenosarkomu, tipik olarak üreme çağında görülen iyi huylu epitelyal ve malign stromal bileşenleri olan başka bir nadir tümördür (7). Adenokarsinom insidansı tarama yöntemlerin yetersizliği nedeniyle son yıllarda artmıştır. Diğer daha az yaygın serviks kanserleri arasında nöroendokrin karsinom, küçük hücreli tümörler, camsı hücreli karsinomlar ve sarkomlar bulunur (8). Serviks kanserinin tedavisi radyasyon ve sisplatin bazlı kemoterapinin bir kombinasyonudur. Bununla birlikte, beş yıllık genel yaşama oranı %50 civarını aşmamaktadır (9).

Serviks kanseri tedavisinde tedavi etkinliğinin artırılması ve toksisitenin düşürülmesi amacıyla çoklu ilaç rejimleri tercih edilmektedir. Tekrarlayan rahim ağzı kanseri olan hastalarda sisplatin ile kombinasyon halinde oral etoposidin değerlendirildiği çok merkezli bir Japon çalışmasının uzun dönem takip sonuçları oral etoposid ve intravenöz sisplatin ile oluşan kombinasyon kemoterapisinin tekrarlayan rahim ağzı kanseri için etkili ve güvenli olduğunu göstermiştir (10).

Etoposid, Amerikan Mayapple'da bulunan bir toksin olan podofilotoksinden türetilmiştir. İlk olarak 1966'da sentezlenmiş ve 1983'te FDA tarafından kanser tedavisi için onaylanmıştır (11). Etoposid geniş bir tümör grubuna karşı önemli bir etkinlik gösterir. Etoposid, akciğer kanserine karşı diğer ajanlarla kombine edildiğinde etkili bulunmuştur ve küçük hücreli akciğer kanserinde kombinasyon tedaviye %90 yanıt oranları gözlenmiştir. Ayrıca etoposid diğer ajanlarla kombine edildiğinde testis kanseri hastalarında %80'lik yanıt oranları gözlemlenmiştir (12). Ayrıca etoposid, akut miyelojenöz lösemi ve akut miyelomonositik lösemi, Hodgkin Lenfoması ve yüksek dereceli Hodgkin dışı lenfomalarda da kullanılır (13).

Ranunculacea (Düğünçiçeğigiller) familyasının Ülkemizde “Çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* türünden izole edilen timokinonun antioksidan, antihiperlipidemik, antidiyabetik, antiinflamatuvar, hepatoprotektif gibi pek çok yararlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antikanserojenik, kardiyoprotektif (14), antitümöral (14), antiinflamatuvar ve analjezik (15), antioksidan (16), hipoglisemik (17), bağışıklık sistemini güçlendirici (18) etkilerinin olduğu gösterilmektedir. Çeşitli kanser türlerinde timokinonun birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmek üzere antiinflamatuvar ve antitümör aktiviteye sahip olabileceği bildirilmektedir (15). *In vitro* çalışmalarda timokinonun bazı kanser hücre büyümesini inhibe edebildiği ve apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (19, 20). Ayrıca timokinonun insan multipl miyelom hücrelerinde, proliferasyonu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği, F-aktin polimerizasyonunu ve Bcl-2/Bcl'i azattığı ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon-3 aktivasyonunun aktivatörünü baskılayarak kemosensitizasyon etkisi gösterilmiştir (21). Son çalışmalar, timokinonun histon asetilasyonunu ve deasetilasyonu değiştirmesi gibi epigenetik mekanizmaları modüle edebileceğini göstermiştir. Ayrıca, timokinon, hücrel epigenetiğin anahtar parçaları olan miRNA ve lncRNA gibi kodlayıcı olmayan çeşitli RNA'ların genetik ekspresyonunu değiştirebilir (22).

Bazı tümör baskılayıcı genlerin ve proteinlerin (p53, PTEN, p21, p27, BRCA1) timokinon tarafından aşırı eksprese edildiği veya aktive edildiği bulunmuştur. Ayrıca bazı onkogenik sinyal molekülleri ve yolları, fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)/Akt ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK)/ERK'nin, timokinon tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (23, 24, 25). Nanopartiküllerle formüle edilen timokinonun

etkileri özellikle meme kanseri hücre hattında miR34a ekspresyonunu arttırmasının yanı sıra, Rac1 ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla sitoskeletal aktin polimerizasyonunun aşağı yönlü regülasyonundan kaynaklanabilecek güçlü bir antimigratör etkisinin olduğu gösterilmiştir (26).

Araştırmaların, kemoterapide tedavi sonuçlarını iyileştirmek için yenilikçi ilaç stratejilerinin keşfine odaklanması gerektiği görülmektedir (27, 1). Alternatif ve tamamlayıcı tıpta bitkilerin kanser tedavisindeki olumlu etkileri ilgi odağı oluşturmuştur ve buna yönelik çalışmalar artmaya başlamıştır. Bazı bitkilerle yapılan çalışmalar umut vaat etmektedir. Etoposid ile tedavi edilmiş sıçanlarda *Zingiber Officinale* yağının oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine modülatör etkisinin araştırıldığı bir çalışma ise, *Zingiber Officinale* nin etoposid kaynaklı genotoksisiteyi ve oksidatif stresi azalttığı için bitkisel bir ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği belirtilmektedir (28).

Timokinonun serviks kanserinde etoposid ile birlikte etkinliğine dair çalışmalar oldukça yetersizdir. Çalışmamızda serviks kanser hücre hattında (HeLa hücresi) timokinonla olan kombinasyonlarının etoposid sitotoksitesine etkisinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmış ve etoposidin antikanser etkisini timokinonun nasıl etkileyeceğine açıklık getireceği hedeflenmektedir. Bu çalışma yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine ve bilime önemli katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Timokinon

2.1.1. Timokinonun Bulunuş Yeri ve Geleneksel Kullanımı

Ranunculacea (düğünçiçeğigiller) familyasında yer alan *Nigella sativa L.* (çörek otu) bitkisi Güney Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika'da yetiştirilen çiçekli yıllık bir bitkidir (29, 30, 31).

Çörek otu bitkisinin yaprakları doğrusal mızrak şekillidir. 5-10 petalden oluşan çiçekleri genellikle beyaz, pembe, sarı ve mor renklindedir. Bitkinin meyveleri kapsüllü olup her biri birçok tohum içerir. Tohumları siyah renkli olup yassı, oval dikdörtgen, köşeli ve huni biçimindedirler. Tohumların uzunluğu 0,2 cm ve genişliği 0,1 cm civasındadır. Ülkemizdeki tarımı ve ticareti yapılan çörek otu türü *Nigella sativa L.* olup çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilmektedir (29, 30).

Çörek otu tohumu sıklıkla gıda olarak tüketilmektedir. Gıdalarda yiyecek koruyucu ve baharat olarak kullanılmaktadır. Asya, Afrika, Orta Doğu'da çörek otu tohumu ve yağı uzun yıllar çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmıştır. Kusmanın önlenmesinde çörek otu tohumların kavruarak dahilen verildiği ve çörek otu yağının antiseptik olarak haricen kullanıldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte geleneksel olarak çörek otu tohumundan elde edilen tentürün ishal, dismenore, iştah kaybı, amenore, parazit ve deri döküntüsünün tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. (29, 30, 14, 32).

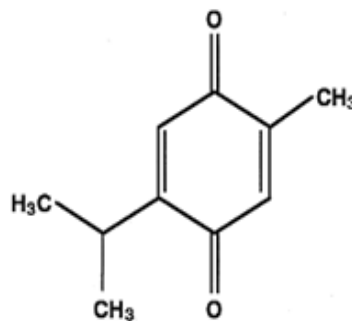
Çörek otu tohumunun halk arasında astım, öksürük, bronşit, romatizma, dispepsi, ishal, dizanteri, ateş, ağrı, şişkinlik, sarılık, paralizi, basur ve diğer rahatsızlıklarda geleneksel olarak kullanıldığı bildirilmektedir ve kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık, karaciğer, böbrek ve solunum sistemi problemlerini düzeltebileceği ve geleneksel tıbbi kullanımında faydalı olabileceği düşünülmektedir (29, 30, 33).

2.1.2. Timokinonun Fizikokimyasal Özellikleri

Timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon), çörek otu tohumu uçucu yağının ana biyolojik aktif bileşenidir. Moleküler ağırlığı 164,20 g/mol'dür. Timokinon oranı çörek otu tohumu uçucu yağının %18,4-24 arasında değişir. Çörek otu tohumunun farmakolojik etkilerinden özellikle timokinon sorumludur. Enol ve keto (~%90) form dahil tautomerik formlarda bulunur. Keto formu bileşiğin farmakolojik özelliklerinden sorumludur (29, 33).

Timokinon hidrofobik bir moleküldür. Timokinon etanol, dimetil sülfoksit ve dimetil formamid gibi organik çözücülerde çözünür. Timokinonun etanol ve dimetil formamid içindeki çözünürlüğü yaklaşık 16 mg/ml ve dimetil sülfoksit içindeki çözünürlüğü ise yaklaşık 14 mg/ml'dir. Timokinon sulu tamponlarda az çözünür (29, 33).

Timokinon ışığa karşı yüksek hassasiyete sahiptir ve ışığa maruziyette parçalanır. Timokinonun artan pH'larda stabilitesi düşer; asidik pH'da ise düşük degradasyon görülür (29, 33).



Şekil 2.1. Timokinonun kimyasal yapısı (29, 34).

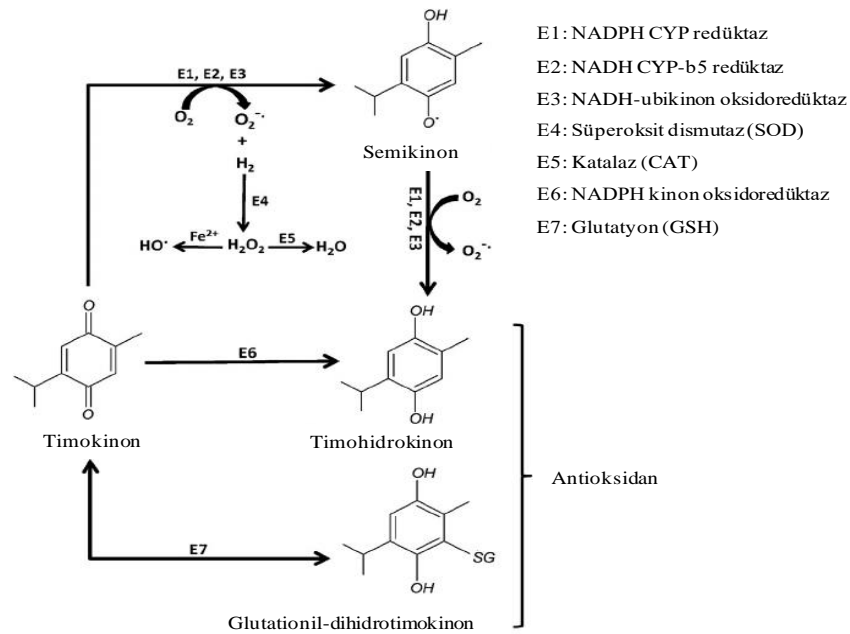
2.1.3. Timokinonun Farmokinetik Özellikleri

Timokinonun farmakokinetik özelliklerine dair çalışmalar yeterli değildir. Timokinonun hidrofobik özelliği ve stabilitesinin düşük olması ilaç formülasyonlarının sınırlandırılmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda katı lipid nanopartiküller, timokinon-yüklü liposomlar, timokinon-yüklü nano-yapılı lipid taşıyıcılar gibi biyoyararlanım ve aktiviteleri arttırılmış timokinonun yeni analogları sentezlenmektedir. Bu yapılar üzerine çalışmalar önem kazanmaktadır (29, 35, 33).

Timokinonun intravenöz (iv), periton içi (ip) ve oral yol dahil farklı uygulamalarının yer aldığı farmakokinetik çalışmalar yapılmıştır. Timokinonun tavşanlarda iv ve oral uygulama ile farmakokinetik özelliklerinin incelendiği çalışmada timokinonun iv uygulamayı takiben toplam klerensinin 7,19 ml/kg/dk ve dağılım hacminin (V_{ss})700,9 ml/kg olduğu tespit edilmiştir. Oral uygulama sonrası ise klerens değerinin 12,30 ml/dk/kg ve V_{ss} 'nin 5109,46 ml/kg olduğu ve yarı ömrünün ($t_{1/2}$) yaklaşık 274 dk olduğu belirlenmiştir. Timokinon iv 5 mg/kg uygulamada plazma konsantrasyonu linear kinetik sergilemiştir. Oral uygulamada eliminasyonu incelendiğinde yavaş absorbe olduğu ve mutlak biyoyararlanımının düşük olduğu bulunmuştur. Mutlak biyoyararlanım yaklaşık %58 olarak bildirilmiştir. Timokinonun oral uygulamadan sonra yavaş absorpsiyon ve hızlı eliminasyon gösteren bir bileşik olduğu sonucuna varılmıştır (29, 33, 36).

Timokinon-protein bağlanma oranı tavşanlarda %99,19, insanlarda 98,99 olarak tahmin edilmektedir (29, 36).

Oral yolla alınan timokinon karaciğerde karaciğer enzimleri (DT-diaforaz (kinin redüktaz) ile metabolize edilerek hidrokinona indirgenir, hidrokinon konjüge edilir ve daha sonra merkaptürik asite dönüştürülerek idrarla atılır (Şekil 2.2) (29, 33).



Şekil 2.2. Timokinonun biyotransformasyonu.

2.1.4. Timokinonun Farmakodinamik Özellikleri

Timokinonun etki mekanizması karmaşıktır. Yapılan çalışmalarda timokinonun birden fazla hedefi olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.1). (29, 14) Başlıca etkileri hücre döngüsü ve çoğalması, anjiyojenez, apoptoz, migrasyon, invazyon ve metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir (29).

Hücre döngü ve apoptoz üzerine etkisi

Timokinon hücre döngüsünü kontrol eden ve hücre çoğalmasını düzenleyen gen proteinlerin ifadesini ve/veya aktivitesini değiştirebilmektedir. Timokinonun, hücre döngüsünün farklı noktalarında (G0/G1, G1/S G2/M) kanser hücrelerini öldürme yeteneklerine sahip olduğu bildirilmiştir (29, 33, 37, 38).

Timokinon apoptotik ve antiapoptotik faktörleri ve kaspaz yollarını düzenlererek kanserin baskılanmasında önemli rol oynayabilir (29, 38, 23, 39, 40).

Antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri

Timokinonun antioksidan özelliklerinde demir ilişkili lipid peroksidasyonunu engellemesi, toplam tiyol bileşen ve GSH düzeyini yükseltmesi, radikal süpürücü olması, karaciğer CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitesini engellemesi, iNOS ekspresyonunu engellemesi, kinon redüktaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon transferaz enzim işlevlerini arttırması ve hepatositlerde lipojenezi engellemesi başlıca sorumlu mekanizmalardır (29, 32).

Timokinon konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan veya prooksidan özellik göstermektedir. Timokinonun düşük konsantrasyonlarında antioksidan olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarında prooksidan olarak etki gösterdiği bildirilmiştir. ROS üretiminin bir sonucu olarak apoptoz oluşabilir. Timokinonun apoptotik hücre ölüm mekanizmasında, kendisinin oksidan özelliğinin neden olabileceği ileri sürülmektedir (29, 41).

Timokinon ve benzeri semikinon radikallerinin kanser hücrelerinde ROS oluşumuna neden olarak apoptozu indükleyebildiği ileri sürülmektedir (29, 42).

Timokinona bağlı ROS oluşumu hücre canlılığının devamlılığı sağlayan

genlerin düşük ekspresyonuna, proapoptotik proteinlerde yapısal değişikliklere, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu ile mitokondriyal membran potansiyel kaybına, PARP parçalanmasına ve kaspaz bağımlı apoptoza neden olabileceği düşünülmektedir (29, 43).

Tümörün büyümesinde oksijen ve besin sağlamada anjiyojenez önemlidir. Timokinonun antianjiyojenik etkisi gösterilmiştir. Anjiyojenezde endotel hücre göçü önemli bir aşamadır ve timokinon insan umbilikal damar endotel hücre göçünü, yayılmasını ve tüp oluşumunu etkili bir biçimde engellemektedir. Ayrıca timokinon, damar endotel büyüme faktörünün selektif blokörü olup hücre çoğalması ve koloni oluşumunu engeller (29, 44).

Hücreler, inflamasyon ve oksidatif strese karşı gelişmiş bir koruyucu sisteme sahiptir. Çörek otunun antioksidan etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir (29, 45).

Timokinonun çeşitli mekanizmalar ile güçlü bir antioksidan özellik sergiler. Timokinon, süper oksit anyonu, hidroksil radikali ve moleküler oksijen gibi birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü özelliğindedir. Timokinonun hücrel antioksidan savunmayı arttırarak ve sitoprotektif proteinleri aktive ederek ve/veya ekspresyonunu indükleyerek oksidatif stresi önlediği bildirilmektedir. Timokinonun konsantrasyon-bağımlı lipid peroksidasyonunu önlediği rapor edilmiştir (29, 33, 45 46).

Bazı hastalıklarda ROS düzeylerinin yükselmesinden kaynaklanan istenmeyen 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 subselüler kompartmanlara kolay geçebilmesi ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (29, 33).

Glutasyon molekülü karaciğerde yüksek düzeyde bulunan ve hücrel koruyucu mekanizmalarda önemli işlevlere sahip bir moleküldür. Gutasyonun tükenmesi oksidatif stresin artmasına, toplam tiyol bileşenin azalmasına, protein oksidasyonuna ve inaktivasyonuna, lipid peroksidasyonuna, kalsiyum homeostazının bozulmasına ve en nihayetinde hücre ölümüne neden olur. Timokinon uygulamasının malondialdehiti azalttığı, toplam tiyol bileşen ve glutasyon seviyesini arttırdığı ve dolayısı ile oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. Timokinon ile serbest radikallerin

azaltılması ile bu radikallerin DNA'ya saldırma olasılığını ve dolayısı ile kanser oluşum riskini düşürebileceği öne sürülmektedir. Karaciğer CYP1A1/A2 enzimlerinin reaktif genotoksik radikal bileşiklerin oluşumunda sorumlu olduğu bilinmektedir. Timokinonun, CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (29, 32).

Timokinonun, parazitlerin neden olduğu karaciğer hasarını azalttığı ve antiparaziter etkisinde timokinonun antioksidan özelliklerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (29, 47).

Timokinonun iskemi-reperfüzyonla oluşan karaciğer hasarını azaltabileceği ileri sürülmüştür. İskemi-reperfüzyonla CYP3A1 mRNA ekspresyonu, hem böbrek hem de karaciğer dokusunda önemli derecede indüklenmektedir. Timokinonun böbrek dokusunda CYP3A1 ve spermidin/spermin N-1-asetil-transferaz (SSAT) gen ekspresyonunu azaltarak iskemi-reperfüzyonla ile indüklenen hasara karşı koruyabileceği de gösterilmiştir (29, 48).

Sıçan hepatositlerinde timokinonun terbutilepoksit ile oluşan oksidatif strese karşı hücre-içi glutatyon düzeyini arttırarak ve piridin nükleotid oksidasyonunu önleyerek karaciğer hücre membran bütünlüğünü koruyabildiği bildirilmiştir (29, 49).

Timokinonun, indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu azalttığı ve glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz dahil antioksidan enzim düzeylerini arttırabildiği, ayrıca, NADH düzeyini düşürerek karaciğer hücrelerinde lipojenez inhibisyonuna yol açtığı ve oksidatif strese karşı etkisi gösterilmiştir (29, 50).

Timokinon oksidatif hasara karşı birden fazla hücre, doku ve organ üzerinde koruyucu etkilere sahiptir. Timokinonun sisplatin, doksorubusin, gentamisin, vankomisin ve civa klorürün neden olduğu böbrek toksisitesine, karbon tetraklorür, siklofosfamid, asetaminofen ve aflotoksin B1 ile indüklenen karaciğer hasarına ve siklofosfomid ve doksorubisinle oluşan kalp toksisitesine karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir. Timokinonun siklofosfamid, toluen ve bleomisinle oluşan akciğer hasarını düşürdüğü, benzopiren kaynaklı mide tümör oluşumlarını engellediği ve gentamisinle oluşan ototoksisiteyi önlediği ve bu etkieri ile timokinonun koruyucu etkilere sahip olduğu yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir (29, 33).

Timokinonun uzun süreli toluenle indüklenen nörodejenerasyonu

antiinflamatuvar ve antioksidan etki ile azaltabildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte sıçan beyin dokusunda radyasyonla oluşan oksidatif strese karşı çörek otu ve timokinonun antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (29, 51).

Antimikrobiyal etkisi

Timokinonun, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* dahil bazı bakteriyel suşlara karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği ve özellikle gram pozitif koklara karşı önemli bakterisidal aktivite gösterdiği gösterilmiştir. Ayrıca *Schistosoma mansoni* ile enfekte farelerde çörek otu yağı ve timokinonun antişistozomiazis etkisi bildirilmiştir (29, 52).

Timokinon *Mycobacterium tuberculosis*'a karşı antitüberkuloz aktivite gösterir. Ayrıca *Candida krusei*, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* ve patojenik dermatofit suşlara (*Trichopyton mentagrophytos*, *Microsporum canis* gibi) karşı antifungal aktiviteye de sahiptir (29, 53).

Antiinflamatuvar etkisi

Timokinonun antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Timokinonun antiinflamatuvar etkilerinde siklooksijenazı ve lipooksijenazı engellemesi, ROS oluşumunu ve sitokin üretimini azaltmasının sorumlu olduğu görülmektedir. İnflamasyon, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenmektedir. COX yolunda prostaglandinler (PG) sentezlenirken, LO yolunda ise lökotrienler (LT) sentezlenmektedir. Timokinon, hem COX hem de LO yollarını inhibe etmektedir; tromboksan B2 ve LTB4 olarak adlandırılan eikosanoid üretimi güçlü bir şekilde inhibe edilir. Timokinon, malondialdehit ve lipid peroksidasyon ürünlerini, NF-κB aktivitesini azaltarak sitokinlerin miktarını azaltır. Böylece inflamasyonu azaltır (29, 33, 54).

Yapılan çalışmalarda timokinonun antiinflamatuvar etkileri alerjik akciğer inflamasyonlu fare modelinde gösterilmiştir. Timokinonun akciğerdeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, Th2 sitokinleri ve akciğer eozinofilisini azaltarak inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, serumdaki artmış olan IgG1 ve ovalbümin (OVA) spesifik IgE düzeylerini düşürmüştür. Timokinonun bronkoalveoler lavaj sıvısında

IFN- γ üretimi yükselttiği ve IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimini azalttığı, LTC4 ve LTB4 üretimini ve 5-lipooksijenaz ekspresyonunu azaltarak hava yolundaki inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Timokinon uygulanmasının ayrıca IgE, histamin ve sitokinlerin seviyesini azalttığı gösterilmiştir (29, 55).

Kansere karşı etkisi

Timokinonun çeşitli kanser hücrelerinde farklı moleküler hedefleri düzenleyerek antikanser etkisi gösterebileceği ileri sürülmektedir. Kanserde oksidatif stres, nitrosatif stres ve inflamasyon oluşumlarının önemli oynadığı iyi bilinmektedir. Timokinon hem antioksidan ve antiinflamatuvar etki ile oksidatif stresi azaltır ve antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesinin korur hem de apoptozu indükleyerek hücreleri kanserden korur (29, 56, 18, 57).

Timokinonun ROS ile indüklenen oksidatif DNA hasarını engelleyerek kanser riskinin azaltabilir. Ancak, timokinonun superoksit anyon radikalleri oluşturması sonucu prooksidan özelliği ile DNA hasarına da yol açabilir. Timokinon zaman ve doz bağımlı olarak sitoplazmik vakuollerin oluşumuna neden olur. Sitotoksik maddelere maruz kalındığında hücreler kendilerini korumak üzere vakuollerdeki bu maddeleri uzaklaştırmak için girişimde bulunur. Timokinon lizozom membran geçirgenliğine ve lizozomal proteazların sızıntısına neden olarak apoptotik hücre ölümünü indükler (29, 56, 57).

Timokinonun, doksorubisin ve etoposid antikanser ilaçlarına dirençli insan kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi rapor edilmiştir (29, 14).

Timokinonun SW-626 kolon kanser hücrelerinde antitümör aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde doz-bağımlı timokinonun hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir ve antikanser aktiviteye sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Sağlıklı insan intestinal FHs74Int hücrelerine sitotoksik etki oluşturmadan bazı insan kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebildiği gösterilmiştir (29, 14).

Tablo 2.1. Timokinonun antikanser aktivitesinde ileri sürülen mekanizmalar.

Mekanizmalar	Etki
Timidinin inhibisyonu ile DNA sentezi hatası	Kanserli hücre çoğalmasının engellenmesi
E2F-1 proteini ve androjen reseptörlerin aşağı-regülasyonu	Kanser hücre apoptozu
Bcl-2 ve diğer anti-apoptotik genlerin aşağı-regülasyonu	Kanser hücre ölümü
Apoptotik gen (kaspaz-3,8,9 ve Bax) ifadesinin yukarı-regülasyonu	Kanser hücre apoptozu ve ölümü
AKT ve ekstraselüler sinyal düzenleyen kinazın aktivasyonunun önlenmesi	Kanser hücre ölümü
NF-kappa B aktivasyonunun inhibisyonu	Onkogen ekspresyonu ve kanser kontrolü
SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinin artması	Artmış antioksidan enzim aktivitesi ile kansere karşı hücreleri koruması
Tümör anjiojenez ve hücre invazyonunun inhibisyonu	Metastaz inhibisyonu
Kanserli hücrelerde alfa-hederin aracılı ROS üretimini artırması	Mitokondriyal fonksiyonların bozulması ve apoptoza neden olur
C-Jun NH(2)-terminal kinaz ve p38 mitojen-aktive protein kinaz yolağının aktivasyonu	Kanser hücrelerinin apoptozu

Antihistaminik etkisi

Timokinonun bazofil ve mast hücrelerinden salınan ve alerjik reaksiyonlardan sorumlu bir otakoid olan histamin üretimi ve/veya salınmasını inhibe edebileceği bildirilmiştir. Timokinonun histamin oluşumu indüklenen farelerde histamini düşürerek alerjik konjunktivitinin belirtilerini hafiflettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, timokinonun sıçanlarda histamin ve platelet aktive edici faktör salınımını inhibe ederek asetik asit ile oluşan koliti engellediği gösterilmiştir (29, 58, 59).

Hipolipidemik etkisi

Timokinonun antioksidan aktivitesi nedeniyle tavşanlarda yüksek kolesterolü diyet ile indüklenen hepatik oksidatif stresi azalttığı ve plazma kolesterol seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (29, 60).

Timokinonun kolesterol ile beslenen tavşanlarda ateroskleroz gelişiminde koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir ve timokinon hiperlipidemi ve ateroskleroz oluşumu önleyebileceği düşünülmektedir (29, 61).

Timokinon sıçanlarda 10mg/kg/gün tedavisi sonrası total trigliserid, total kolesterol ve böbreklerde lipid peroksidasyonu azalmıştır (29, 54).

Antidiyabetik etkisi

Timokinonun yapılan birçok *invivo* çalışmada antidiyabetik etkisi gösterilmiştir. Streptozosin ile indüklenen diyabetik hamsterlarda 30 gün boyunca 50 mg/kg/gün oral timokinonun verilmesinde hızlı kan glukoz artışını ve glikozlanmış hemoglobin seviyesini önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. Timokinonun bu etkisinin insülin etkisine doğrudan bağımlı olmadığı ve glukoneojenik enzimlerin sentezinin baskılanmasıyla glukoneojenezi azaltarak etki gösterdiği bildirilmiştir (29, 62).

Timokinonun (80 mg/kg) sıçanlarda oral yolla 6 hafta uygulanmasının plazma glukozunda önemli azalma ve insülin seviyesinde artma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (29, 63).

Timokinonun streptozosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda COX-2 enzimlerinin ekspresyonu, lipid peroksidasyonu ve MDA seviyelerindeki artışı engellediği ve pankreatik dokuda SOD seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (29, 64).

Kalp, karaciğer ve böbrek üzerine etkileri

Çörek otu yağının ve timokinon üzriene yapılan *vivo* çalışmalarda kalp, karaciğer, böbrek ve mide üzerine oluşmuş etkileri rapor edilmiştir. Farelerde çörek otu yağının siklosporin A'nın neden olduğu doku hasarını kalp ve böbrek dokusunda süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerini arttırarak ve MDA, nitrik oksit ve protein karbonil seviyelerini düşürerek azaltabildiği bildirilmiştir (29, 65).

Timokinonun karaciğerde koruyucu etkisi bazı çalışmalar ile bildirilmektedir. Timokinonun antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile çeşitli hasar verici maddelerin neden olduğu karaciğer toksisitesini azaltabileceği gösterilmiştir (29, 49, 66, 67).

Karbon tetraklorürle indükelen karaciğer hasarına karşı 100 mg/kg dozda timokinonun oral uygulanmasının önemli koruyucu etki gösterdiği, karaciğer dokusunda non-enzimatik lipid peroksidasyonunu engellediği ve oluşan toksisiteye karşı koruyucu olabileceği rapor edilmiştir (58, 66).

Timokinonun sıçan hepatositlerinde tert-butil hidroperoksit indüklenen hepatotoksisiteyi intraselüler glutasyon tükenmesini önleyerek, hücre membran bütünlüğünü koruyarak ve ALT ve AST'nin sızıntısını azaltarak önleyebildiği gösterilmiştir (29, 49).

Timokinon asetaminofenle indüklenen hepatotoksisiteyi farelerde daha az nitrat/nitrit oluşturarak ve nitrik oksit üretimini engelleyerek azaltmıştır (29, 67).

Timokinonun çeşitli patojenik durumlarda böbrek üzerinde koruyucu etkileri vardır. Timokinon oksidatif stresi ve inflamasyonunu azaltarak toksik maddelerin neden olabileceği böbrek hasarını azaltabileceği veya engelleyebileceği bildirilmektedir (29, 68, 69).

Timokinonun sıçanlarda mitokondriyel olayları düzenleyerek ve ATP üretimini arttırarak gentamisin ile indüklenen nefrotoksisiteyi azalttığı bildirilmiştir (29, 68).

Timokinonun vankomisin ile indüklenen böbrek hasarına karşı kan serum üre nitrojen, kreatinin ve MDA seviyelerini düşürerek ve böbrek dokusunda süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz enzim ktivitelerini yükselterek koruyucu etki gösterebileceği bildirilmiştir (29, 69).

Timokinonun süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitesini ve MDA seviyelerini düzenleyerek pyelonefritin neden olduğu oksidatif hasara karşı böbreği koruduğu bildirilmiştir (29, 70).

Mide bağırsak sistemi üzerine etkisi

Timokinonun mide-bağırsak sistemi üzerine koruyucu etkisinin olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Timokinon mide mukozasının asit-baz dengesini koruyarak mide lezyonlarını önleyebileceği ileri sürülmektedir. Timokinonun mide disfonksiyonu ve mide ülserlerinde GSH seviyelerini ve SOD aktivitesini arttırarak, MDA düzeyini ve MPO aktivitesini azaltarak antioksidan özelliğine bağlı koruyucu etkisi oluşturabileceği düşünülmektedir. Timokinonun midede proton pompası

(H⁺/K⁺- ATPaz) inhibisyonu gösterilmiştir. Timokinon, midede oksidatif hasarı azaltarak lipid peroksidasyonu engellediği ve glutatyon ve süperoksit dismutaz tükenmesini önlediği gösterilmiştir. Tüm bu mekanizmalar ile timokinon normal mide mukozal bariyer bütünlüğünde koruma sağlamaktadır (29, 45).

Sinir sistemi üzerine etkisi

Timokinonun sinir sistemi üzerine koruyucu etkileri bulunmaktadır. Timokinonun sıçan birincil hipokampal ve insan indüklenmiş pluripotent kök hücreden kaynak alan nöron hücrelerinde koruyucu etkileri gösterilmiştir (29).

Timokinonun MPP⁺ ve rotenon toksisitesinde kültüre edilmiş dopaminerjik TH immunoreaktif hücreleri koruduğu ve timokinonun antioksidan özelliklerinin bu durumda önemli rol oynadığı görülmüştür (29, 71).

Timokinonun diyabetik sıçanlarda norepinefrin ve dopamin seviyelerini azalttığı, serotonin seviyelerini yükselttiği, oksidatif stresi ve nöropatiyi engellediği gösterilmiştir (29, 72).

Alzheimer hastalığının patogeneğinde beta-amiloid (A β) peptidler önemli rol oynar. Timokinonun ROS üretimini baskılayarak A β ile indüklenen toksisiteye ve sinaptik fonksiyonların bozulmasına karşı koruyucu olabildiği bildirilmiştir (29).

Timokinon, GABAerjik ve nitrierjik modülasyon aracılığıyla anksiyolitik aktiviteye sahiptir. Strese maruz kalan farelerde 20 mg/kg dozda timokinonun, plazma nitrit düzeyinde azalma ve beyin GABA içeriğinin azalmasının engellenmesi ile anksiyolitik oluşturduğu ve timokinon antidepresan etkiler gösterebileceği bildirilmiştir (29).

Üreme sistemine üzerine etkisi

Timokinonun üreme sistemi üzerine koruyucu etkileri vardır. Akut bakteriyel prostatitte timokinon uygulanmasının artan MDA ve nitrik oksit seviyelerini düşürdüğü, süperoksit dismutaz ve ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini düzenlediği bildirilmiştir (29).

Timokinon, antioksidan ve antinflamatuvar etkisi ile kadmiyumla indüklenen serum testosteron düşüşünü azaltmıştır, testis glutatyon ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerini yükseltmiştir. Bununla birlikte, testiste yükselen MDA, nitrik oksit ve

kadmiyum iyon seviyeleri düşmüştür. Timokinon testis dokusunda kadmiyum ile indüklenen iNOS, TNF- α , COX-2 ve NF- κ B'nin ekspresyonunu azaltmıştır (29, 60).

Timokinonun kurşun ile indüklenen sıçan testis işlev inhibisyonuna karşı düzeltici etkileri gösterilmiştir. Timokinon, kurşun ile indüklenen testis steroidojenik ve spermatojenik işlev bozukluğunu önlemiştir. Timokinon, kurşun ile birlikte uygulandığı zaman düşük plazma seviyesini önemli derecede arttırmıştır ve kurşundan kaynaklanan epididimal sperm sayısını azaltmıştır (29, 73).

Antinosiseptif etkisi

Çörek otu ve timokinonun antinosiseptif etkiye sahip olabileceği ileri sürülmektedir. Çörek otu yağının oral uygulanması, farelerde nosiseptif uyarıların oluşturduğu ağrıya karşı baskılayıcı etki göstermiştir. Timokinonun doz-bağımlı antinosiseptif etkileri gösterilmiştir. Timokinonun santral mekanizmalar aracılığıyla antinosiseptif aktivite gösterebildiği ve timokinonun çörek otu yağının antinosiseptif etkisinde sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca timokinonun antinosiseptif etkisinde antiinflamatuvar etkisinin de rol olabileceği bildirilmiştir (29).

Solunum yolu üzerine etkisi

Çörek otu tohumları astım ve dispne dahil solunum yolu problemlerini düzeltici etkilere sahiptir. Timokinon sıçanlarda akut respiratuvar sendromu tedavisinde faydalı bulunmuştur (29, 74).

Timokinonun siklofosamid, toluen, bleomisin ile oluşabilen akciğer hasarını azaltabildiği gösterilmiştir. Timokinonun sıçanlarda bleomisinle oluşan ipulmoner fibrozu azalttığı, hava alveollerinde amfizemi, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, bronşiyol lenfoid hiperplastik hücre aktivasyonunu akciğer dokusunda NF- κ B yüksek ekspresyonunu engellediği ve GST ve süperoksit dismutaz enzim aktivitesini normal değerlere düzelttiği bildirilmiştir (29, 75).

Timokinon akciğerde alerjik yanıtta antiinflamatuvar etkisine bağlı koruyucu özellik gösterir. Bronşiyal astım, kronik hava yolu inflamasyonu ile karakterize bir hastalıktır ve lökotrienler astım patolojisinde rol oynayan etkili inflamatuvar mediyatörlerdir. Yapılan çalışmada timokinonun, lökotrien biyosentezinde ana enzim olan 5-lipoksijenaz ekspresyonunu inhibe ederek LT-B4 ve LT-C4 seviyelerini

düzenlendiği gösterilmiştir (29, 55).

Kemik metabolizması üzerine etkisi

Timokinonun, *in vivo* çalışmalarda kemik metabolizması, kemik oluşumu ve kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Timokinonun antiinflamatuvar mediatörlerin uyarılması ve proinflamatuvar mediyatörleri inhibe ederek kırık/kemik dokuda koruyucu etkilere sahip olabileceği öngörülmektedir (29, 76).

Femoral defektli hayvan modelinde timokinonun uzun süreli verilmesinde osteoklast sayısını azaltarak ve osteoblastik aktiviteyi artırarak kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Timokinon osteoblastlar için erken belirteç olan kemiğe spesifik alkalen fosfataz, osteoblast farklılaşma göstergesi osteokalsin ve osteopontin dahil osteoblastların olgunlaşması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu indüklemiştir. Timokinon ERK (*extracellular signal regulated kinase*) sinyal yolağının aktivasyonu ve kemik morfo genetik proteini-2 ekspresyonunun artışıyla hücre olgunlaşmasını etkilemiştir (29, 56).

Timokinonun (10 mg/kg) sıçanlarda sistemik uygulanmasının kemik oluşumunu hızlandırabileceği ileri sürülmüştür. Antioksidan etkisi ile kemik oluşumunu arttırabileceği öngörülmektedir. Timokinon, ROS üretimi ve kemik erimesine neden olan osteoklast aktivitesine ve osteoklast öncü maddelerinin farklılaşmasına neden olan proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 α , IL-6 ve TNF- α) seviyesini azaltmıştır (29, 33).

2.1.5. Timokinonun Toksisitesi

Akut toksisitesi

Timokinon toksisitesi üzerine yapılan *in vivo* çalışmalarda, toksik etkileri ancak çok yüksek dozlarında gösterilebilmiştir. Çörek otu tohumu ve yağının toksisitesi düşük kabul edilir (29, 33, 77).

Oral yol LD50 değeri timokinonun farelerde 2.4 mg/kg ve 870,9 mg/kg olarak ve sıçanlarda 794.3 mg/kg rapor edilmiştir. Yüksek dozda timokinonun akut uygulanması (2 g/kg ve 3 g/kg) hipoaktiviteye ve solunum zorluğuna neden olmuştur.

Akut uygulamada timokinon kaynaklı ölüm ilk 3 saat içinde meydana gelmiştir ve 24 saate kadar daha fazla ölüm gözlenmemiştir. 24 saat timokinon (2 veya 3 g/kg, oral yol) uygulamasından sonra akut tedaviyi takiben, hayatta kalan hayvanlarda kalp, karaciğer ve böbreklerde GSH düzeyi önemli ölçüde azalmıştır. Plazma ALT, LDH ve CPK aktiviteleri ve üre ve kreatinin plazma konsantrasyonları önemli ölçüde yükselmiştir. Sıçanlarda timokinonun 10-100 mg/kg dozlarda oral alımda akut toksik ve letal etkiler göstermediği bildirilmiştir (29, 78, 33).

Ayrıca uygulama yolu timokinonun toksisite sonuçlarını etkiler. Uygulama yoluna göre LD50 değeri değişmektedir. Buna göre timokinonun oral biyoyaralanımının düşük olduğu görülmektedir (29, 33, 78, 79, 80, 81).

Tablo 2.2. Timokinon ve çörek otu yağının LD50 değerleri

	Deney Hayvanı	Uygulama Yolu	LD50
Timokinon	Sıçan	oral	794,3 mg/kg
Timokinon	Fare	oral	870,9 mg/kg
Timokinon	Fare	oral	2,4 g/kg
Çörek otu yağı	Fare	oral	28,8 ml/kg
Çörek otu yağı	Fare	ip	2,06 mL/kg
Timokinon	Sıçan	ip	57,5 mg/kg
Timokinon	Sıçan	ip	10 mg/kg
Timokinon	Fare	ip	104,7 mg/kg
Timokinon	Fare	ip	90,3 mg/kg

Yüksek doz timokinonun vücutta biyotransformasyona uğraması esnasında oluşan reaktif oksijen radikalleri arttırabileceği, antioksidan enzimleri tüketebileceği ve oksidatif stres kaynaklı hücre hasarına neden olabileceği düşünülmektedir (29, 82).

Tekrarlı doz toksisitesi

Sıçanlarda üreme toksisitesi yönünden NOAEL (yan etki gözlenmeyen doz) değeri ip 15 mg/kg'dır (29, 83).

Maksimum tolare edilen doz (MTD) ip enjeksiyonda erkek sıçanlarda 22,5 mg/kg, dişi sıçanlarda 15 mg/kg, oral alımda erkek ve dişi sıçanlarda 250 mg/kg olarak bildirilmiştir (29, 33).

Timokinonun fareler üzerinde 90 günlük bir subkronik toksisite çalışması, içme suyunda 100, 200 ve 300 ppm'lik doz seviyeleri ile gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan ortalama günlük timokinon dozları 30, 60 ve 90 mg/kg/gündür. 90 günlük subkronik deneyde, timokinon farelere nispeten yüksek dozlarda uygulanmıştır. Timokinon doku GSH ve plazma biyokimyasal parametreleri dahil olmak üzere herhangi bir önemli toksisite göstermemiştir. Timokinon karaciğer, böbrek ve kalpte GSH seviyeleri üzerinde olumsuz bir etkisi göstermemiştir. Ayrıca farelerde anormal davranış veya toksisite oluşturmamıştır. Mevcut verilere dayanarak, timokinonun farelerde iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Timokinonun toksisitesi düşük kabul edilmiştir. Timokinonun akut toksisitesi çok düşüktür ve genellikle sitoprotektif dozun yaklaşık 12 katı dozlarda içme suyunda subkronik olarak verildiğinde iyi tolere edildiği sonucuna varılmıştır (84, 85).

Timokinonun anti-anjiojenik etkisi nedeniyle hamilelikte kullanımının sakıncalı olduğu ileri sürülmüştür. Uterus düz kas kasılmasını sıçan ve kobaylarda konsantrasyona bağımlı inhibe ettiği gösterilmiştir. Oral ve dermal maruziyetinde güvenliliğine dair bilgi olmadığından hamilelikte ve emzirme döneminde kullanımı sakıncalıdır (29, 86).

Timokinonun temas alerjen olduğu bildirilmektedir (29).

2.1.6. Timokinonun Kanser Tedavisindeki Yeri

Kanser, hücrelerin mutasyona uğrayarak yeterli derecede farklılaşmaksızın, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünmeleri ile kendini gösteren patolojik bir durumdur. Kanser esas olarak (%85-90) çevresel kanserojenler (kanser yapıcılar) sonucu ortaya çıkar. Kalıtımın rolü %10-15'i geçmemektedir. Çevresel kanserojenler kimyasal, fiziksel, hormonal ya da bazı enfeksiyon ajanları olabilir. Bunların listesi Fransa'da

Lyon şehrinde bulunan IARC kurumu tarafından her yıl güncellenmektedir (87).

Kanserli dokularda sadece kanser hücreleri bulunmaz, farklı birçok hücre ve doku tipi, kanser hücreleri ile bir aradadır. Böylece, kanser mikro-çevresi olarak tanımlanan, kanser hücrelerini çevreleyen ve normal hücrelerden oluşan oldukça kompleks doku tipi ortaya çıkar. Mikro çevrenin yapısında, kanser hücrelerinin yanı sıra, multipotensiyal stromal hücreler/ mezenşimal hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve immun hücreleri gibi normal genetik yapıya sahip stromal hücreler, ekstrasellüler matriks ve büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi sekresyon ürünleri yer alır. Kanser hücreleri ile mikroçevre arasındaki sıkı bir ilişki vardır, bu ilişki iki yönlüdür ve birbirlerini düzenler. Kanserli dokuların mikroçevresi kanserin başlama ve ilerleme aşamasında, tedaviye cevap oluşturmada ve metastaz gelişiminde önemli rol oynar (88).

Kanser gelişiminde rol oynayan genom değişiklikleri mutasyonlarla sınırlı olmayıp epigenetik değişiklikler de sorumludur. Bu konuda en çok çalışılan konu DNA'daki hiper veya hipo metilasyon olaylarıdır (87).

Hücreler, çevresel faktörlerin hücre DNA'nın işlevsel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak çoğalmaya başlarlar. Bu oluşum komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir. Anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile kanser hastalığı ortaya çıkar. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için tek başına kontrolsüz çoğalma yeterli olmayıp hücrenin invazyon ve metastaz gibi diğer kötü huylu özellikleri de kazanması gerekir (89, 90, 91).

Hücre siklusu kontrol noktalarında değişimler kanser gelişimine neden olabilir. Kanser gelişiminde tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptoz kritik önemli olaylardır. Hücre siklusunda yer alan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar, tümör baskılayıcı genler üzerindeki etkileri ile hücreleri büyüme ve çoğalmayı düzenler ya da hücrelerin ölümüne neden olur (87, 92).

DNA molekülündeki baz delesyonları, zincir kırıkları, inversiyon gibi mutasyon adı verilen yapısal değişiklikler sonucunda DNA'nın replikasyonu, genlerin transkripsiyonu ve translokasyonu veya aktivasyonunda değişiklikler meydana gelir. Yapı ve fonksiyondaki değişiklikler sonucu ekspresyonlarındaki ya da aktivitelerindeki düzenlemenin bozulmasıyla kanser oluşumunu kolaylaştıran bu

genlere onkogen adı verilir. Onkogenler genellikle mutasyon ya da başka nedenlerle yeni bir işlev veya aktivite kazanarak otozomal dominant etki gösterirler. Normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan ve hasara uğradıkları veya ortadan kalktıkları zaman hücrenin kontrolüz çoğalmasına neden olan ve otozomal resesiflik gösteren genlere de tümör süpressör genler denir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına neden olur (89, 90, 93, 94).

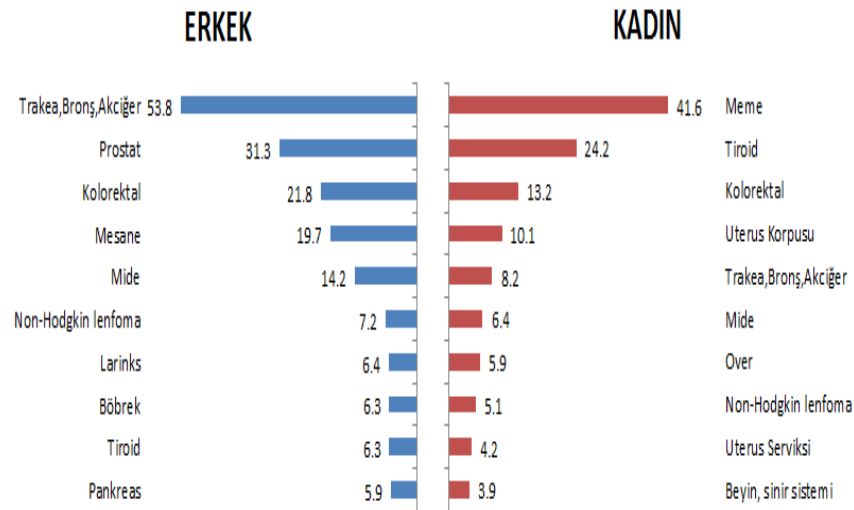
Hücre döngüsünde birçok kontrol noktası tanımlanmıştır. Bu kontrol noktaları, hücre döngüsünün bir sonraki aşamaya geçmeden önceki kontroldür. Bu noktalar hücre siklusunun ilerlemesini durdurabildiği gibi, gerekli olan durumlarda apoptozu da başlatabilir. Özellikle hücre siklusu kontrol noktalarında etkili olanlar Tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri hücre döngüsü esnasında ortaya çıkabilecek genetik hasarları engelleyebilir veya hasara uğrayan hücrelerin apoptozuna neden olarak kanserli hücrelerin ortaya çıkmasını önlerler (89, 91).

Kanserin toplumdaki yeri

Kanserin toplumdaki yeri coğrafi koşullar, cinsiyet, yaş, sosyoekonomik durum ve mesleki faaliyetlere bağlı değişmektedir (95).

Kanser sıklığı bölgelere, ülkelere hatta aynı ülkenin farklı yerleşim yerlerine göre değişmektedir. Bunun nedeninin kalıtım ya da çevresel risk etmenleri olabileceği düşünülmektedir (95).

Kanser sıklığı ve türleri cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir (Şekil 2.3). (95).



Şekil 2.3. Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser, 100.000 kişide, 2015.

Genel olarak kanser riski yaşla birlikte artmaktadır (95).

Sosyoekonomik düzeyi düşük olan bireyler kanserin temel riskleri daha fazla görülür. Bu bireyler yetersiz ve dengesiz beslendiklerinden dolayı enfeksiyonlara yatkındır. Bu enfeksiyonlar kanser oluşumuna yol açabilir. Ayrıca sosyoekonomik düzeyi düşük olan bireyler sağlık hizmetlerine daha az ulaşır ve bu nedenle kansere yakalanan bu bireylerin hastalıkları ilerler (95).

Kanser oluşumunda mesleki etmenlerin etkisi ilk olarak 1775 yılında Pott tarafından, baca temizleyiciliği ve skrotum kanseri ilişkisinden yola çıkarak ortaya atılmıştır. Yapıştırıcılar içindeki çözücüde bulunan benzen lösemiye, aşırı güneşte kalma (UV radyasyonu), açık havada çalışanlarda cilt kanserine, hepatitis B-C ile sağlık çalışanlarında karaciğer kanserine, asbest endüstrisi çalışanlarında mezotelyoma ve akciğer kanserine neden olmaktadır (95).

2012 yılında Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak yeni kanser vakalarının yirmi yılda %70 oranında artması beklenmektedir. 2015 yılında 8,8 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. 6 ölümden 1’i kanserden kaynaklanmaktadır. Kanserden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %70’inin düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu görülmüştür (95).

Dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türü meme olup, serviks kanseri

üçüncü sırada yer almaktadır (Tablo 2.3) (95).

Tablo 2.3. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri

DÜNYA	TÜRKİYE
1.Meme	1. Meme
2.Kolorektal	2. Tiroid
3.Serviks	3. Kolorektal
4.Akciğer	4. Uterus
5.Uterus	5. Akciğer
Globocan 2012	Kanser Daire Başkanlığı 2015 yılı verileri

Kanser tedavisinde timokinonun yeri

Birkaç çalışma, timokinonun farklı biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik yolları hedefleyerek kanserler de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (96, 15).

Timokinon, Bax / Bak gibi proapoptotik genleri ve proteinleri yukarı yönde regüle edebilir veya kaspaz yolunu modüle eder, ayrıca Bcl-2, Bcl-xL gibi antiapoptotik genleri ve proteinleri aşağı yönde regüle edebilir ve böylece kanser hücreleri büyümesini kontrol edebilir (97).

Ayrıca, timokinonun, p53, peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör (PPAR) γ , fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ve sinyal gibi diğer çeşitli moleküler hedeflerin aktivitesine ve ekspresyonuna ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 3 ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi müdahale ederek apoptoza neden olduğu da yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (97).

Bazı tümör baskılayıcı genlerin ve proteinlerin timokinon tarafından aşırı eksprese edildiği veya aktive edildiği bulunmuştur; örneğin p53, PTEN, p21, p27 ve meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (BRCA1). Ayrıca arasında fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) / Akt ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) gibi bazı onkojenik sinyal molekülleri ve yollarının / ERK, timokinon tarafından inhibe edildiği

bulunmuştur (15, 48, 24, 98, 25, 99).

Kanser hücresi büyümesini önlemeye ek olarak, timokinon farklı moleküler yolları hedefleyerek kanser hücresi metastazını kontrol etme potansiyeline sahiptir. Örneğin timokinon, fokal adezyon kinazını (FAK) aşağı regüle ederek ERK fosforilasyonunu ve matris metaloproteinaz (MMP) sekresyonunu azaltır (100).

Timokinonun antikanser aktivitesinin epigenetik mekanizması

Genetik ve epigenetik değişiklikler, kanserin ayırt edici özelliği olan anormal gen ekspresyonuna ve protein fonksiyonuna neden olur. Doğal bileşikler, kanser önleme ve tedavisinde mükemmel adaylardır, çünkü bilimsel araştırmalar, bu bileşiklerin, genetik veya epigenetik makinelere müdahale ederek genetik ifadeyi doğrudan veya dolaylı olarak hedefleyebileceğini ve düzenleyebileceğini göstermiştir (101).

Timokinon, umut verici bir antikanser molekülüdür çünkü histon asetilasyonu veya deasetilasyonu ve DNA metilasyonu veya demetilasyon gibi kanser hücrelerinin epigenetik özelliklerinin modülasyonu dahil olmak üzere karsinogenezde yer alan farklı hücre sinyal yollarını hedefleyebilir.

1. Histon asetilasyonu/deasetilasyonu

Timokinonun kanser hücrelerindeki toplam hücrel HDAC aktivitesini geliştirebileceği açıktır (102).

HDAC'ler genellikle MCF-7 meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve timokinon, histonların asetilasyonunu indükleyerek ve histonların deasetilasyonunu inhibe ederek apoptozu güçlü bir şekilde indükleyen bir HDAC inhibitörü (HDACi) olarak işlev görebilir. Ayrıca, timokinon HDAC hedef genlerini (p21 ve Maspin) yeniden aktive ederek Bax'ın (proapoptotik gen) yukarı yöndeki regülasyonunu ve Bcl-2'nin (antiapoptotik gen) aşağı yöndeki regülasyonunu indükler, böylece hücre döngüsünün fazını durdurur (39, 103).

Lu ve ark. Timokinonun, SIRT1'i aktive ettiğini ve kardiyomiyositlerde p53 asetilasyonunu baskıladığını bildirmişlerdir (104).

Velagapudi ve ark. timokinonun, AMPK ve SIRT1'in aktivasyonu yoluyla BV2 mikroglia içindeki nöroenflamasyonun aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir

(105).

Timokinonun hücrel ROS oluşumunu azalttığını ve SIRT1'in nükleer birikimini arttırdığını ve NAD⁺'ı arttırdığını göstermişlerdir. NAD⁺/SIRT1 ve AMPK'nın aktivasyonu muhtemelen FOXO3a gibi hedef proteinlerin deasetilasyona bağlı aktivasyonuna ve BV2 mikrogliya'sında nöroinflamasyonun inhibisyonuna katkıda bulunur (105).

2. DNA metilasyonu/demetilasyonu

Timokinon, DNA'daki metilasyon işleminin bir modülatörü olarak önerilmiştir ve ilginç bir şekilde, timokinon muhtemelen bir metilasyon ve bir metilasyon maddesi olarak işlev görebilir (22).

Birçok *in vitro* ve bazı *in vivo* çalışma, timokinonun, DNMT1'in enzimatik merkezini hedefleyerek ve bağlayarak ve/veya DNMT1 transkripsiyonunun bozulmasını indükleyerek epigenetik süreçlere müdahale edebileceğini göstermiştir (106, 107).

Timokinonun DNMT1'in katalitik bölgesine bağlandığı ve sonuçta DNA'nın metilasyonunun azalmasına neden olan Sp1-miR29b döngüsüne müdahale yoluyla aşağı regülasyonuna sağladığı kanıtlanmıştır (106, 107).

Pang ve ark. lösemi hücrelerini timokinona maruz bırakmış ve DNMT1 promotöründen Sp1– NF-complexB kompleks ayrışması yoluyla DNMT1'in aşağı regülasyonunun, koloni oluşumunda bir azalmaya ve kaspaz aktivasyonu ile hücrel apoptozun artmasına neden olduğunu bulmuşlardır. *In vivo* çalışma ayrıca, timokinon uygulamasının lösemi taşıyan farelerde lösemi regresyonunu indüklediğini ve akciğer ve karaciğerde metastazı inhibe ettiğini göstermiştir (107).

Timokinonun DNMT1 ile bağlanma ve ekspresyonunu baskılama yoluyla DNA'nın metilasyonunu indüklediklerini ve DNA hipometilasyonu ile hareket eden lösemi terapisinde yeni bir bileşik olarak timokinonun gösterildiğini öne sürmüşlerdir (107).

İlginç bir şekilde, Twist1 promotörünün metilasyonunun, bazı hücre hatlarında timokinon tedavisi ile arttırıldığı bulunmuştur ve timokinonun, Twist1'i epigenetik bir mekanizma ile (yani Twist1 promotörünün hipermetilasyonu) düşürme olasılığı vardır (108).

UHRF1 varsayılan bir onkojendir ve UHRF1'in yukarı regülasyonu, kanser hücrelerinin, hücre çoğalması sırasında promotör hipermetilasyonları yoluyla tümör baskılayıcı genlerin patolojik baskısını sürdürmelerine yardımcı olur. UHRF1, genellikle tümör baskılayıcı genlerin metillenmiş promotörlerini tanır ve bağlanır DNMT1 ile etkileşime girerek UHRF1 tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenler (40, 109).

Timokinonun, UHRF1 ekspresyonunu inhibe ettiği ve muhtemelen bu 'yanlış' epigenetik kodu, DNA demetilasyon işlemi yoluyla kanser hücrelerindeki epigenetik entegratör UHRF1'i hedefleyerek onarabildiği bulunmuştur. Ayrıca, timokinon, UHRF1'i hedefleyen p73'e bağlı mitokondriyal sinyal ve hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive eder (110).

Yakın tarihli bir çalışma, timokinonun DNMT1,3A, 3B, G9A, HDAC1,4,9, KDM1B, KMT2A, B, C, D, E ve UHRF1 gibi bazı önemli epigenetik proteinlerin ekspresyonunu Jurkat hücrelerinde azalttığını ve ayrıca MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde DNMT1, G9a ve HDAC1'in ekspresyonunu da azalttığını göstermiştir (111).

3. miRNA'ları düzenleme

Status epileptikus (SE) sıçanlarının hipokampal bölgesinde genellikle yüksek oranda eksprese edilen bir başka microRNA, miR146a, NF-κB aracılı inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonunda rol oynar ve timokinon tedavisinin miR146a ekspresyonunu aşağı regüle ettiği ve böylece NF-KB yoluna müdahale ederek inflamatuvar reaksiyonları sınırlandırabildiği bulunmuştur (112).

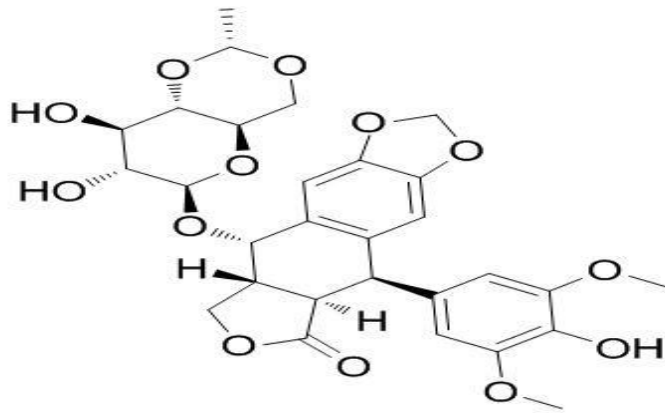
Başka bir çalışmada ise timokinon, nanopartiküllere (PEG4000-Tq-Nps) kapsüllenmiş ve etkileri meme kanseri hücre metastazında gözlenmiştir (26).

DeneySEL sonuçlar, timokinonun neden olduğu artmış miR34a ekspresyonunun yanı sıra, Rac1 ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla sitoskeletal aktin polimerizasyonunun aşağı regülasyonundan kaynaklanabilecek güçlü bir antimigratör etkisinin olduğunu göstermiştir (26).

2.1. Etoposid

2.2.1. Etoposidin Fizikokimyasal Özellikleri

Etoposid, kimyasal yapı olarak podofillotoksine benzer (Şekil 2.4.). Molekül Formül C₂₉H₃₂O₁₃, Molar kütlesi: 588,557 g/mol, CAS numarası: 33419-42-0, Erime noktası: 243,5 °C, Kaynama noktası: 798,1 °C'dir (113).



Şekil 2.4. Etoposid molekülünün kimyasal yapısı.

Sitotoksik ilaçlardan etoposidin kimyasal ve fiziksel stabiliteleri, yaygın olarak kullanılan üç farklı infüzyon sıvısında araştırılmıştır. %5 dekstroz ve %0,9 sodyum klorür infüzyon sıvılarında (konsantrasyon: 0,4 mg/mL) etoposidin oda sıcaklığında en az dört gün kimyasal olarak stabil olduğu sonucuna varılmıştır. 0,4 mg/mL'den yüksek konsantrasyona sahip etoposid infüzyon sıvılarında ara sıra çökme meydana gelmiştir (113).

2.2.2. Etoposidin Farmakokinetik Özellikleri

Etoposid iyi emilir, doruk plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi 1-1,5 saattir. Ortalama biyoyararlanım %50'dir (%25-%75 aralığı). Oral olarak uygulanan etoposid kapsüller için C_{max} ve AUC değerleri, bireyler arası değişkenlik gösterir. Etoposid için ilk geçiş etkisi yoktur. Proteine bağlanması %97'dir (113).

Öncelikli olarak hepatik (CYP450 3A4 izoenzim yolu yoluyla O-demetilasyon yoluyla) metabolizmaya uğrar ve %40'ı değişmeden idrarla atılır. Etoposide ayrıca sırasıyla GSTT1/GSTP1 ve UGT1A1 tarafından glutatyon ve glukuronid konjugasyonuna uğrar. Prostaglandin sentazları, etoposidin O-demetillenmiş metabolitlere (kinon) dönüştürülmesinden de sorumludur (113).

Etoposid metabolitleri ve/veya değişmemiş halde böbrekler ve safra yoluyla atılır. Etoposidin glukuronid ve/veya sülfat konjugatları idrarla atılır. Radyoaktivitenin fekal geri kazanımı intravenöz dozun %44'ü olduğundan, değişmemiş ilaç ve/veya metabolitlerin biliyer atılımı, etoposid eliminasyonunun önemli bir yoludur. Dozun %56'sı idrarla atılır ve bunu %45'i etoposid olarak atılmaktadır (113).

Etoposid 1,5 saatlik bir dağılım yarı ömrüne sahiptir. Beyin omurilik sıvısına iyi geçmez. Dağılım hacmi, kararlı durumda 18-29 L'dir (113).

Toplam vücut klerensi 33-48 mL/dak [iv uygulama, yetişkinler]. Ortalama renal klirens 7-10 mL/dak/m² (113).

Günlük 80 mg/m² dozda etopozid alan akut promiyelositik lösemili bir kadında, anne sütüne etoposid atılımı gösterilmiştir. 0,6 ila 0,8 ug/mL'lik pik konsantrasyonlar, dozlamadan hemen sonra ölçülmüş, ancak 24 saatte saptanamayan seviyelere düşmüştür (113).

Etoposidin sıçanlara intravenöz uygulamasından otuz dakika sonra, en yüksek konsantrasyonlar karaciğer, böbrekler ve ince bağırsakta bulunmuştur. Dozlamadan 24 saat sonra doku konsantrasyonları ihmal edilebilir düzeyde tespit edilmiştir (113).

Eliminasyon yarı ömrü yetişkinlerde 4 ila 8 saat ve çocuklarda 3 ila 7 saat arındadır (113).

2.2.3. Etoposidin Farmakodinamik Özellikleri

Etoposid, 1980'lerden beri çeşitli maligniteleri tedavi etmek için kullanılan başarılı bir antikanser ajanıdır. *Podophyllum peltatum mandrake* bitkisinden ekstrakte edilen bitki alkaloididir. Ticari adı, Vepesid'dir (VP-16). (114)

Etoposid, Topoizomeraz II enzimine doğrudan bağlanır ve Topoizomeraz II enziminin kırılmış DNA uçlarını tekrar birleştirme yeteneğini inhibe eder. Topoizomeraz II- DNA bölünme komplekslerinin stabilizasyonuna ve birikmesine yol

açar. Bu yarıma komplekslerinin birikimi, transkripsiyon ve replikasyonu bloke etme ve DNA çift iplik kırıkları dahil olmak üzere hücre fonksiyonu etkileyerek hücrenin apoptozuna neden olur. Etoposid, NADH dehidrojenaz düzeyinde mitokondriyal geçişi inhibe edebilir ya da HeLa hücreleri içine nükleosidlerin geçişini inhibe edebilir. Mikrotübüler yapı ile etkileşime girmez (113).

Etoposide, DNA topoizomerez II'yi inhibe ederek DNA yeniden ligasyonunu inhibe eder. Bu, hücre bölünmesinin premitotik aşamasında DNA sentezinde kritik hatalara neden olur ve kanser hücresinin apoptozuna yol açabilir. Etoposid hücre döngüsüne bağımlıdır ve faza özgüdür, esas olarak hücre bölünmesinin S ve G2 fazlarını etkiler. İki farklı doza bağımlı yanıt görülür. Yüksek konsantrasyonlarda (10 µg/mL veya daha fazla), mitozu giren hücrelerin parçalanması gözlenir. Düşük konsantrasyonlarda (0.3 ila 10 µg/mL), hücrelerin profaza girmesi engellenir. Etoposidin baskın makromoleküler etkisi, DNA-topoizomerez II ile etkileşim veya serbest radikallerin oluşumu ile DNA iplik kopmalarının indüklenmesidir. Topoizomerez II alfa izoformunun inhibisyonu, etoposidin anti-tümör aktivitesi ile sonuçlanır. İlaç ayrıca beta izoformunu inhibe etme yeteneğine sahiptir ancak bu hedefin inhibisyonu, anti-tümör aktivitesi ile ilişkili değildir. Bunun yerine kanserojen etki ile ilişkilidir (113).

2.2.4. Etoposidin Toksisitesi

Akut toksisitesi

Sıçanda oral LD50 değeri 1784 mg/kg, ip LD50 değeri 39 mg/kg, iv LD50 değeri 58 mg/kg; farede oral LD50 değeri 215 mg/kg, ip LD50 değeri 64 mg/kg, iv LD50 değeri 15 mg/kg'dır (113).

İnsanlarda TDLo (endüştük toksik doz) iv yolla 16 mg/kg/5gün (aralıklı) ve 2,63 mg/kg/10 gün'dür (113).

Tekrarlı doz toksisitesi

VP 16-213, her iki cinsiyetten Sprague-Dawley sıçanlara intravenöz olarak 0,15 mg/kg/gün, 0,50 mg/kg/gün, 1,5 mg/kg/gün ve 4,5 mg/kg/gün doz seviyelerinde uygulanmıştır. Subakut toksisitesinin ve toksik etkilerin tersine çevrilebilirliğinin

incelenmesi amacıyla bir ay izlenmiştir. Karşılaştırma amacıyla, vinkristin (VCR) aynı şekilde 0,04 ve 0,08 mg/kg/gün doz seviyelerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 4,5 mg/kg VP dozu anemiye neden olmuştur ve bu dozu alan bazı erkek sıçanlarda sistemik güçsüzlük, zayıflama ve ataksi sonucunda ölüm gözlenmiştir. VP 0,50 mg/kg beyaz kan hücresi sayısını azaltmış; 1,5 ve 4,5 mg/kg ağırlıklı olarak kırmızı kan hücresi sayısını azaltmıştır. VP 1,5 ve 4,5 mg/kg, toplam serum protein içeriğini ve serum alkalın fosfataz aktivitesini düşürmüştür ve A/G oranını yükseltmiştir. VP 0,50 mg/kg ve üzeri ağırlıklı olarak testis ağırlığını azaltmış ve 1,5 ve 4,5 mg/kg ağırlıklı olarak timik atrofi, kemik iliği hipoplazisi ve spermatogenezin baskılanması ve tübüler atrofi ile testis atrofisine neden olmuştur. VP 4,5 mg/kg germinal merkezlerde atrofiye ve dalakta hemosideroza ve sperm sayısında ve dev hücre görünümünde azalma ile epididimal atrofiye neden olmuştur. Testis ve epididim bulguları dışında yukarıdaki değişiklikler genellikle geri dönüşümlü olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, mevcut deneysel koşul altında VP'nin etkisiz doz seviyesinin her iki cinsiyetten sıçanlara karşı **0,15 mg/kg/gün** olduğu bildirilmiştir (115).

VP 16-213, her iki cinsiyetten Sprague-Dawley sıçanlara bir ay boyunca oral olarak 3, 10, 30 ve 100 mg/kg/gün doz seviyelerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre VP 30 mg/kg canlı ağırlık artışı ve yem alımını baskılamış ve yumuşak dışkı oluşumuna neden olmuştur. VP 100 mg/kg, vücut ağırlığını ve yem alımını azaltmış ve ishal, tüy dökülmesini tetiklemiştir. Ayrıca, bu doz seviyesinin uygulandığı hayvanların yarısı, sistemik güçsüzlük ve zayıflama göstererek ölmüştür. VP 30 mg/kg ve 100 mg/kg uygulamada alyuvar sayısını azaltmıştır. VP 10-100 mg/kg dozlarında serum protein içeriğini ve serum alkalın fosfataz aktivitesini düşürmüş ve A/G oranını yükseltmiştir. VP 10 mg/kg ve üzeri dozlarında timik atrofiye ve testis ağırlığında azalmaya neden olmuş; 30 ve 100 mg/kg spermatogenezin baskılamış; 100 mg/kg epididimde dev hücre görünümü, kemik iliği hipoplazisi, ileosesit ve prostat, seminal vezikül ve dalak germinal merkezlerinin atrofisine neden olmuştur. Testis ve epididimdeki bulguların alevlenmesi dışında yukarıda açıklanan değişikliklerin genellikle geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, mevcut deneysel koşul altında VP'nin etkisiz doz seviyesinin her iki cinsiyetten sıçanlara karşı **3 mg/kg/gün** olduğu bildirilmiştir (115).

VP 16-213, her iki cinsiyetten Sprague-Dawley sıçanlara altı ay boyunca kronik toksisitesini incelemek amacıyla oral olarak 1, 3, 10 ve 30 mg/kg/gün doz seviyelerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre VP 30 mg/kg vücut ağırlığı artışını ve yem alımını baskılamış, geçici ishal, anemi ve tüy dökülmesini beraberinde getirmiştir. Bu dozu alan bazı hayvanlar, sistemik güçsüzlük, zayıflama ve ataksi göstererek ölmüştür. VP'nin 3 mg/kg ve üzeri dozlar kırmızı kan hücresini ve beyaz kan hücresi sayısını azaltmıştır. VP 30 mg/kg, erkeklerde toplam serum protein içeriğini ve A/G oranını yükseltmiş ve dişilerde serum alkalın fosfataz aktivitesini düşürmüştür. VP, 10 ve 30 mg/kg dozlarda ağırlıklı olarak timik atrofi, spermatogenezin baskılanması ile testiküler atrofi ve tübüler atrofi, epididimal ağırlıkta azalmaya neden olmuş ve splenik eritropoezi indüklemiştir. VP'nin 30 mg/kg dozu uygulanan grupta ise testis ve epididim bulguları dışında yukarıda açıklanan değişikliklerin genellikle geri dönüşümlü olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, mevcut deneysel koşul altında VP'nin etkisiz doz seviyesinin her iki cinsiyetten sıçanlara karşı **1 mg/kg/gün** olarak bildirilmiştir (115).

Fare oositlerinde etoposidin neden olduğu hem yapısal kromozom anormallikleri hem de etoposidin anöploidi indüklenmesi yönünden incelenmiştir. Dişi farelere farklı dozlarda etoposid verilmiştir ve 17 saat sonra oositler toplanmıştır. Kromatid asentrik fragmanların ve hiperploidi metafaz II oositlerin oranları, eş zamanlı kontrollere göre etoposid gruplarında önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, hem yapısal hem de sayısal sapmaların, DNA ile veya kromozom ayrımı ile ilişkili çeşitli organeller ile doğrudan etkileşim olmaksızın indüklenebileceğini göstermektedir. Ayrıca, hem mayozda gecikmeyi (ovüle metafaz I oositler ve poliploidi) hem de anöploidi indükleyen diğer bileşiklerin (vinblastin, kolşisin, benomil ve griseofulvin) aksine, etoposid oosit olgunlaşmasında mayotik gecikmeye neden olmamıştır (116).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli ameliyat edilemeyen on bir hasta, günlük 25 mg oral etoposid ile idame tedavisi olarak tedavi edilmiştir. Kemoterapi sırasında ortaya çıkan toksisite tüm vakalarda değerlendirilmiştir, ancak 5 vakada tedavinin birinci ve yedinci gününde ilacın kan konsantrasyonu ölçülmüştür. Pik plazma seviyesi (Cmax) kemoterapinin ilk gününde 0.92 +/- 0.43 mikrogram/ml ve yedinci günde 1.02 +/- 0.30 mikrogram/ml olarak ölçülmüştür. İki ölçümün hiçbirinde

birinci ve yedinci günde elde edilen değerler arasında anlamlı istatistiksel fark olmadığı için, ilacın kümülatif etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. İlacın toksisitesi ile ilgili olarak, periferik beyaz kan hücrelerinin anormal azalmasıyla birlikte kemik iliği baskılanması gözlenmiştir. Alopesi ve karaciğer veya böbrek hasarı gözlenmemiştir ve bir vakada bulantı ve anoreksi varlığına rağmen, tüm vakalarda idame tedavisi devam edilebilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, etoposidin ayaktan hasta bazında idame tedavisi olarak güvenle uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (117).

İleri evre akciğer kanserli 79 hastanın uzun süreli oral etoposid tedavisinin sonuçlarını araştırıldığı bir araştırmada; küçük hücreli akciğer kanserli otuz hasta, uzun süreli oral etoposid ile kombinasyon halinde sisplatin ile tedavi edilmiştir. Yanıt oranının neredeyse %100 olduğu tespit edilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserli 49 hasta rastgele iki gruba ayrılmıştır: birinci gruptaki hastalar (n = 25), uzun süreli oral etoposid ile kombinasyon halinde sisplatin ile tedavi edilmiş; ikinci grupta (n = 24) 14 veya 21 gün boyunca sadece uzun süreli oral etoposid tedavisi kullanılmıştır. Her iki grupta da yaklaşık %80'lik bir yanıt oranı tespit edilmiştir. Bu iki alt gruptaki hastaların çoğu kısmi remisyona girmiş ve geri kalanı stabil klinik aşamada kalmıştır. (ortanca süre 5 ay). Kombine ilaç tedavisi alan tüm hastalarda meydana gelen alopesinin yanı sıra, baskın toksisite (5 vakada agranülositoz) miyelosupresyon olduğu tespit edilmiştir. Bu doz ve programla verilen etoposid (14 gün boyunca 100 mg/gün), ilerlemiş küçük hücreli akciğer kanseri için sisplatin ile kombinasyon halinde birinci basamak sistemik tedavi olarak aktiviteye ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi için orta derecede aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (118).

Etoposid gebe kadınlara uygulandığında fetal hasara neden olabilir. Etoposidin fare ve sıçanlarda teratojenik olduğu gösterilmiştir (113).

Etoposid grup I (insanda kesin karsinojen) karsinojendir (113).

Yüksek doz siklosporin ile beraber oral etoposid uygulanması etoposid eğri altı alanında (AUC) %80'lik bir artışa neden olmuştur. Tek etoposid kullanımıyla karşılaştırıldığında etoposidin toplam vücut klirensinde %38'lik azalma olur (113).

Etoposid bazı ilaçların (örn. siklosporin) sitotoksik ve miyelosupresyon etkilerini artırabilir. Oral antikoagülanların etkileri artabilir. Fenilbutazon, sodyum salisilat ve salisilik asit, etoposidin plazma proteinlerine bağlanmasını etkileyebilir. CYP3A4 inhibitörleri (doksisisiklin, eritromisin diklofenak gibi) etoposid

konsantrasyonunu veya etkisini artırabilir. Aminoglutetimid, karbamazepin, nevirapin, fenobarbital, fenitoin, rifamisin gibi CYP3A4 indükleyicileri ise etoposidin konsantrasyon veya etkilerini azaltabilir (113).

2.3. Sitotoksitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Hücre canlılığını belirleyen yöntemler, bir maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlerdir. Sitotoksitate belirleme yöntemleri genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir. Bu testler ile morfolojik hücresel hasarlar izlenebilir, ayrıca hücre proliferasyonu ve hücresel metabolizmadaki değişiklikler de belirlenebilmektedir (119, 120).

Hücre canlılığını ölçme yöntemleri radyoaktif maddenin kullanılıp kullanılmadığına göre iki grupta incelenebilir. Bunlar radyoaktif ve radyoaktif olmayan enzimatik, membran/floresan boyama ile hücre akış sitometrisi (*Flow sitometrik yöntem*) kullanımını içermektedir. Flow sitometrik hücre-aracılı sitotoksitate testi klinikte özellikle hemofagositik bozukluklar (Chediak Higashi, Griscelli Sendromu vb.); doğal bağışıklık yanıtı olan NK (doğal katil) hücre hastalıkları ve bazı immünolojik hastalıkların tanısında yardımcı olabilmektedir (120).

Radyoaktif yöntemler arasında krom salınım metodu (CRA; *Chromium Release Assay*) ve Jurkat apoptoz ölçümü testi (JAM; *Jurkat Apoptosis Measurement*) yer alır (120).

Krom salınım yöntemi

Lizis sonrası hedef hücreye yüklenen radyoaktif $^{51}\text{Cr-Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 'un salınımının ölçülmesine dayanır (120).

Jurkat apoptoz ölçümü testi

Hedef hücre radyoaktif prekürsör DNA-nükleotidleri, trityum [^3H] metil-timidin DNA fragmanları, işaretleme için kullanılır ve hedef hücre hasarı sonucu işaretli DNA parçacıkları salınımı ölçülerek hedef hücre ölümü ölçülür (120).

Radyoaktif olmayan enzimatik yöntemler arasında laktat dehidrogenaz (LDH) salınım yöntemi (*LDH Release Assay*), MTT kolorimetrik yöntem ve Granzyme B ELISPOT testi yer alır (120).

LDH salınım yöntemi

Hasarlı/ölü hücrelerden vasata salınan laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır. LDH sitoplazmik bir enzimdir. Hücre plazma membran bütünlüğü bozulduğunda LDH enzimi hücrelerden sızarak vasata geçer. Lizise uğramış hedef hücrelerinden LDH salınımı ölçülür. LDH, pirüvatın laktata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimatik aktivite esnasında, NADH oksidasyona uğrayarak NAD⁺'a dönüşür. NADH miktarı, 340 nm absorbansta, spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölen hücre sayısı ortama salınan LDH miktarıyla orantılıdır (119).

MTT kolorimetrik yöntemi

İn vitro ortamda kimyasal maddeye maruz bırakılan hücrenin mitokondriyel enzim kapasitesine bağlı sarı solübl tuz olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)'yi mor-mavi renkli formazan kristallerine dönüştürmesi ve bu kristal yapının organik çözücüde çözünmesi sonrasında spektrofotometrede kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır. MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçer. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez niteliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmelidir. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. Tetrazolyum tuzu konsantrasyonu, hücre tipi, canlı hücre sayısı ve metabolik kapasitesi, vasat içeriği, vasat pH'sı, kuyucuk yapısı gibi parametrelerle doğrudan ilişkilidir. MTT yöntemi sitotoksitenin belirlenmesinde yapılışı kolay, duyarlı, güvenilir, uygun maliyetli olan ve bun nedenle oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. CRA ile orantılıdır. Bu testte tek kullanımlık çoklu kuyucuklu ortamlar kullanılarak değişik hedef hücrelerde sitotoksitenin aynı anda ölçüme imkân sağlar. MTT'nin bu avantajları yanında sadece adherent (yapışkan) hücre dizilerinde uygulanabil olması nedeniyle bu testi sınırlamaktadır (120).

MTT yanında XTT, MTS, WST-1, WST-8 gibi farklı özelliklere sahip tetrazolyum bileşikleri geliştirilerek sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır. MTS, XTT ve WST bileşikleri ise negatif yüklü olup hücre membranını geçemezler. Ortama ara elektron alıcı maddelerin (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) kullanılmasını gerektirir. Bu tetrazolyum bileşiklerin indirgenmesi sonucu oluşan formazan ise suda ve dolayısıyla vasatta çözünebilir (119).

Granzyme B ELISPOT testi

Sitotoksik hücreler olan CD8+- CTL ve NK hücresinde bulunan serin esteraz düzeyi ölçülür (120).

Radyoaktif olmayan floresan boya ya da monoklonal antikorlarla hedef hücreyi işaretleme teknikleri ve bunların hücre akış sitometrisi kullanımları gibi yeni yöntemler, radyoaktif ve radyoaktif olmayan yöntemlerdeki yetersizlik ya da zorluklar nedeniyle geliştirilmiştir. İlk olarak kullanılan hücre akış sitometrisi tek boyalı ve hücrenin ışık saçıcı (light scattering) özelliklerine dayalı hücre akış sitometrisi yöntemleridir. Değişik floresan boya ya da mAb ile hedef hücrenin membran ya da DNA'sını boyayarak hedef hücrede ölümü (sitotoksiteyi) ölçmeye yararlar. F-18 (oktadesilamin floresein izotiyosiyanat), PKH-2, PKH-26, Europium (Eu³⁺), MitoTracker Green (MTG) gibi bazı floresan maddeler hücre canlılığının belirlenmesinde lipofilik membran boyama esasına dayalı olarak kullanılır. Kolay, duyarlı ve güvenilir olsa da hücrelerin bu boyaları sızdırması önemli bir problemdir (120).

Aminoaktinomisin (7-AAD), PI (propidium iyodür), CAM (Calcein-AM: kalsein asetoksimetil ester) ve TO-PRO-3 iyodür gibi floresan boyalar hedef hücre DNA'sını boyayarak hücre ölümü yansıtırlar (120).

Hücre akış sitometrede hedef ve efektör hücrenin monoklonal antikorla işaretlenmesi

Membrana bağlanan floresan monoklonal antikor (mAb) efektör, hedef hücre ve konjugat (efektör hücrenin hedefe yapışmasının) seçiminde ve işaretlemede kullanılır. Anti-CD2, anti-CD5, anti-CD7, anti-CD16 ve anti-CD56 efektörleri işaretlemede kullanılan monoklonal antikorlardır (120).

Resazurin testi (Alamar mavisi floresans testi)

Resazurin boyasının canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks boyasıdır, hücre zarından serbestçe geçerek hücrelere girer ve burada indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resorufin bileşiğine dönüşür. Metabolik işlevi olmayan ölü hücreler resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali oluşturamazlar. Oluşan sinyal, florometre kullanılarak tespit edilir ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir (119).

ATP biyoluminesans testi

Hücre canlılığı testleri arasında en hızlı, hassas ve kolay olanıdır. Hücre ölümünü takiben, hücrenin ATP sentez yeteneği kaybolur ve endojen ATPazlar mevcut ATP'yi hızlı bir şekilde yıkımlar. Hücre içi ATP içeriği, hücre canlılığının temel göstergesi olarak kabul edilir. ATP düzeyinin ölçülebileceği, enzimsel spektrofotometrik, radyografik, bioluminesans gibi farklı yöntemleri mevcuttur. Bioluminesans metodu en hassas olması nedeniyle tercih edilir (119).

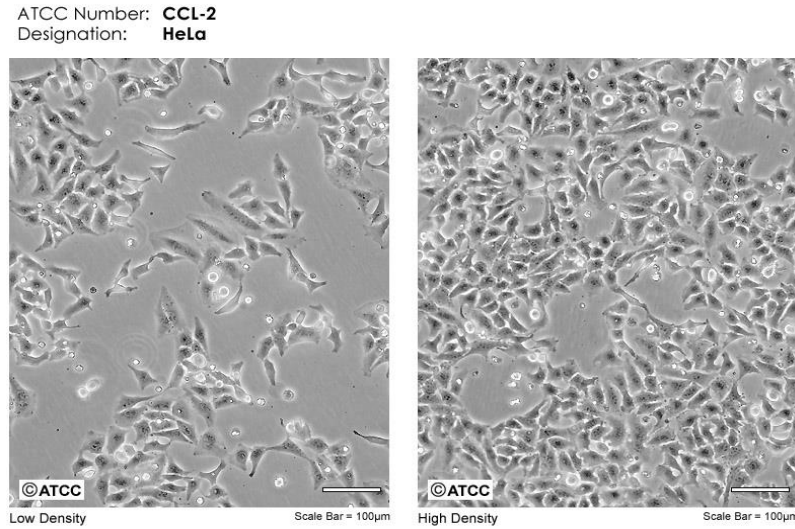
2.4. İnsan Serviks Kanseri (HeLa) Hücre Hattı Özellikleri

Serviks (rahim ağzı) kanseri “HeLa” adını ilk kez 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde Afrika kökenli “Henrietta Lacks” isimli 31 yaşında servikal adenokarsinomlu bir kadın hastadan almıştır. Hasta aynı yıl vefat etmiştir. Bu hastadan alınan hücreler hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. Bu hücreler ölümsüzdür ve bu özelliği nedeniyle standart hücre soyu olarak kullanılmıştır. Birçok araştırma alanında hücre modeli olarak kullanılmıştır. Kanser araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. HeLa hücreleri adheran özelliğe sahiptir. Epitel karakterli morfoloji göstermekte olup oldukça hızlı proliferasyon yapabilen (yaklaşık 24 saatte bir çoğalabilen) hücrelerdir. HeLa hücrelerindeki p53 ifadeleri düşük ancak retinoblastoma baskılayıcı gen (Rb) ifadelerinin normaldir. Hücre genlerinin HPV 18 dizileri içermektedir (Tablo 2.4) (121, 122).

Tablo 2.4. Serviks kanser hücresinin özellikleri.

Elde Edildiği Organizma	İnsan
Doku	Serviks
Yaş/cinsiyet/ırk	31/Kadın/Siyahi
Tümör Tipi	Adenokarsinom
Hücre tipi ve morfolojisi	Epitel Karakterli
Özelliği	Adheran
Saklama koşulları	Sıvı nitrojen buharı

Serviks kanser hücresi; test geliştirme, bulaşıcı hastalık araştırması, cinsel yolla bulaşan hastalık araştırmasında kullanılır. Serviks, serviksin dış kısmını kaplayan çok katlı yassı epitel hücre ve endoservikal kanalın karakteristik özelliği olan mukus salgılayan kolumnar epitel hücre ile döşelidir (Şekil 2.5). Bu iki hücre popülasyonu arasındaki geçişe skuamokolumnar bileşke denir ve bu kısım viral neoplastik transformasyon açısından riskin en fazla olduğu yer olarak düşünülmektedir. Ektoservikte (agina boşluğunda kalan kısım) ortaya çıkan tümörler, çoğunlukla invaziv servikal karsinom vakalarının yaklaşık %75'ini oluşturan skuamöz hücreli karsinomlardır. Aksine, endoserviksten kaynaklanan tümörlerin adenokarsinom olma olasılığı daha yüksektir. Adenoskuamöz, küçük hücreli veya nöroendokrin, seröz papiller ve serviksin berrak hücreli karsinomları daha az görülen histolojik alt tiplerdir (122, 123).



Şekil 2.5. HeLa hücresinin mikroskopik görünümü (122).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biowest®
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinoma) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
Timokinon (%98,5 saflık)	Sigma
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
Penisilin-Streptomisin	Biowest®
Etoposid	Koçak Farma®
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Fötal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Etüv	Dedeoğlu
Işık Mikroskop	Leica
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), 96-kuyucuklu	Corning

plaka, pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15, 50 mL)	
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
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)	Discovery Confort
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

3.3. Çalışma Çözeltileri

HeLa besiyeri

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besiyeri (vasat) için; 500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1000 mg/L glukoz, L-glutamin ve

sodyum bikarbonat içeren) vasatı üzerine 50 ml FBS (~%10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (~%1) eklenir. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklanır. Pasaj numarası 19-21.

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.

Etoposid çözeltisi (2 mM)

100 mg etoposid (MA: 588,557 g/mol) 5 ml enjektabl preparat içinde (Koçak Farma®) çözülmüş halde ve steril olarak bulunmaktadır. Bu çözelti 33,98 mM etoposid içerir.

33,98 mM etoposid çözeltisinden 117,7 µl alınır ve üzerine 1883 µl vasat ilave edilerek 2 ml'ye tamamlanarak 2 mM etoposid çözeltisi hazırlanır. Çözelti ışıktan uzak tutulmalıdır.

Timokinon çözeltisi (5 mM)

6,49 mg timokinon (MA: 164,2 g/mol) 100 µl DMSO içinde çözüldü ve 900 µl PBS çözeltisi ilave edilerek 0.1 M'lık timokinon stok çözeltisi elde edilir.

0.1 M timokinon stok çözeltisinden (%10 DMSO içerir) 50 µl alınır ve üzerine 950 µl hücre vasatı ilave edilerek 5 mM timokinon çözeltisi elde edilir (%2 DMSO içerir). Millipore (0.2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edilmelidir. 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 30 saniye 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.

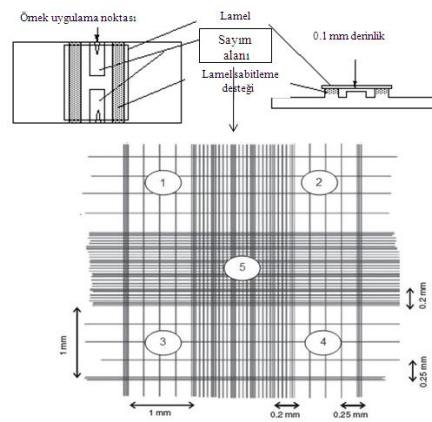
3. Kalan hücre pelleti, uygun besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²'lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde (37°C ± 1°C, %90 ± %5 nem, %5 ± 1 CO₂/hava) çoğalmaları sağlandı.
5. Çoğalmaya bırakılan hücrelerin besiyeri her 3 günde bir değiştirildi ve besiyerinin, kontaminasyon ve doyumluk durumu mikroskopta kontrol edildi.
6. Mikroskobik olarak değerlendirilen hücreler tüm kültür ortamını kapladıklarında, hücrelere paşajlama işlemi uygulandı. Ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.
7. Hücreler 2 kez 5 ml 37°C'ye getirilmiş PBS ile yıkandı.
8. Hücrelerin üzerine 3 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 (6 ml) FBS içeren besiyeri ortama ilave edilerek hücreler nazikçe süspande edildi. Hücre süspandesini steril bir tüpe aktararak 1200 devir/dk hızda 25°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 1 ml besiyeri ile nazikçe süspande edilerek 10 µl'si steril bir ependorf tüpte 90 µl tripan mavisi çözeltisi (%0,4 a/h) 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 (10 x büyütme) 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 2.6. Neubauer hücre sayım lamı.

3.5. HeLa Kanser Hücresinde Timokinonun Etoposid Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

1. Hava akışlı laminar 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 etoposide ve timokinona tek başlarına 24 ve 48 saat maruziyetin sitotoksitesi incelendi.

4. Etoposid için 25, 50, 100, 200, 400 μM ; Timokinon için 3,91-1000 μM konsantrasyon aralıklarında dozları uygulandı. Ortamda DMSO %0,5'i geçmedi.
5. Negatif kontrol olarak, %0,5 DMSO içeren 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 FBS 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 absorbans 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.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100$$
16. Konsantrasyona karşı gelen hücre canlılığı her madde için grafiğe geçirildi. Grafikten elde edilen denkleme göre hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı.
17. Maddelerin IC_{50} değerleri belirlendikten sonra 24 ve 48 saat maruziyette timokinonun etoposid ile kombinasyonlarının sitotoksitesisi araştırıldı. Timokinonun etoposid sitotoksitesisine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile uygulanan konsantrasyon aralıkları;
 HeLa hücresinde, 24 saat inkübasyon için; 170 μM etoposide (IC_{50}) + 3,91-1000 μM timokinon ve 48 saat için 50 μM etoposide (IC_{50}) + 3,91-250 μM

timokinon kombinasyonları incelendi.

18. HeLa hücrelerinde timokinonun etoposid ile kombinasyonlarının sitotoksitesisi MTT yöntemi ile incelendi.

3.6. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalaması±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 farklı zamanlarda 3 kez tekrar edildi. $p<0,05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HeLa Hücrelerinde Timokinonun Sitotoksitesinin Belirlenmesi

HeLa hücrelerinde timokinonun, 3,91-1000 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.

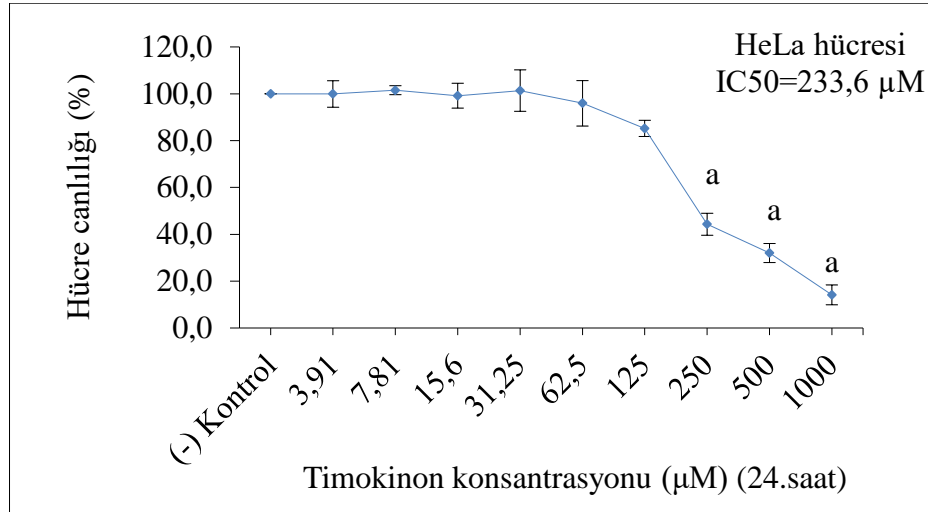
HeLa hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun 3,91-125 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 250 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak (negative kontrole kıyasla 250 μM ; 500 μM ; 1000 μM için sırasıyla 2,26 katı; 3,12 katı; 7,08 katı) hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0,05$). HeLa hücrelerinde timokinona ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 233,6 μM bulunmuştur (Tablo 4.1.) (Şekil 4.1.).

HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında timokinonun 3,91 – 62,5 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 125 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak (negative kontrole kıyasla 125 μM ; 250 μM ; 500 μM ; 1000 μM için sırasıyla 1,85 katı; 3,48 katı; 6,02 katı; 14,24 katı) hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0,05$). HeLa hücrelerinde timokinona ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 145,5 μM bulunmuştur. Hücre canlılığının 125-1000 μM doz aralığında zamana bağlı olarak yaklaşık 2 katı azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.) (Şekil 4.2.).

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

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0
2	3,91 µM Timokinon	106,2	98,3	95,3	99,9 ± 5,6
3	7,81 µM Timokinon	101,0	103,6	99,9	101,5 ± 1,9
4	15,62 µM Timokinon	95,9	95,0	106,7	99,2 ± 5,3
5	31,25 µM Timokinon	90,9	112,5	100,7	101,4 ± 8,8
6	62,5 µM Timokinon	109,2	86,5	92,0	95,9 ± 9,7
7	125 µM Timokinon	80,6	86,1	88,9	85,2 ± 3,5
8	250 µM Timokinon	41,3	40,6	50,9	44,3 ± 4,7 ^a
9	500 µM Timokinon	37,5	30,8	27,7	32,0 ± 4,1 ^a
10	1000 µM Timokinon	9,2	13,7	19,5	14,1 ± 4,2 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. ^a $p < 0,05$; negatif kontrol (%0,5 DMSO) ile karşılaştırıldı.



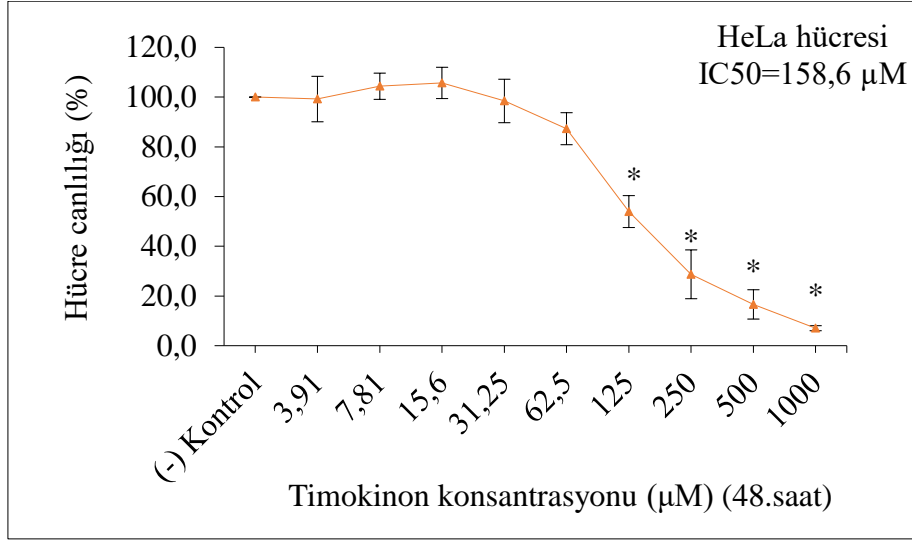
Şekil 4.1. HeLa hücre canlılığı üzerine timokinonun 24 saat maruziyette etkisi.*

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

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

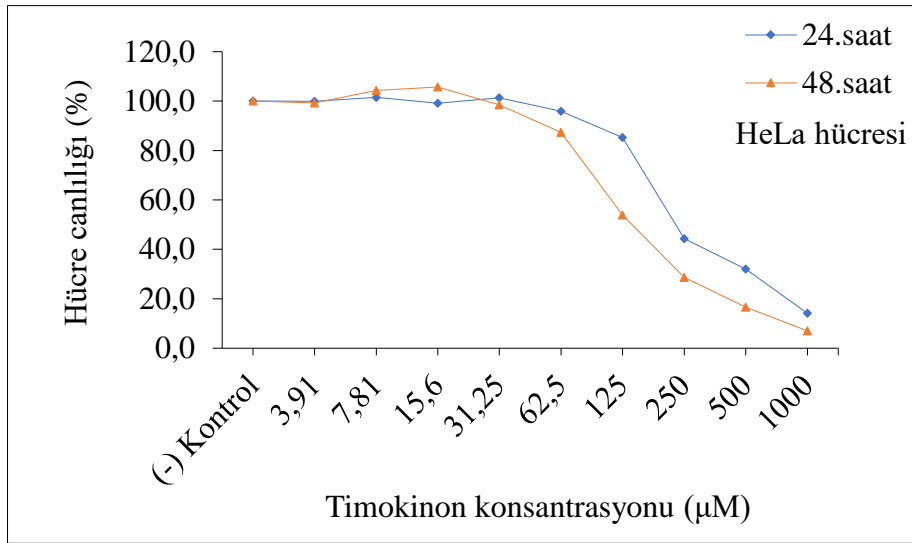
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100
2	3,91 μ M Timokinon	109,6	95,6	92,5	99,2 \pm 9,2
3	7,81 μ M Timokinon	110,5	101,2	101,5	104,4 \pm 5,3
4	15,62 μ M Timokinon	111,9	106,0	99,3	105,7 \pm 6,3
5	31,25 μ M Timokinon	105,3	101,4	88,6	98,4 \pm 8,8
6	62,5 μ M Timokinon	83,9	94,7	83,3	87,3 \pm 6,4
7	125 μ M Timokinon	56,3	46,7	58,9	54,0 \pm 6,4 ^a
8	250 μ M Timokinon	40,0	22,1	24,0	28,7 \pm 9,8 ^a
9	500 μ M Timokinon	23,4	13,2	13,2	16,6 \pm 5,9 ^a
10	1000 μ M Timokinon	5,9	7,6	7,7	7,0 \pm 1,0 ^a

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



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

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. $^a p < 0,05$; negatif kontrol (%0,5 DMSO) 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. HeLa Hücrelerinde Etoposidin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Etoposidin HeLa hücrelerinde 25 µM-400 µM 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.

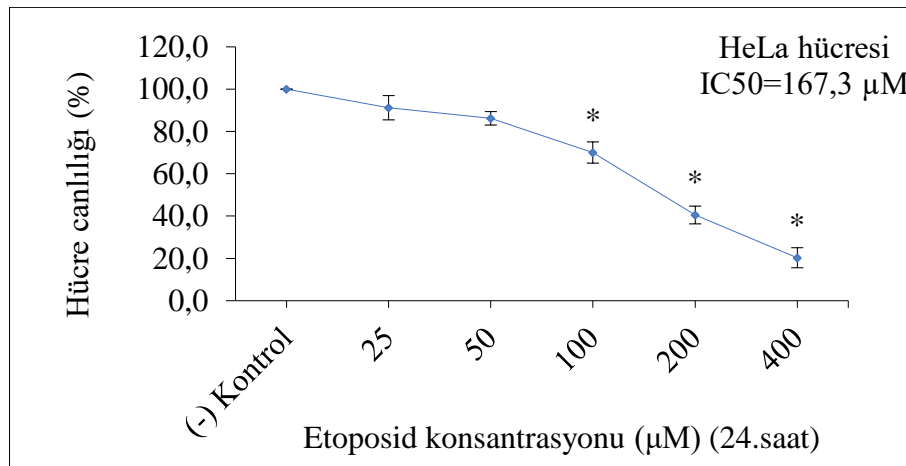
HeLa hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında etoposidin 25 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 100 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak (negative kontrole kıyasla 100 µM; 200 µM; 400 µM için sırasıyla 1,43 katı; 2,47 katı; 4,93 katı) hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). HeLa hücrelerinde etoposide ait IC₅₀ değeri 24 saatlik maruziyette 167,3 µM bulunmuştur (Tablo 4.3.) (Şekil 4.4.).

HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon için, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında etoposidin 25 µM konsantrasyonda önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 50 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak (negative kontrole kıyasla 50 µM; 100 µM; 200 µM; 400 µM için sırasıyla 1,96 katı; 4,21 katı; 8,85 katı; 13,18 katı) hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). HeLa hücrelerinde etoposide ait IC₅₀ değeri 48 saatlik maruziyette 52,7 µM bulunmuştur. Hücre canlılığının 50-400 µM doz aralığında zamana bağlı olarak (50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM için sırasıyla 1,69; 2,94; 3,58; 2,67 katı) azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.4.) (Şekil 4.5.).

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

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0
2	25 µM Etoposid	97,8	92,1	83,8	91,2 ± 5,7
3	50 µM Etoposid	90,7	83,4	84,6	86,2 ± 3,2
4	100 µM Etoposid	69,2	64,4	76,5	70,1 ± 5,0 ^a
5	200 µM Etoposid	46,4	38,6	36,6	40,5 ± 4,2 ^a
6	400 µM Etoposid	26,1	14,5	20,3	20,3 ± 4,7 ^a

* Sonuçlar ortalama ± 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.

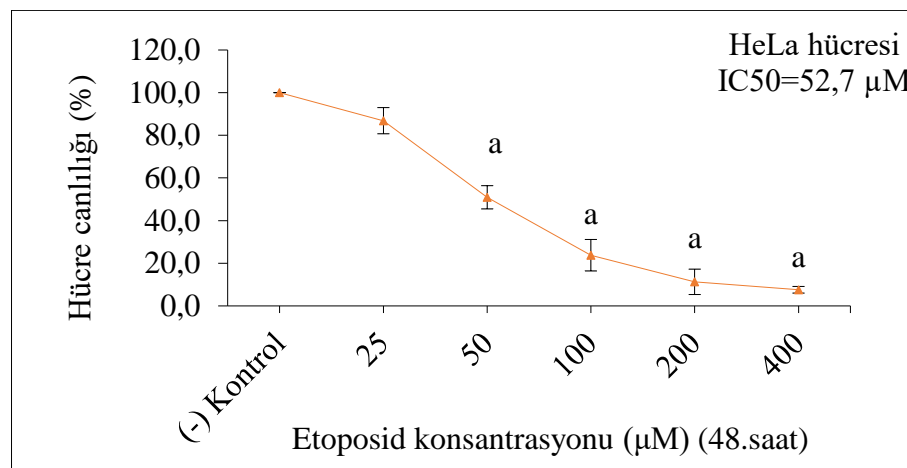
**Şekil 4.4.** HeLa hücre canlılığı üzerine etoposidin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± 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.

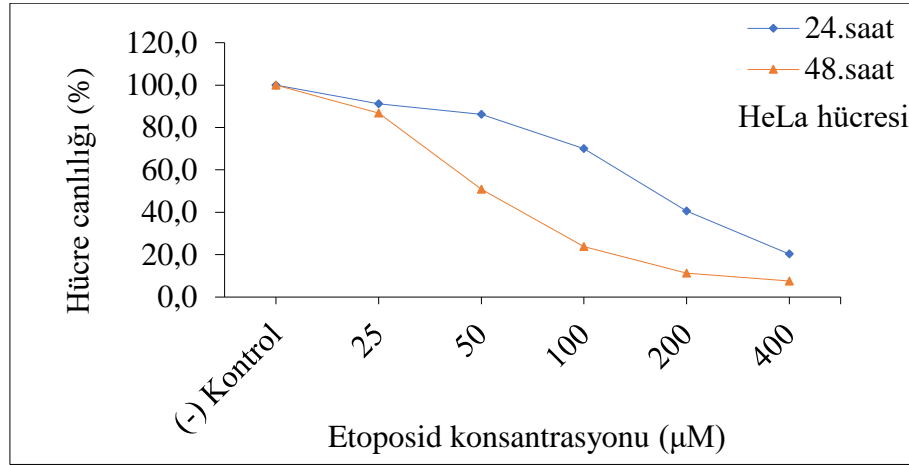
Tablo 4.4. Etoposidin 48 saat maruziyette HeLa hücre canlılığı üzerine etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100,0
2	25 µM Etoposid	93,8	82,0	84,8	86,8 ± 6,1
3	50 µM Etoposid	51,1	45,4	56,3	50,9 ± 5,4 ^a
4	100 µM Etoposid	22,6	17,0	31,7	23,8 ± 7,4 ^a
5	200 µM Etoposid	7,8	7,9	18,2	11,3 ± 6,0 ^a
6	400 µM Etoposid	7,2	6,2	9,3	7,6 ± 1,5 ^a

* Sonuçlar ortalama ± 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 etoposidin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± 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 etoposidin 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. HeLa Hücrelerinde Timokinonun Etoposid Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

HeLa hücrelerinde timokinonun 3,91-1000 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda etoposid sitotoksitesini üzerine etkileri Tablo 4.5. Tablo 4.6. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

24 saatlik inkübasyonda timokinonun etoposidin yaklaşık IC_{50} değerini (170 μM) 3,91-7,81 μM konsantrasyon aralığında değiştirmedigi ancak 15,63 μM ve üzeri dozlarında doz bağımlı (15,6 μM , 31,3 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM için sırasıyla 1,73 katı, 2,22 katı, 2,88 katı, 4,50 katı, 7,31 katı, 11,69 katı, 12,72 katı) istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.7).

48 saatlik inkübasyonda timokinonun etoposidin yaklaşık IC_{50} değerini (50 μM) 3,91-7,81 μM konsantrasyon aralığında değiştirmedigi ancak 31,25 μM ve üzeri dozlarında doz bağımlı (31,3 μM , 62,5 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM için sırasıyla 1,34 katı, 2,44 katı, 4,80 katı, 9,32 katı, 12,84 katı, 12,37 katı) istatistiksel anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0,05$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.7).

24 saatlik maruziyetle karşılaştırıldığında 48 saatlik maruziyette hücre canlılığında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hücre canlılığının zamana bağlı olarak değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

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

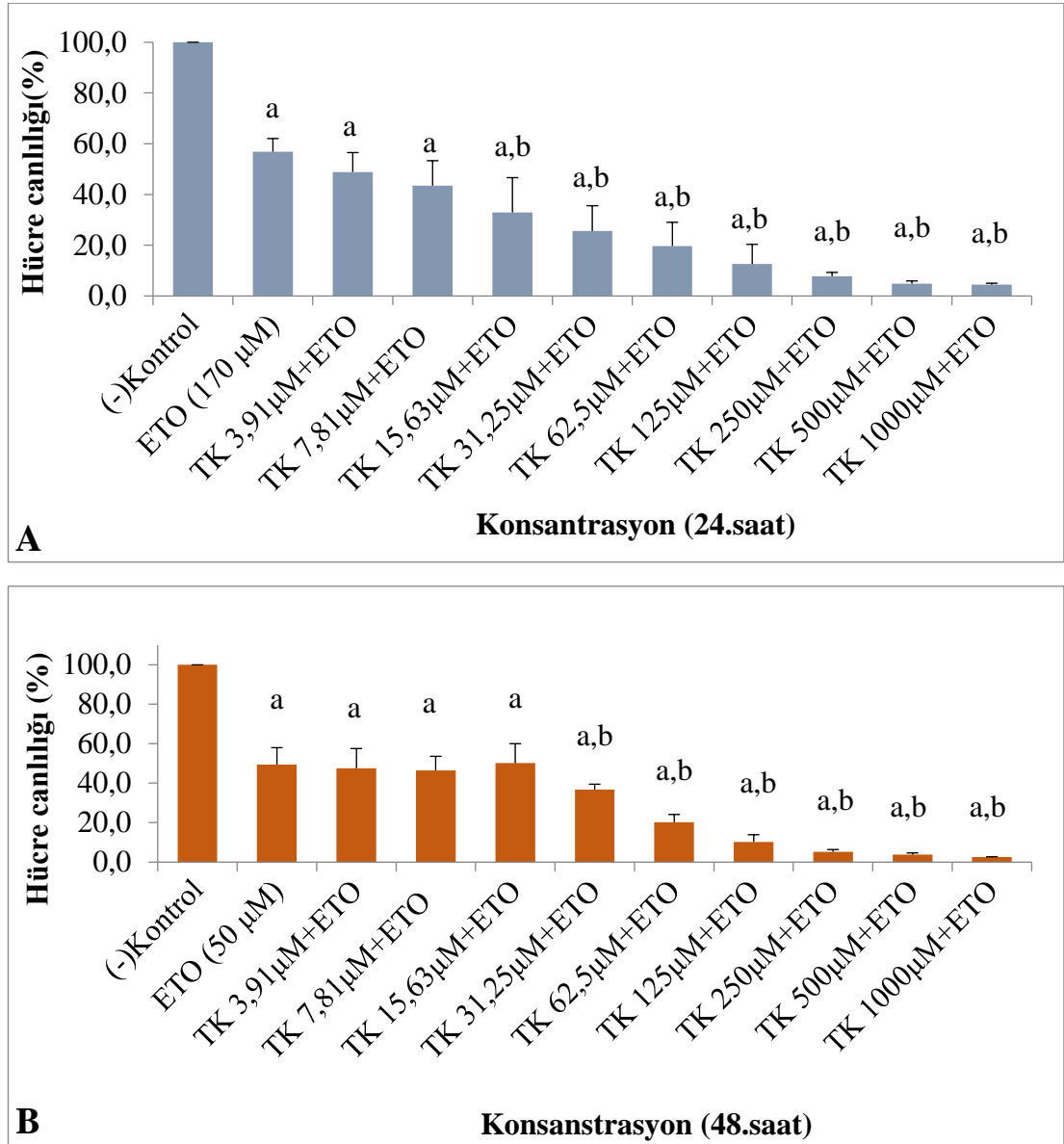
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100
2	ETO (170 µM)	62,5	52,3	55,6	56,8 ± 5,2
3	TK 3,91µM+ETO	56,1	40,8	49,7	48,9 ± 7,7
4	TK 7,81µM+ETO	50,2	32,2	48,0	43,5 ± 9,8
5	TK 15,63µM+ETO	34,6	18,5	45,7	32,9 ± 13,7 ^a
6	TK 31,25µM+ETO	24,9	16,0	35,9	25,6 ± 10,0 ^a
7	TK 62,5µM+ETO	16,1	12,8	30,3	19,7 ± 9,3 ^a
8	TK 125µM+ETO	7,6	8,7	21,5	12,6 ± 7,7 ^a
9	TK 250µM+ETO	6,0	8,4	8,9	7,8 ± 1,5 ^a
10	TK 500µM+ETO	4,6	3,9	6,0	4,9 ± 1,1 ^a
11	TK 1000µM+ETO	4,3	5,1	4,0	4,5 ± 0,6 ^a

*Sonaçlar ortalama ± 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. ^b $p < 0,05$, etoposid (170 µM) ile karşılaştırıldı. ETO: etoposid; TK: timokinon.

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

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	Ortalama Hücre canlılığı (%)
1	(-) Kontrol	100	100	100	100
2	ETO (170 µM)	40,4	57,5	50,4	49,4 ± 8,6
3	TK 3,91µM+ETO	36,6	56,0	50,3	47,6 ± 9,9
4	TK 7,81µM+ETO	38,5	52,4	48,5	46,5 ± 7,2
5	TK 15,63µM+ETO	39,3	58,6	52,6	50,2 ± 9,9
6	TK 31,25µM+ETO	35,0	39,9	35,6	36,8 ± 2,7 ^a
7	TK 62,5µM+ETO	17,4	24,7	18,6	20,2 ± 3,9 ^a
8	TK 125µM+ETO	6,3	11,3	13,3	10,3 ± 3,6 ^a
9	TK 250µM+ETO	4,1	6,3	5,4	5,3 ± 1,1 ^a
10	TK 500µM+ETO	3,0	3,9	4,7	3,9 ± 0,8 ^a
11	TK 1000µM+ETO	2,5	2,8	2,5	2,6 ± 0,2 ^a

*Sonnçular ortalama ± 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. ^b $p < 0,05$, etoposid (50 µM) ile karşılaştırıldı. ETO: etoposid; TK: timokinon.



Şekil 4.7. HeLa hücreleri üzerinde timokinonun 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) etoposid sitotoksitesine 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. ^b $p < 0,05$, etoposid (50 µM ve 170 µM) ile karşılaştırıldı. ETO: etoposid; TK: timokinon.

5. TARTIŞMA

Serviks kanseri, dünyada kadınlarda meme ve kalın bağırsak kanserinden sonra en sık görülen kanser türlerinden olup erken teşhis edildiğinde tamamen tedavi edilebilen bir hastalıktır. Serviks kanserinin tedavisi radyasyon ve sisplatin bazlı kemoterapinin bir kombinasyonudur. Bununla birlikte, beş yıllık genel yaşama oranı %50 civarını aşmamaktadır (9). Günümüzde, ilerlemiş serviks kanserinde sisplatin tek başına veya 5-florourasil, etoposid, vinorelbin, topotekan, paklitaksel, gemsitabin ve irinotekan gibi diğer ilaçlarla kombinasyon halinde radyoterapi ile birlikte standart bir rejim olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, etkinliklerine rağmen, bu kemoterapötik ilaçların yan etkileriyle ilgili endişeler devam etmektedir. Sisplatinden yararlanma olasılığı en yüksek olan bireylere tedavi vermeden önce kemosensitivitenin öngörülmesi zordur. Ayrıca tedavide toksik etkilerden ve gereksiz maliyetlerden kaçınmak veya en aza indirmek oldukça önemlidir. Serviks kanseri tedavisinde tedavi etkinliğinin artırılması ve toksisitenin düşürülmesi amacıyla çoklu ilaç rejimleri tercih edilmektedir. Serviks kanserlerini tedavi etmek üzere yan etkilere sahip olma olasılıkları daha düşük olduğu için, özellikle bitkisel özler olmak üzere, doğal ürünlerin kullanımına yönelik araştırmalar giderek artmaktadır. Bir dizi in vitro çalışma, rahim ağzı kanseri hücrelerinde hücre ölümü veya apoptozu indüklemeye doğal bileşiklerin potansiyel etki mekanizmalarını göstermiştir. Timokinon, Nigella sativa bitkisinin aktif bir bileşenidir ve kanser tedavisinde potansiyel bir role sahiptir. Önceki araştırmacılar, timokinonun akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri, melanom, karaciğer kanseri, nöroblastom ve ağız kanseri hücrelerinin çoğalmasını azalttığını bildirmiştir (124).

Araştırmaların, kemoterapide tedavi sonuçlarını iyileştirmek için yenilikçi ilaç stratejilerinin keşfine odaklanması gerektiği görülmektedir. Timokinonun serviks kanserinde etoposid ile birlikte etkinliğine dair çalışmalar oldukça yetersizdir. Çalışmamızda timokinon ve etoposid kombinasyonunun serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve etoposidin antikanser etkisini timokinonun nasıl etkileyeceğine açıklık getirmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda timokinonun HeLa hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir ve sitotoksosite profilleri değerlendirilmiştir. MTT yöntemi, *in vitro* koşullarda sitotoksositeyi 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 (125).

Çalışmamızda HeLa hücresi uygun çoğalma hızına ve uygun koloni oluşturma özellikleri göstermiştir. Sitotoksistenin değerlendirilmesinde çalışılan maddelerimize karşı yüksek hassasiyet göstermiştir. Bu özellikleri ile HeLa hücresi *in vitro* çalışmamızda kolaylık sağlamıştır.

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde timokinon uygulamasının negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24 saatlik inkübasyon için 250 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında ve 48 saat inkübasyon için 125 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı azalttığı bulunmuştur. HeLa hücrelerinde timokinona ait IC_{50} değerleri 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için sırasıyla 233,6 μM ve 145,5 μM ve etoposide ait IC_{50} değerleri 24 ve 48 saatlik maruziyette sırasıyla 167,3 μM ve 52,7 μM bulunmuştur. Sonuçlar timokinon ve etoposidin HeLa hücrelerine hücre canlılığını azaltıcı etkisinin hem doz hem de zaman bağımlı olduğunu göstermektedir. Timokinon etoposidin yaklaşık IC_{50} değerini 24 saatlik inkübasyon için 15,63 μM ve üzeri dozlarında ve 48 saat inkübasyon için 31,25 μM ve üzeri dozlarında doz bağımlı anlamlı olarak azaltmıştır. Çalışmamız timokinonun HeLa hücresinde etoposidin sitotoksik etkisini arttırabileceğini göstermiştir; bu durum timokinonun etoposidin antikanser etkisini arttırabileceğini düşündürmektedir.

HeLa hücresinde 50 μM etoposidin 48.saatte hücre canlılığı %81,6 ve 72.saat inkübasyonda %37,5 olarak bulunmuştur. Yapılan incelemede apoptotik oluşumlar gösterilmiştir (126).

Xiao ve ark. (2014) BGC-823, HeLa ve A549 tümör hücre hatlarına karşı etoposidin 48.saatte IC_{50} değerlerini sırasıyla $43,74 \pm 5,13 \mu\text{M}$, $209,90 \pm 13,42 \mu\text{M}$ ve $139,54 \pm 7,05 \mu\text{M}$ olarak bildirmişlerdir (127).

Khader ve ark. (2009) Fischer sıçanlarından izole edilen hepatositler üzerinde yaptığı bir çalışmada 1 μM konsantrasyonda timokinonun çok hızlı (dakikalar içinde) sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. 100 μM konsantrasyonda timokinonun saatler içinde hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. 48 saat içinde 50 μM ve 22 μM konsantrasyonlarda akut sitotoksisiye neden olduğu ve ayrıca 10 μM ve 20 μM konsantrasyonlarda timokinonun kontrole kıyasla nekroz düzeyinde artışı tetiklediği gösterilmiştir (82).

Timokinonun farklı hücre hatları üzerine pek çok sitotoksiste çalışması bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışma timokinonun kanser hücrelerine seçici sitotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak incelenen çalışmalarda, uygulanan yöntemlerin farklı olmasına bağlı olarak timokinonun sitotoksik profillerinin de farklı olabildiği görülmektedir. Farklı glioblastoma hücre hatlarında MTT yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, timokinonun 24 saatlik inkübasyonunda IC50 değerleri T98G, U87MG ve Gli36 Δ EGFR için sırasıyla 2,4 μM , 10,3 μM ve 8,3 μM olarak tespit edilmiştir. Timokinonun lizozomlardan enzim salınımına yol açtığı, sitotoksik etkisinin p53'ten bağımsız olduğu ve kaspaz bağımlı olarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (57).

Almajali ve ark. (2021) HL60 lösemi hücreleri üzerinde timokinonun sitotoksitesini incelemek için hücreleri, 1-6 μM doz aralığında timokinon ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe etmişlerdir. HL60 lösemi hücreleri üzerindeki timokinonun IC50'si 24 ve 48 saat sonra 2 μM iken 72 saat sonra sadece 1 μM olarak belirlenmiştir. MTT'nin sonuçları, timokinonun doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığını anlamlı azalttığı sonucuna varılmıştır (128).

Bir diğer *in vitro* çalışmada tümör hücreleri olarak meme kanseri hücre dizisi (MCF-7) ve insan embriyonik böbrek hücresi dizisi (HEK293) 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar boyunca farklı timokinon konsantrasyonlarına (15 μM , 25 μM ve 35 μM) maruz bırakılmıştır. MTT yöntemi ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelemiştirlerdir. Timokinonun IC50 değeri 48 saatte 25 μM olarak belirlenmiştir, bu da timokinonun bu dozda MCF-7 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasına karşı güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca timokinonun apoptoz ilişkili genlerden BAD, Bax genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve p53 gen ifadesini azalttığı da

gösterilmiştir (129).

Yapılan bir diğer çalışmada ise timokinonun miyeloblastik lösemi (HL-60) hücrelerinde IC50 değerini yaklaşık 19,5 μM olduğu bildirilmiştir (130).

Prostat kanseri C4-2B ve PC-3 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, timokinonun IC50 değerleri sırasıyla yaklaşık 50 μM ve 80 μM olarak bildirilmiştir. Timokinonun sitotoksik etkisinde timokinon yapısında bulunan kinona bağlı olarak reaktif oksijen radikal oluşumunun sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (131).

Timokinonun akciğer (LNM35), karaciğer (HepG2), kolon (HT29), melanom (MDA-MB-435) ve meme (MDA-MB-231 ve MCF-7) hücrelerinin 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarına (1-100 μM) maruz kalması sonucu konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı ve 24 saatte IC50 konsantrasyonları HepG2 için 34 μM ve diğer hücreler için de 50 ila 78 μM arasında olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada yüksek dozlarında timokinonun DNA hasarına yol açarak ve mitokondriyal-proapoptik sinyal yollarını aktive ederek toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Timokinonun ayrıca DNA-hasarına neden olan sisplatin gibi antikanser ilaçların hücre canlılığını azaltmada sinerjistik etki gösterebileceği de bildirilmiştir (132).

İnsan serviks skuamöz karsinom (SiHa) hücrelerinde timokinonun hücre canlılığı üzerine etkisinin incelendiği bir in vitro çalışmada timokinonun 72 saat inkübasyon sonrası MTT deneyi ve tripan mavi boyası testiyle belirlenen IC50 değerleri sırasıyla 64 μM ve 55.9 μM olarak belirlenmiştir. Timokinonun SiHa hücre canlılığını Bcl-2 protein ifadesini düşürerek apoptoz aracılığıyla azalttığı bildirilmiştir (133).

HeLa ve HepG2 hücrelerinde timokinonun sitotoksik özellikleri, hücre yoğunluğunun ölçülmesine esası dayanan sulforhodamine B yöntemi ile incelenmiştir. Timokinonun HeLa ve HepG2 için 24 saatlik maruziyetinde IC50 değerleri sırasıyla 44,8 μM ve 35,1 μM olarak bulunmuştur (134).

Sakalar ve ark. (2013) timokinonun 48 saatlik inkübasyonunda IC50 değerini HeLa hücrelerinde 12,5 μM olarak bildirmiştir (135).

HeLa hücrelerinin de bulunduğu farklı hücre hatlarında (HeLa, SiHa 3T3, Vero

hücreleri) timokinonun 3-200 μM doz aralığında 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada timokinonun IC50 değerleri HeLa, SiHa 3T3, Vero hücreleri için sırasıyla 24 saatlik maruziyetinde 119,2 μM , 87,8 μM , 70,6 μM ve 21,8 μM , 48 saatlik maruziyetinde 72,1 μM , 52,3 μM , 69,3 μM ve 17,7 μM , 72 saatlik maruziyetinde 29,6 μM , 23,4 μM , 61,7 μM ve 17,4 μM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada timokinonun sitotoksik etkilerinin kanser hücrelerinde doz ve zaman-bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır (124).

Literatür incelemelerinde serviks kanserinde timokinonun etopozidle kombine edildiği *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. İnsan kolon kanseri hücre dizilerinde hücre canlılığı ve apoptotik yollaklarda timokinonun topoizomeraz I enzim inhibitörü kemoterapötik ilaç topotekanın etkinliği üzerindeki proapoptotik ve antiproliferatif etkilerini incelemek üzerine yapılan bir *in vitro* çalışmada timokinonun topotekan ile potansiyel sinerjik etkisi gösterilmiştir. Çalışmada en iyi kombinasyonu (40 μM timokinon ve 0.6 μM topotekan) belirledikten sonra, timokinonun p53- ve Bax/Bcl2'den bağımsız mekanizmalar yoluyla proliferasyonu inhibe ederek ve toksisiteyi azaltarak topotekanın etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir (136).

Timokinonun insan meme adenokarsinomu (MCF-7) ve duktal karsinom (T47D) hücrelerine karşı gemsitabinin kemomodülatör potansiyelinin incelendiği bir diğer *in vitro* çalışmada timokinon MCF-7 ve T47D hücrelerinde sırasıyla 64,9 \pm 14 μM ve 165 \pm 2 μM IC50 ile sitotoksik etkiler göstermiştir. MCF-7 ve T47D hücrelerinde gemsitabinin IC50'leri 0,9 \pm 0,18 μM ve 14,3 \pm 2,8 μM iken timokinon ile kombinasyondan sonra sırasıyla 0,058 \pm 12 μM ve 2,3 \pm 0,2 μM 'ye önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar sinerjik etkiyi göstermiştir. Bu çalışmaya göre timokinonun, tümörle ilişkili dirençli kök hücre oluşumunu azaltmanın yanı sıra apoptoz, nekroz ve otofajiyi indükleyerek meme kanseri hücrelerine karşı gemsitabine umut verici kemomodülatör etkiler gösterdiği sonucuna varılmıştır (137).

Timokinon bilinen topoizomeraz II zehirlerine yapısal benzerliklere sahip olduğundan, bileşiğin insan topoizomeraz IIa aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. çalışmada timokinonun, çörek otu özü ve çörek otu yağının hepsinin enzim aracılı DNA bölünme düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Timokinon da bir topoizomeraz II inhibitörü olabileceği bildirilmiştir (138).

Çalışmayı kısıtlayan bazı durumlar söz konusudur. Timokinonun ve etoposidin etki profilini görebilmek için geniş doz aralığı çalışılmıştır. Timokinonun sitotoksik olmayan dozları etoposidin sitotoksik dozu ile kombine edilmiştir. Sonuçlara göre HeLa hücrelerinde timokinonun tek başına toksik olmadığı dozlarında etopozidin sitotoksik etkisini arttırabileceği görülmektedir. Timokinon bu etkisini düşük dozlarından ziyade nisbeten daha yüksek (31,25 µM ve üzerinde) ve sitotoksik olmayan dozlarında gerçekleştirmiştir. Timokinonun biyoyararlanımının düşük olduğu ve kan dolaşımındaki yarı ömrünün de çok kısa olduğu düşünüldüğünde çalışmalarda timokinonun daha stabil formülasyonlarının çalışılması gerektiği düşünülmektedir. Servikal kanser tedavisinde klinikte sisplatin tercih edilmektedir. Tedaviye sisplatinle birlikte farklı kemoterapötik ilaç rejimleri de dahil edilebilmektedir. *İn vitro* çalışmamızda timokinonun etopozidle olan kombinasyonlarına sisplatin de dahil edilerek üçlü kombinasyonun etkileri çalışabilirdi. Çalışmada HeLa hücrelerinde timokinonun etopozidin sitotoksitesisi üzerine etkinliği ile beraber daha ileri teknikler yardımı ile apoptoz, hücre döngü kontrol noktaları, antioksidan savunma sistemi gibi farklı olası hücresel yollar da incelenebilirdi. Çalışma sonuçları ön araştırma niteliği taşımasına rağmen timokinonun kanser tedavisinde kullanılan etopozidin terapötik etkinliğini güçlendirmedeki tamamlayıcı rolünü göstermesi açısından ilgili konuya yönelik literatüre yeni veri kazandırmıştır ve umut verici bulguları ortaya koymaktadır. Çalışma yapılacak olan ileri araştırmalara öncü olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Serviks kanseri erken teşhisle önlenbilse de kadınlarda önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Serviks kanseri tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi yer alır. Kemoterapide radyasyon ve sisplatin bazı kemoterapi tercih edilmektedir. Bir topoizomeraz-II inhibitörü olan etoposid, akciğer kanseri, testis kanseri, akut miyelojenöz lösemi ve akut miyelomonositik lösemi, Hodgkin Lenfoması ve yüksek dereceli Hodgkin dışı lenfomalarda ve serviks kanserin tedavisinde etkili bir kemoterapötik ajandır.

Serviks kanseri tedavisinde tedavi etkinliğinin artırılması ve toksisitenin düşürülmesi amacıyla çoklu ilaç rejimleri tercih edilmektedir. Tedavide toksik etkilerden ve gereksiz maliyetlerden kaçınmak veya en aza indirmek oldukça önemlidir. Tekrarlayan rahim ağzı kanseri olan hastalarda sisplatin ile kombinasyon halinde oral etoposidin kombine edilmesinin tedavi etkinliğinin arttırabileceğini bildirilmiştir (10).

Serviks kanserlerini tedavi etmek üzere yan etkilere sahip olma olasılıkları daha düşük olduğu için, özellikle bitkisel özler olmak üzere, doğal ürünlerin kullanımına yönelik araştırmalar giderek artmaktadır. Bir dizi in vitro çalışma, rahim ağzı kanseri hücrelerinde hücre ölümü veya apoptozu indüklemeye doğal bileşiklerin potansiyel etki mekanizmalarını göstermiştir. *Nigella sativa* bitkisinin aktif bir bileşeni olan timokinonun kanser tedavisinde umut vaat edici olabileceği öne sürülmektedir. Timokinon DNA-hasarına neden olan sisplatin gibi antikanser ilaçların hücre canlılığını azaltmada sinerjistik etki gösterebilmektedir (27, 1, 28).

Serviks kanserinde timokinonun etoposid ile birlikte kullanımında tedavi üzerindeki etkinliğine dair çalışmalar oldukça yetersizdir. Çalışmamızda timokinon ve etoposid kombinasyonunun serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve etoposidin antikanser etkisini timokinonun nasıl etkileyeceğine açıklık getirmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde timokinon uygulamasının 24 saatlik inkübasyon için 250 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında ve 48 saat inkübasyon için 125 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını

anlamli azaltdığı bulunmuştur. HeLa hücrelerinde timokinona ait IC₅₀ değerleri 24 ve 48 saatlik inkübasyonları için sırasıyla 233,6 µM ve 145,5 µM ve etoposide ait IC₅₀ değerleri 24 ve 48 saatlik maruziyette sırasıyla 167,3 µM ve 52,7 µM bulunmuştur. Sonuçlar timokinon ve etoposidin HeLa hücrelerine hücre canlılığını azaltıcı etkisinin hem doz hem de zaman bağımlı olduğunu göstermektedir. Timokinon etoposidin yaklaşık IC₅₀ değerini 24 saatlik inkübasyon için 15,63 µM ve üzeri dozlarında ve 48 saat inkübasyon için 31,25 µM ve üzeri dozlarında doz bağımlı anlamli olarak azaltmıştır.

Günümüzde tedavi yaklaşımlarında kemoterapötik ilaçlar ile birlikte çeşitli bitkisel kaynaklı özellikle fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması araştırılmaktadır. Bu çalışmada timokinonun antikanser ilaç etoposide ile birlikte kullanımında HeLa kanser hücresi üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda timokinonun tek başına sitotoksik olmadığı dozlarında bile etoposid sitotoksitesini arttırabildiğı sonucuna ulaşılmıştır. Bu etki timokinonun etopsidin antikanser etkinliğini arttırabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma sonuçlarımız önceki bazı çalışma sonuçları ile tutarlı iken bazı çalışmalar ile tutarlı olmadığı da görülmektedir. Sonuçların kullanılan sitotoksosite yöntemine, uygulama zamanına ve seçilen hücre ve özelliklerinin farklı olmasına bağlı değişebileceğı düşünölmektedir. Timokinonun çeşitli insan kanserlerinin tedavisinde yan etkilerin azaltılması, tedavi etkinliğinin artırılması ve tedavi maliyetlerin azaltılması açısından önemi rol oynayabileceğı düşünölmekle birlikte mevcut verilerin daha fazla klinik çalışma ile desteklenmesi gerektiğı görölmektedir. Ayrıca timokinonun moleküler yapısı nedeniyle stabilitesinin düşük olması bu molekölün dayanıklı formölasyonlarının geliştirilmesini gerektirdiğı de unutulmamalıdır. Daha ileri çalışmalarla bu konunun aydınlatılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bayraka O. Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016.5(3):154-165.
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/balikesirsbd/issue/38439/452626>.
2. WHO, 2021. Cervical cancer. https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1 Erişim tarihi: 14.12.2021.
3. Powles C. HPV vaccine: a key cervical cancer prevention strategy: Primary HPV vaccination and secondary cervical screening are effective prevention strategies to reduce the incidence and mortality of cervical cancer in Ireland. Women's Health. 2017; 25(4):57-58.
4. Bansal S, Lewin SN, Burke WM, Deutsch I, Sun X, Herzog TJ, ve ark. Sarcoma of the cervix: natural history and outcomes. Gynecologic oncology. 2010; 118(2): 134-138.
5. Varshney S, Maheshwari V, Aijaz M, Alam K. Role and significance of HER 2neu as a biomarker in the premalignant and malignant lesions of uterine cervix. Annals of Diagnostic Pathology. 2020; 151443.
6. Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976–2000. Cancer. 2004; 100:1035–1044.
7. Jones MW, Lefkowitz M. Adenosarcoma of the uterine cervix: a clinicopathological study of 12 cases. Int J Gynecol Pathol 1995; 14:223–229.
8. Albert A, Lee A, Allbright R, Vijayakumar S. Primary sarcoma of the cervix: an analysis of patient and tumor characteristics, treatment patterns, and outcomes. Journal of Gynecologic Oncology. 2019; 31.
9. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2001; 358:781–786.
10. Watanabe Y, Hoshiai H, Nakanishi T, Kawamura N, Tanaka N, Isaka K, ve ark. Evaluation of oral etoposide in combination with cisplatin for patients with recurrent cervical cancer: long-term follow-up results of a Japanese multicenter study. Anticancer Res. 2011 Sep;31(9):3063-7.

11. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*. 1998; 34:1514–21.
12. Fleming RA, Miller AA, Stewart CF. Etoposide: an update. *Clinical pharmacy*. 1989; 8(4):274-293.
13. Aisner, J, Lee EJ. Etoposide. Current and future status. *Cancer*. 1991; 67(S1): 215-219.
14. 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.
15. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2012 Feb 15;83(4):443-51.
16. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*. 2000 Aug;14(5):323-8.
17. Rani R, Dahiya S, Dhingra D, Dilbaghi N, Kim K.-H, Kumar S. Improvement of antihyperglycemic activity of nano-thymoquinone in rat model of type-2 diabetes. *Chem.-Biol. Interact*. 2018; 295:119–132.
18. Salem ML, Alenzi FQ, Attia WY. Thymoquinone, the active ingredient of *Nigella sativa* seeds, enhances survival and activity of antigen-specific CD8-positive T cells in vitro. *Br J Biomed Sci*. 2011;68(3):131-7.
19. 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; 22:107–113.
20. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer*. 2005; 117:409–417.
21. Li F, Rajendran P, Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *Br J Pharmacol*. 2010; 161:541–554.

22. Khan MA, Tania M, Fu J. Epigenetic role of thymoquinone: impact on cellular mechanism and cancer therapeutics. *Drug discovery today*. 2019; 24(12):2315-2322.
23. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*. 2004; 15(4): 389-399.
24. 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. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014.
25. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K–AKT pathway. *Clinical and Translational Oncology*, 2015; 17(2):145-151.
26. Bhattacharya S, Ahir M, Patra P, Mukherjee S, Ghosh S, Mazumdar M, ve ark. PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a. *Biomaterials*. 2015; 51, 91:107.
27. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*. 2019; 13: 961.
28. El Nabi SH, Elfiky M, Salman A, El-Shamy S, Ouda R, El-Garawani I. Modulatory Effect of Zingiber Officinale Oil on Oxidative Stress and DNA Damage in Etoposide-Treated Rats. 2019.
29. Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi* 7.2. 2018; 118-135.
30. Forouzanfar F, Bazzaz BSF, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014; 17(12):929.

31. Khader M, Eckl P. M. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014;17(12): 950.
32. Mollazadeh, H, Hosseinzadeh H. The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014; 17(12): 958.
33. Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*. 2015; 95: 138-158.
34. Abdel-Fattah AFM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*. 2000; 400(1): 89-97.
35. Salmani JMM, Asghar S, Lv H, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light. *Molecules*. 2014; 19(5): 5925-5939.
36. Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RM, Al-Shagha WM. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2015; 40(3): 319-323.
37. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejawani S, Menon M, ve ark. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*. 2007; 67(16): 7782-8.
38. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, ve ark. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer biology & therapy*. 2007; 6(2):160-169.
39. Arafa ESA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, ve ark. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011. 706(1-2): 28-35.
40. Alhosin M, Sharif T, Mousli M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB, ve ark. Down-regulation of UHRF1, associated with re-expression

- of tumor suppressor genes, is a common feature of natural compounds exhibiting anti-cancer properties. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2012; 30(1): 1-10.
41. Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, ve ark. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell death disease*. 2013; 4(6): e660-e660.
 42. 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. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2010; 29:87.
 43. Hussain AR, Ahmed M, Ahmed S, Manogaran P, Plataniias LC, Alvi S, ve ark. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free radical biology and medicine*. 2011;50(8), 978-987.
 44. Dragoni S, Laforenza U, Bonetti E, Lodola F, Bottino C, Berra-Romani R, ve ark. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration. *Stem Cells*. 2011; 29(11):1898-1907.
 45. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2003; 84(2-3): 251-258.
 46. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacological research*. 2000; 41(3):283-289.
 47. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2002; 79(1): 1-11.
 48. Awad AS, Kamel R, Sherief MAE. Effect of thymoquinone on hepatorenal dysfunction and alteration of CYP3A1 and spermidine/spermine N-1-acetyl-

- transferase gene expression induced by renal ischaemia–reperfusion in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011; 63(8): 1037-1042.
49. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology letters*. 1998; 95(1): 23-29.
 50. Khalife KH, Lupidi G. Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free radical research*. 2007; 41(2): 153-161.
 51. Kanter, M. Nigella sativa and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochemical Research*. 2008. 33(3), 579-88.
 52. Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC complementary and alternative medicine*. 2011; 11(1): 1-6.
 53. Piras A, Rosa A, Marongiu B, Porcedda S, Falconieri D, Dessi MA, et al. 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.
 54. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 2000; 143(3): 219-226.
 55. 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): 1135-1142.
 56. Wirries A, Schubert AK, Zimmermann R, Jabari S, Ruchholtz S, El-Najjar N. Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *International Immunopharmacology*. 2013; 15(2):381-386.
 57. Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells. *PLoS One*. 2013; 8(9):e72882.

58. Hayat K, Asim MR, 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): 591-598.
59. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology letters*. 2003; 143(2): 133-143.
60. Fouad AA, Jresat, I. Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Andrologia*. 2015. 47(4): 417-26.
61. Nader MA, El-Agamy DS, Suddek GM. Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Archives of Pharmacal Research*. 2010; 33(4): 637-643.
62. 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): 219-223.
63. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Life sciences*. 2009; 85(23-26): 830-834.
64. Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of diabetes*. 2010; 2(4): 256-266.
65. 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.
66. Nagi MN, Almakki HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009; 23(9): 1295-1298.
67. 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 and Chemical Toxicology*. 2010; 48(8-9):2361-2365.

68. Sayed-Ahmed MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007; 34(5-6):399-405.
69. Basarslan F, Yilmaz N, Ates S, Ozgur T, Tutanc M, Motor VK. Protective effects of thymoquinone on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Human and experimental toxicology*, 2012; 31(7):726-733.
70. Evirgen O, Gökçe A, Ozturk OH, Nacar E, Onlen Y, Ozer B, ve ark. Effect of thymoquinone on oxidative stress in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats. *Current Therapeutic Research*. 2011; 72(5):204-215.
71. Radad K, Moldzio R, Taha M, Rausch WD. Thymoquinone protects dopaminergic neurons against MPP+ and rotenone. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009; 23(5): 696-700.
72. Radad K, Hassanein K, Al-Shraim M, Moldzio R, Rausch WD. Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2014; 66(1): 13-17.
73. Mabrouk A, Cheikh HB. Thymoquinone ameliorates lead-induced suppression of the antioxidant system in rat kidneys. *Libyan Journal of Medicine*. 2016; 11(1): 31018.
74. Isik A, 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 of cardio-thoracic surgery*. 2005; 28(2):301-305.
75. El-Khouly D, El-Bakly WM, Awad AS, El-Mesallamy HO, El-Demerdash E. Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats. *Toxicology*. 2012; 302(2-3): 106-113.
76. Ozdemir H, Kara MI, Erciyas, K, Ozer H, Ay S. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. *Journal of periodontal research*. 2012; 47(1):74-80.
77. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research. An international journal devoted to*

- pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives. 2003; 17(4):299-305.
78. Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Elmazar M. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Research*, 1998; 44(2-3), 56-61.
 79. Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 2001; 110(3-4), 239-252.
 80. 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.
 81. 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.
 82. Khader, M., Bresgen, N. ve Eckl, P.M. (2009). In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 129-33.
 83. AbuKhader MM, Khater SH, Al-Matubsi HY. Acute effects of thymoquinone on the pregnant rat and embryo-fetal development. *Drug and chemical toxicology*. 2013; 36(1): 27-34.
 84. Al-Gharably NM, Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC, ve ark. Protective effect of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. 1997.
 85. Al-Shabanah OA, Badary OA, Nagi MN, Al-Gharably NM, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity without compromising its antitumor activity. *Journal of experimental & clinical cancer research. CR*. 1998; 17(2):193-198.
 86. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, ve ark. 2008. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(7):1789-1796.

87. Aykan N. F. Kanser Oluşum Mekanizmaları. 04/09/2015.
88. Ozbilgin MK, Aktas C, Uluer ET, Buyukuysal M, Gareveran MS, Kurtman C. Influence of Radiation Exposure During Radiotherapy. Evidence for the Increase of Versican and Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Concentrations. Analytical and quantitative cytopathology and histopathology.2016; 38(2): 126-132.
89. Aliustaoğlu M. Temel kanser fizyopatolojisi. Klinik Gelişim. 2009; 22(3):46-49.
90. Ringer DP, Schnipper LE. Principles of Cancer Biology. İn:Lenhard RE, Osteen RT,Gansler T;eds. Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society; 2001:21-35.
91. İçli F, Akbulut H. Onkolojiye Giriş. İn:iliçin G,Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.;eds.İç Hastalıkları.Güneş Kitapevi. 2005;2007-2014.
92. Reed Sİ. Cell Cycle.İN: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA;eds. Cancer. 8 th Ed. Philadelphia:Lippicott-Williams&Wilkins, 2008;79-92.
93. Dalay N. Kanser Biyolojisi. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN; eds. Klinik Onkoloji.İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları. 2000;48-53.
94. Tripathy D. Neoplasia. İn: McPhee SJ, Lingappa VR, Ganong WF et al.; eds. Pathophysiology of Disease.2nd ed. Connecticut: Appleton&Lange.1997;78-97.
95. Tripathy D. Neoplasia. İn: McPhee SJ, Lingappa VR, Ganong WF et al.; eds. Pathophysiology of Disease.2nd ed. Connecticut: Appleton&Lange.1997;78-97.
96. Khan MA, Tania M, Fu S, Fu J. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. Oncotarget. 2017 ;8(31):51907.
97. Mostofa AGM, Hossain MK, Basak D, Bin Sayeed MS. Thymoquinone as a potential adjuvant therapy for cancer treatment: evidence from preclinical studies. Frontiers in pharmacology. 2017; 8 :295.
98. Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, ve ark. Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. Journal of cellular and molecular medicine, 2008 ;12(1): 330-342.

99. Şakalar Ç, İzgi K, İskender B, Sezen S, Aksu H, Çakır M, ve ark. The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*. 2016; 37(4): 4467-4477.
100. Kolli-Bouhafs K, Boukhari A, Abusnina A, Velot E, Gies J P, Lugnier C, ve ark. Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation. *Investigational new drugs*. 2012; 30(6):2121-2131.
101. Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, Haslberger AG. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components—the implications in cancer prevention. *British journal of pharmacology*. 2012; 167(2): 279-297.
102. Kar S, Parbin S, Deb M, Shilpi A, Sengupta D, Rath SK, ve ark. Epigenetic choreography of stem cells: the DNA demethylation episode of development. *Cellular and molecular life sciences*. 2014; 71(6):1017-1032.
103. Parbin S, Shilpi A, Kar S, Pradhan N, Sengupta D, Deb M, ve ark. Insights into the molecular interactions of thymoquinone with histone deacetylase: evaluation of the therapeutic intervention potential against breast cancer. *Molecular BioSystems*, 2016; 12(1): 48-58.
104. Lu Y, Feng Y, Liu D, Zhang Z, Gao K, Zhang W, ve ark. Thymoquinone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of SIRT1 signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 47(3): 1193-1206.
105. Velagapudi R, El-Bakoush A, Lepiarz I, Ogunrinade F, Olajide OA. AMPK and SIRT1 activation contribute to inhibition of neuroinflammation by thymoquinone in BV2 microglia. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017; 435(1): 149-162.
106. Liu Z, Liu S, Xie, Z, Pavlovicz RE, Wu J, Chen P, ve ark. Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009; 329(2), 505-514.
107. Pang J, Shen N, Yan F, Zhao N, Dou L, Wu LC, ve ark. Thymoquinone exerts potent growth-suppressive activity on leukemia through DNA hypermethylation reversal in leukemia cells. *Oncotarget*. 2017; 8(21):34453.

108. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Molecular cancer*. 2018; 17(1): 1-14.
109. Bronner C, Fuhrmann G, Chédin FL, Macaluso M, Dhe-Paganon S. UHRF1 links the histone code and DNA methylation to ensure faithful epigenetic memory inheritance. *Genetics and epigenetics*. 2009 ;2: GEG-S3992.
110. Alhosin M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller C, Peluso J, ve ark. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochemical pharmacology*. 2010. 79(9): 1251-1260.
111. Qadi SA, Hassan MA, Sheikh RA, Baothman OA, Zamzami MA, Choudhry H, ve ark. Thymoquinone-induced reactivation of tumor suppressor genes in cancer cells involves epigenetic mechanisms. *Epigenetics insights*. 2019; 12:2516865719839011.
112. Luo Q, Ren Z, Zhu L, Shao Y, Xie Y, Feng Y, ve ark. Involvement of microRNA-146a in the inflammatory response of status epilepticus rats. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets Formerly Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorders*. 2017; 16(6): 686-693.
113. PubChem.Etoposide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etoposide#section=Interactions> [Erişim tarihi 05.01.2022]
114. Wise HC, Iyer GV, Moore K, Temkin SM, Gordon S, Aghajanian C, ve ark. 2019. Activity of M3814, an oral DNA-PK inhibitor, in combination with topoisomerase II inhibitors in ovarian cancer models. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 1-7.
115. Takahashi N, Kadota T, Kawano S, Ohta K, Ishikawa K, Kuroyanagi K, ve ark. Toxicity Studies Of Vp16-213 (Iv): Intravenous One-Month Subacute Toxicity In Rats. *The Journal Of Toxicological Sciences*. 1986;11(Supplementi): 89-122.
116. Mailhes JB, Marchetti F, Phillips Jr, GL, Barnhill DR. Preferential pericentric lesions and aneuploidy induced in mouse oocytes by the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 1994; 14(1): 39-51.

117. Taguchi O, Yamakami T, Machishi M, Gabazza EC, Ibata H, Tsutsui K, ve ark. Pharmacokinetic study and side effects of chronic daily administration of oral etoposide. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy.* 1992; 19(12):2005-2009.
118. Bozoky G, Ruby E, Goher I, Mohos A, Lengyel M. Prolonged oral etoposide therapy in advanced stage lung cancer. *Orvosi hetilap,* 1997; 138(28), 1791-1795.
119. Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Harran Üniv Vet Fak Derg,* 2017; 6 (1): 112-118.
120. Özdemir Ö. Hücre-Aracılı Sitotoksosite Yöntemleri. *Asthma Allergy Immunol* 2018; 16:1-10.
121. 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.
122. ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.)
123. Small Jr W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM ve ark, Cervical cancer: a global health crisis. *Cancer.* 2017; 123(13):2404-2412.
124. Hafiza WA, Latifah SY. Potential implications of GRP58 expression and susceptibility of cervical cancer to cisplatin and thymoquinone-based therapy. *Journal of OncoTargets and Therapy.* 2014; 7: 1375-87.
125. Holst-Hansen C, Brünner N. MTT-cell proliferation assay, *Cell Biology: a Laboratory Handbook.* 2nd Ed. Academic Press. San Diego. 1998.
126. Rello-Varona S, Gámez A, Moreno V, Stockert JC, Cristóbal J, Pacheco M, ve ark. Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(12):2183-95.
127. Xiao L, Zhao W, Li HM, Wan DJ, Li DS, Chen T, ve ark. Design and synthesis of the novel DNA topoisomerase II inhibitors: Esterification and amination substituted 4'-demethylepipodophyllotoxin derivatives exhibiting anti-tumor activity by activating ATM/ATR signaling pathways. *Eur J Med Chem.* 2014 Jun 10; 80: 267-77.

128. Almajali B, Al-Jamal HAN, Wan Taib WR, Ismail I, Johan MF, Doolaanea AA, ve ark. Thymoquinone Suppresses Cell Proliferation and Enhances Apoptosis of HL60 Leukemia Cells through Re-Expression of JAK/STAT Negative Regulators. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021 Mar 1;22(3):879-885.
129. Yıldırım HY, Azzawri AA, Duran T. Thymoquinone induces apoptosis via targeting the Bax/BAD and Bcl-2 pathway in breast cancer cells. *Dicle Tıp Dergisi.* 2019; 46(3):411-417.
130. Norfazlina MN, Farida Zuraina MY, Rajab NF, Mohd Nazip S, Rumiza AR, Suziana Zaila CF, ve ark. In vitro cytotoxicity effects of single and combination *Nigella sativa* and *Zingiber zerumbet* extracts on human myeloid leukemia (HL60) cells and its mode of cell death. *The Open Conference Proceedings Journal,* 2013; 4:99-107.
131. Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostat cancer cells: role of reactive oxygen species. *Experimental Biology and Medicine (Maywood).* 2010; 235(6):751-60.
132. Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, ve ark. Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2013; 27(5): 557-69.
133. 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(7): 1392-8.
134. ElKhoely A, Hafez HF, Ashmawy AM, Badary O, Abdelaziz, A, Mostafa A, ve ark. Chemopreventive and therapeutic potentials of thymoquinone in HepG2 cells: mechanistic perspectives. *Journal of Natural Medicines.* 2015; 69(3): 313-23.
135. Sakalar C, Yuruk M, Kaya T, Aytekin M, Kuk S, Canatan H. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry,* 2013; 383(1-2): 243-51.

136. Khalife R, Hodroj MH, Fakhoury R, Rizk S. Thymoquinone from *Nigella sativa* seeds promotes the antitumor activity of noncytotoxic doses of topotecan in human colorectal cancer cells in vitro. *Planta Med.* 2016 Mar;82(4):312-21.
137. Bashmail HA, Aliaa A, Alamoudi, Abdulwahab Noorwali, Gehan A. Hegazy, Ghada AJabnoor, Hani Choudhry & Ahmed M. Al-Abd. Thymoquinone synergizes gemcitabine anti-breast cancer activity via modulating its apoptotic and autophagic activities. *Scientific Reports*, volume 8, Article number. 2018.;11674.
138. Ashley RE, Osheroff N. Natural products as topoisomerase II poisons: effects of thymoquinone on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II α . *Chem Res Toxicol.* 2014;27(5):787-793. doi:10.1021/tx400453v.

8. EKLER

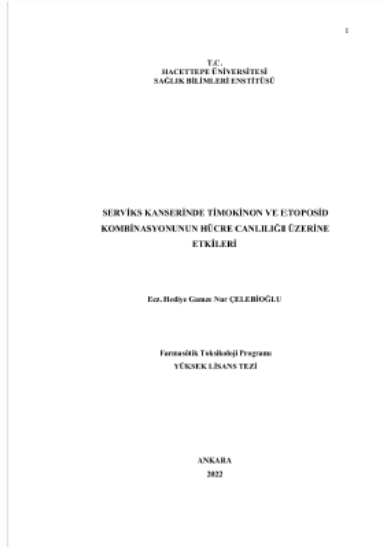


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Hediye Gamze Nur Çelebioğlu
Ödev başlığı: SERVİKS KANSERİNDE ETOPOSİD VE TİMOKİNON KOMBİNAS...
Gönderi Başlığı: SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD KOMBİNAS...
Dosya adı: MZE_TEZGENEL_B_LG_LLJ_SONU_LLJ_TARTI_MA_EN_SON_HAL_...
Dosya boyutu: 889.34K
Sayfa sayısı: 65
Word count: 14,641
Karakter sayısı: 96,994
Gönderim Tarihi: 01-Şub-2022 10:21ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1752626688



SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD KOMBİNASYONUNUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Yazar Hediye Gamze Nur Çelebioğlu

Gönderim Tarihi: 01-Şub-2022 10:21AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1752626688

Dosya adı: MZE_TEZGENEL_B_LG_LLJ_SONU_LLJ_TARTI_MA_EN_SON_HAL_denticate.pdf (889.34K)

Kellme sayısı: 14641

Karakter sayısı: 96994

SERVİKS KANSERİNDE TİMOKİNON VE ETOPOSİD KOMBİNASYONUNUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 22	% 19	% 16	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Pelin GÜZELSOY, Sevtap AYDIN, Nurşen BAŞARAN. "Potantial Effects of Thymoquinone, the Active Constituent of Black Seed (Nigelle Sativa L.), on Human Health", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 2018 Yayın	% 7
2	pdfs.semanticscholar.org İnternet Kaynağı	% 5
3	aai.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	a5d6933f-7b22-49cc-bedf-b60f464d1429.filesusr.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.klinikgelisim.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	www.ilachakkinda.com	

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Hediye Gamze Nur ÇELEBİOĞLU