www.biodicon.com Biological Diversity and Conservation

ISSN 1308-8084 Online ISSN 1308-5301 Print

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.46309/biodicon.2022.1168903
15/3 (2022) 348-355

Evaluation of antiproliferative effect of cisplatin and thymoquinone combination on MCF-7 cells

Mete ÖZKOÇ [*1], Burçin Sim ÖZBAL [2] ve Ergül MUTLU ALTUNDAĞ [1]
ORCID: 0000-0003-3557-4349; 0000-0002-0344-8017; 0000-0001-5355-4654

[1]Tıbbi Biyokimya, Tıp Fakültesi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Gazimağusa, Kuzey Kıbrıs Mersin 10 Türkiye
[2]Tıp Fakültesi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Gazimağusa, Kuzey Kıbrıs Mersin 10 Turkey, Türkiye

Abstract

Breast cancer is the second most common cause of death among women and the most frequently diagnosed cancer type in the worldwide. Cisplatin (CDPP), a chemotherapeutic agent, is used in the treatment of breast cancer, but has serious side effects. In addition, the resistance of breast cancer cells such as MCF-7 to cisplatin complicates the treatment. Thymoquinone (TQ), a phytochemical compound found in black cumin, has been applied and investigated as an anticancer agent in different studies. The aim of this in vitro study is to investigate the antiproliferative effect of CDPP and TQ combination on MCF-7 cell line. In this study, MCF-7 cells were treated with different concentrations of TQ, CDDP and thymoquinone:cisplatin combinations (TQ+CDDP) for 24 hours. MTT test were carried out for the cell viability determination and crystal violet staining methods were applied to observe colony formation. The IC_{50} value and combination index (CI) values that inhibit 50% of the MCF-7 cell population were calculated using the CompuSyn software program. It was shown that the IC_{50} dose of TQ, CDDP and TQ+CDDP on MCF-7 cells were 58 µM, 32 µM and 31 µM+17 µg/mL, respectively, and the CI value was 1.11. In conclusion, single doses of TQ and CDPP were shown to have antiproliferative effects on the MCF-7 breast cancer cell line. It was observed that the combination of TQ+CDDP showed an antiproliferative effect against MCF-7 breast cancer cell line in synergistic or antagonistic effects corresponding to different Fa values.

Keywords: thymoquinone, cisplatin, MCF-, antiproliferative effect

---------- * ----------

Sisplatin ve Timokinon Kombinasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki Antiproliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi

Özet

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık en sık görülen ikinci ölüm nedeni ve en sık teşhis edilen kanser türüdür. Kemoterapötik bir ajan olan, sisplatin (CDPP), meme kanseri tedavisinde kullanılmakla birlikte ciddi yan etkilere sahiptir. Ayrıca, MCF-7 gibi meme kanseri hücrelerinin cisplatine karşı dirençli olması tedaviyi zorlaştırmaktadır. Çörek otunda bulunan ve fitokimyasal bir bileşik olan timokinon (TQ) farklı çalışmalarda antikanser ajan olarak uygulanmış ve araştırılmıştır. Bu in vitro çalışmadaki amaç, CDPP ve TQ kombinasyonunun MCF-7 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisini araştırmaktır.

Bu çalışmada, MCF-7 hücreleri, 24 saat boyunca farklı TQ, CDDP konsantrasyonları ve timokinon:sisplatin kombinasyonları (TQ+CDDP) ile muamele edildi. Hücre canlılığı tayini için MTT testi ve koloni oluşumunu gözlemlemek için kristal viyole boyama yöntemleri uygulandı. MCF-7 hücre popülasyonunun %50'sini inhibe eden (IC50) değer ve kombinasyon index (CI) değerleri CompuSyn yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

MCF-7 hücreleri üzerinde TQ, CDDP ve TQ+CDDP'nin etkin dozlarının sırasıyla 58 µM, 32 µM ve 31 µM+17 µg/mL olduğu ve bu kombinasyon dozunun Fa=0.5 (IC50) olduğu durumda kombinasyon indeks değerinin 1.11 olduğu gösterildi. Sonuç olarak, TQ ve CDPP'nin tekli dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu gösterildi. TQ+CDDP kombinasyonunun ise farklı Fa değerlerine denk gelen

* *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905391064302; Fax.: +905391064302; E-mail: ozkocmete@gmail.com
© Copyright 2022 by Biological Diversity and Conservation Geliş tarihi: 31.08.2022; Yayın tarihi: 15.12.2022 BioDiCon. 1053-310822

sinerjistik veya antagonistik etkilerde MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: timokinon, sisplatin, MCF-7, antiproliferatif etki

1. Giriş

Meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan malignitedir. Hastalığın toplum üzerinde oldukça etkili olması önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmakta ve dolayısıyla, tanı ve hedef tedavilerin geliştirilebilmesi için daha fazla moleküler düzeyde araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır [1]. Bugüne kadar geliştirilen bir çok meme kanseri hücre hatları içerisinde MCF-7 hücre hattı, araştırma gruplarının en çok kullandığı hatlardan biri olmuştur [2]. Östrojen ve progesteron gibi hormon reseptörlerini eksprese eden MCF-7 hücre hattı [2], doksorubisin, salvianolik asit, cisplatin ve etoposid gibi antikanser ajanlarına da direnç göstermektededir [3].

Antikanser ajanları içerisinde yaygın bir şekilde kullanılan cisplatin ya da cis-DDP (cis-diamin dikloroplatin(II), CDPP), testis ve over kanserlerinde tedavi edici olarak etkin bir şekilde uygulanmaktadır [4]. Sisplatinin antikanser ajan olarak etki mekanizması, pürin nükleotidlerinin yedinci azot atomuna bağlanarak DNA hasarına neden olması ve aynı zamanda replikasyonu engelleyerek hücre bölünmesini bloke etmesine dayanmaktadır [5]. Sisplatin uygulanmasının nefrotoksisite ve ototoksisite gibi yan etkilerinin yanı sarı, kolorektal [4] ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattının da içinde bulunduğu bazı kanser türlerinin bu ajana karşı direnç göstermesi [6] aşılması gereken sorunlardan biridir.

Yıllarca süregelen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda doğal bileşenler araştırmacıların odak noktası olmuştur. Bunlardan biri olan ve çörek otunda baskın bir şekilde bulunan Timokinonun (TQ), antioksidan, antiinflamatuar, antihepatotoksik ve antinefrotoksik, antidiyabetik, antimikrobiyal ve antikanser gibi etkileri detaylıca araştırılmıştır [7]. Yapılan araştırmalar, TQ'nun kanser hücrelerinin bölünmesini, hücre döngüsünü farklı aşamalarda durdurduğunu; ayrıca, proapoptotik faktörleri indükleyip antiapoptotik faktörleri baskılayarak kanser hücrelerinin apoptotik hücre ölümüne devam etmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir [8]. TQ ve CDPP kombinasyonunun antiproliferatif etkinliği, NCI-H460 (karaciğer kanseri hücre hattı) ve UMSCC-14C (oral sukamöz kanser hücreleri) gibi çeşitli kanser hücre hatlarında araştırılmıştır [9,10].

Bu *in vitro* araştırmada TQ ve CDDP'nin hem tekli dozlarının hem de oluşturulan kombinasyon dozlarının MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir

2. Materyal ve yöntem

1.1. Kimyasallar

Meme kanseri hücre hattı (MCF-7), Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Manassas, VA) satın alınmıştır. Metanol Sigma-Aldrich firmasından, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dimetil sülfoksit (DMSO) ve Timokinon Merck firmasından temin edilmiştir. Sisplatin ise Koçak Farma'dan satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan diğer malzemeler ise TermoFisher Scientific firmasından temin edilmiştir.

1.2. Hücre Kültürü

MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovin serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde, 37°C, %5 CO_2 olacak şekilde ayarlanmış inkübatör içerisinde çoğaltıldı. Yeterince çoğalmış olan MCF-7 hücrelerine çalışma günü, tripsin-EDTA (%0.05) ile müdahale edilerek yapıştıkları flask yüzeyinden serbestleşmeleri sağlandı. Serbestleşen MCF-7 hücreleri 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücreler DMEM ile yeniden süspanse edildi. Hücre sayımını gerçekleştirmek üzere 1:1 oranında tripan mavi ile boyanan hücrelerin sayımı gerçekleştirildikten sonra her kuyucukta $1x10^4$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplaklara ekim yapıldı ve hücrelerin yapışması için bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

TQ ana stoğu 200 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözüldü ve -20°C'de muhafaza edildi. Sisplatin için 500 µM olan ana stok kullanıldı. Çalışma anında, bir gün önceden mikroplakalara ekilmiş olan hücreler üzerine TQ ve sisplatin ana stoklarından eklendi. Kuyucuklar içerisindeki son hacim DMEM ile 100 µL'ye tamamlanarak, son konsantrasyonların, TQ için 10, 20, 40, 60, 80, 100 µM ve sisplatin için ise 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL olması sağlandı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. DMSO'nun son konsantrasyonu %0.1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı.

1.3. Hücre Canlılığı

Hücre canlılığını test etmek üzere MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi uygulandı. TQ ve sisplatin ile ayrı ayrı müdahale edilen MCF-7 hücreleri üzerine (4 tekrarlı), 24 saatlik inkübasyonun

ardından, her kuyucuğa 10 µL MTT solüsyonu eklendi ve 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 100 µL DMSO ilave edildi. DMSO içerisinde çözünen mor renkli formazan kristalleri Varioskan Flash mikroplak okuyucu (Skanit Software 2.4.5, Thermo Scientific) ile 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen veriler, TQ ve CDDP'nin hücre canlılığını belirlenmesi için:

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{A_{test} - A_{blank}}{A_{kontrol} - A_{blank}} \times 100$$

formülü kullanılarak her kuyucuktan elde edilen absorbans değeri için ayrı ayrı hesaplandı. Böylece, TQ ve CDPP'nin kombinasyonu için IC_{50} değerleri belirlenerek bu değerler kombinasyon oranının hesaplanmasında kullanıldı.

1.4. Kombinasyon İndeksinin Belirlenmesi

TQ ve CDPP'nin IC_{50} değerleri CompuSyn bilgisayar yazılım programında hesaplandıktan sonra kombinasyon çalışması için bir oran belirlendi. TQ+CDPP için dozlar yeniden bu orana göre ayarlandı ve hücre canlılığı testi uygulandı. CDPP ve TQ kombinasyonu için IC50 değerleri ve kombinasyon indeksleri (CI), Chou ve Talalay'ın [11] medyan etki prensibine göre CompuSyn bilgisayar yazılım programı kullanılarak belirlendi. CompuSyn programı ile hesaplanan kombinasyon indeks değerleri; CI>1 ise antagonistik, CI=1 ise additif ve CI<1 ise sinerjistik etki gösteren değerler olarak değerlendirildi.

1.5. Kristal Viyole Boyama

MCF-7 hücreleri, her kuyuda $5x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Yapışan hücreler, TQ ve CDDP'nin IC_{50} dozlarında ve üç farklı dozda kombinasyonları ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler daha sonra iki kez soğuk 1x PBS ile yıkandı ve soğutulmuş metanol ile 10 dakika boyunca fikse edildi. Plakalardan metanol aspire edildikten sonra sabitlenmiş hücreler %0.5 kristal viyole solüsyonu (% 25 metanol içinde çözülmüş) ile boyandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Hücreler, fazlalık boya temizleninceye kadar distile suyla yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

1.6. İstatistiksel Analiz

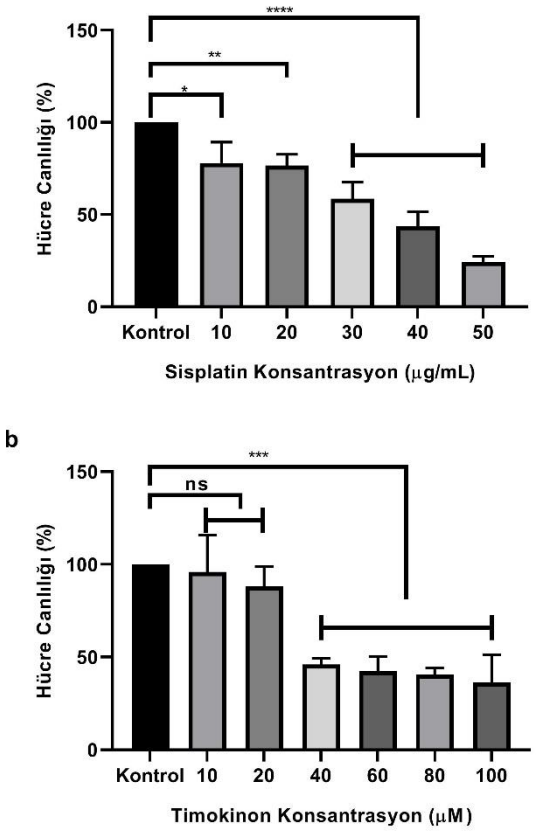
MTT deneyi sonuçlarının istatistiksel analizi Graphpad Prism 9 kullanılarak yapıldı. TQ, CDDP ve TQ+CDDP uygulanmış hücre grupları ile kontrol grupları arasında antiproliferatif etki açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için One-Way ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. $p<0.05$ olan sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi..

3. Bulgular

1.7. Timokinonun ve Sisplatinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Şekil 1a'da 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki CDPP'nin MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi görülmektedir. Buna göre kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 ve 20 µM uygulanan gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma tespit edilirken (sırasıyla $p<0.05$; $p<0.01$); 30, 40 ve 50 µg/mL dozlarının uygulandığı gruplarda ileri derecede anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). CDPP'nin IC_{50} değeri ise 32 µg/mL olarak hesaplandı.

Şekil 1b'de 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µM konsantrasyonlardaki timokinonun MCF-7 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 ve 20 µM konsantrasyonlarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (ns). Buna karşılık, 40, 60, 80 ve 100 µM konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdiği saptandı ($p<0,001$). CompuSyn Software programı kullanılarak fraksiyonel etki (Fa) değerleri üzerinden TQ' nun IC_{50} konsantrasyonu 58 µM olarak hesaplandı.



Şekil 1. a. Farklı konsantrasyonlardaki sisplatinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. b. Farklı konsantrasyonlardaki timokinonun hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ns, anlamlı olmayan farklılık; *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$.

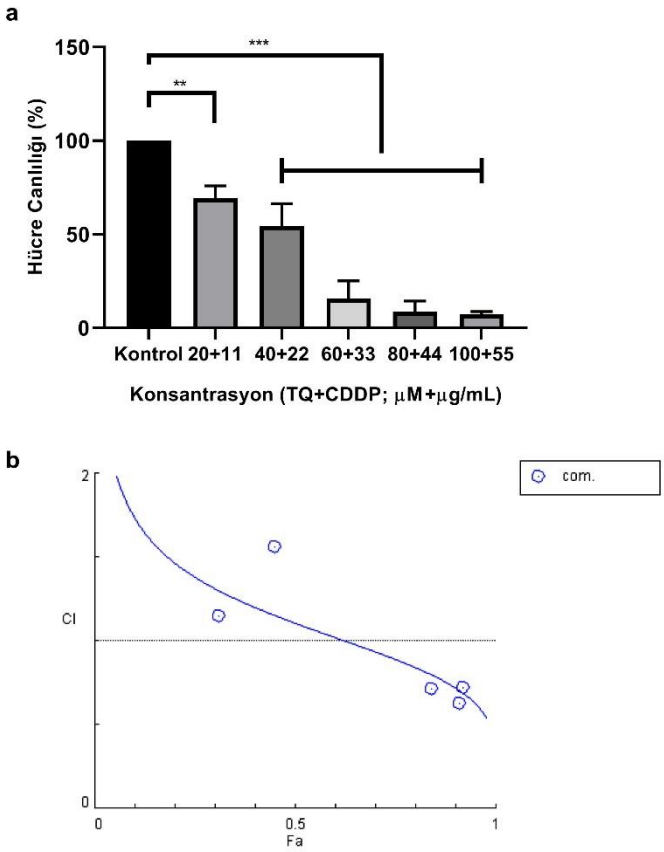
1.8. TQ ve CDDP Kombinasyonunun MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

TQ ve CDDP kombinasyon gruplarının hazırlanmasında TQ ve CDDP'nin IC_{50} değerlerinin birbirine oranı "TQ: CDDP, 1,8:1" olarak belirlendi ve kombinasyon dozları Tablo 1'de verildiği gibi hesaplandı. Bu konsantrasyonlara göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında K1'in istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı ($p<0,01$); K2, K3, K4 ve K5'in ise çok yüksek düzeyde anlamlı farklılık ($p<0,001$) gösterdiği saptandı (Şekil 2a). CompuSyn Software programı ile MCF-7 hücreleri üzerinde TQ+CDDP kombinasyon uygulamaları sonucunda elde edilen CI (Şekil 2b) ve Fa değerleri ve bunlara denk gelen tanımlamalar Tabloda 1'de verilmiştir. Ayrıca Fa= 0.5 için TQ+CDDP dozu 31 µM+17 µg/mL ve kombinasyon indeksi 1.11 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. MCF-7 hücrelerine uygulanan kombinasyon grupları için belirlenen doz miktarları, CI, Fa değerleri ve tanımlamalar

Gruplar	TQ Konsantrasyonu (µM)	Sisplatin Konsantrasyonu (µg/mL)	Kombinasyon İndeksi (CI)	Fraksiyonel Etki (Fa)	Tanımlamalar
Konsantrasyon 1(K1)	20	11	1.15	0.31	Hafif antagonizm
Konsantrasyon 2 (K2)	40	22	1.56	0.45	Antagonizm
Konsantrasyon 3 (K3)	60	33	0.71	0.84	Orta sinerjizm
Konsantrasyon 4	80	44	0.62	0.91	Sinerjizm

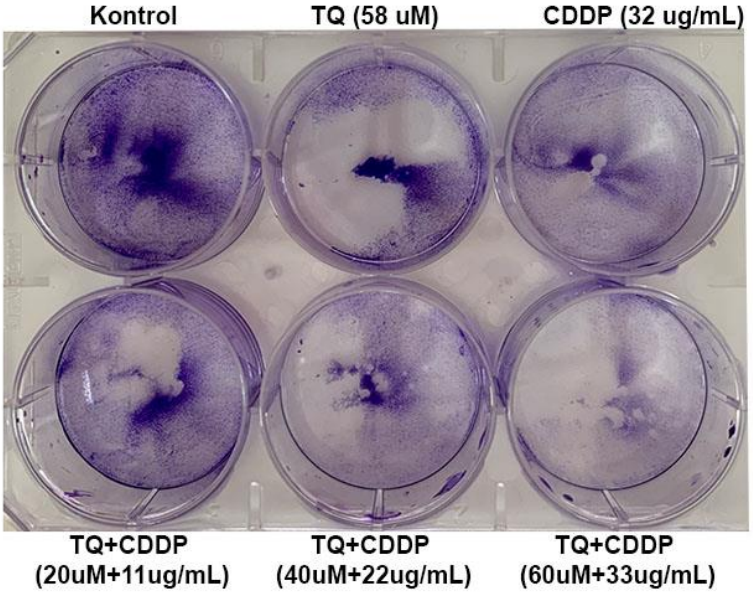
(K4)					
Konsantrasyon 5 (K5)	100	55	0.71	0.92	Orta sinerjizm
IC_{50}	31	17	1.11	0.5	Hafif antagonizm



Şekil 2. a. Farklı konsantrasyonlardaki timokinon ve sisplatin kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi. b. Farklı konsantrasyonlardaki timokinon ve sisplatin kombinasyonunun fa değeri ve kombinasyon indeksi grafiği. CI, kombinasyon indeksi; Fa, fraksiyonel etki; com, kombinasyon dozları; ns, alamlı olmayan farklılık; *: *p<0.05*; **: *p<0.01*; ***: *p<0.001*.

1.9. Koloni Oluşumu

MCF-7 hücrelerinin 6'lı mikro plakalarda koloni oluşumu kristal viyole ile boyanarak gösterilmiş ve göreceli olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 3). Buna göre kolonileşmenin diğer gruplara kıyasla kontrol grubunda çok daha fazla olduğu görülmektedir. Kontrol grubuna kıyasla koloni oluşumundaki azalma en fazla TQ+CDD kombinasyonunun 60 μM+33 μg/mL olduğu konsantrasyonunda saptanmış, bunu 40 μM+22 μg/mL ve 20 μM+11 μg/mL konsantrasyonları takip etmiştir.



Şekil 3. Farklı gruplara ait kristal viyole boyama.

4. Sonuçlar ve tartışma

Kanser tipleri arasında kadınlarda yüksek mortaliteye sebep olan meme kanseri en yaygın kanser türlerinden biridir [12,13]. Bu durum, büyük bir halk sağlığı problemine neden olmakta ve araştırmacıların bu sağlık sorunu üzerine odaklanmalarını arttırmaktadır.

DNA'ya bağlanarak DNA hasarına neden olan, ayrıca replikasyonu ve dolayısı ile hücre bölünmesini engelleyerek etki gösteren sisplatin [5,14] farklı *in vivo* ve *in vitro* modellerde çalışılmıştır. 1978 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından testis ve mesane kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onay almış olan sisplatin, bu güne kadar yaygın bir şekilde testis, yumurtalık, mesane, kolorektal ve akciğer kanseri gibi türlerde etkin bir şekilde kullanılmıştır [15]. Buna karşın içerisinde meme kanserinin de olduğu bazı kanser türlerinin sisplatine karşı dirençli olduğu bilinmekte [2] ve aşılması gereken bir problem olarak araştırmacıların karşısına çıkmaktadır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sisplatin konsantrasyonlarının değişebildiği görülmüştür [16–19]. Bir çalışmada, 48 ve 72 saat boyunca 10 µg/mL sisplatine maruz bırakılan MCF-7 ve kaspaz-3 geni ile transfekte edilen MCF-7 hücreleri (MCF-7 CASP-3) apoptotik hücre ölümü yolakları üzerinden araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, sisplatinin MCF-7 CASP-3 hücreleri üzerinde MCF-7 hücrelerine kıyasla yaklaşık 50 kat daha etkili olduğu gösterilmiş ve MCF-7 hücrelerindeki sisplatin direncinin kaspaz 3 ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [18]. Buna karşılık başka bir çalışmada, farklı dozlarda (1.5-20 µM) uygulanan sisplatinin MCF-7 hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiş ve 5 saat gibi kısa bir inkübasyon süresinin sonunda sisplatinin 20 µM olarak uygulandığı grupta hücrelerin yaklaşık %75'inin öldüğü belirtilmiştir [19]. Bizim, MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda sisplatin uyguladığımız çalışmamızda sisplatinin IC_{50} dozu 32 µg/mL olarak hesaplanmış, ayrıca koloni oluşumunun göreceli olarak azaldığı kristal viole boyama ile gösterilmiştir.

Günümüzde bitkilerden, hayvanlardan veya mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünler kanser tedavisinde önemli rol oynamaktadır [20, 27]. Bunlardan biri olan ve çörek otunda bulunan TQ, tümör gelişimini inhibe etme ve kansere karşı koruyucu etkiye sahip olma gibi biyolojik aktivite ile iyi bilinen bir antioksidan moleküldür [9]. Timokinonun, farklı kanser türlerinde ve hatta kanserin farklı aşamalarında (proliferasyon, metastaz ve invazyon) etkin bir şekilde koruyucu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [21]. Bir çalışmada TQ'nun 50 µM dozunun 18 saatte hücre canlılığını %20, 24 saatte %30 ve 48 saattte %70 azalttığı, buna karşılık 100 µM dozunun 18 ve 24 saatte hücre canlılığını %80 azalttığı gösterilmiştir [22]. İçerisinde MCF-7'nin de olduğu üç farklı kanser hücre hattı üzerinde yapılan başka bir çalışmada, TQ için 24 saatlik etkin dozun 40 µM olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, TQ'nun MCF-7 hücreleri üzerinde özellikle kaspaz -7, -8 ve -9'un aktivasyonu ile sitotoksik etki göstererek kemoterapötik bir ajan olma özelliğine sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, p53 protein seviyelerinde hiç bir değişiklik olmamasının, MCF-7 hücrelerinin bu yolaktan bağımsız olarak apoptoza devam ettiğini düşünmüş [23], Dastjerdi ve ark. (2016) ise bunun tam tersini iddia etmiştir [24]. Bu çalışmaların aksine Motaghed ve ark. (2013), 24 saat boyunca MCF-7 hücrelerine 25 µM gibi daha düşük bir konsantrasyonda TQ uygulanmasının hücre canlılığını %50 azaltabileceğini göstermiştir [25]. MCF-7 meme kanseri hücrelerine timokinonun tekli dozlarını 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µM olarak uyguladığımız bu çalışmada IC_{50} konsantrasyonunu 58 µM olarak bulunmuştur. Koloni oluşumunu incelediğimizde ise 24 saat 58 µM timokinon uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre çok daha az koloni oluştuğu görülmüştür. Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde bizim belirlediğimiz etkin konsantrasyona yakın

konsantrasyonlar görülmüş olmasına rağmen, konsantrasyonu daha az veya daha fazla belirtilmiş olan araştırmalar da mevcuttur [8].

Son yıllarda doğal ajanlarla ile modern tıpta kullanılan ajanların kombinasyonları sadece kanser değil, bir çok farklı hastalık modeli üzerine yapılan çalışmalarda da oldukça gündeme gelmiştir [20, 26]. Kanser hücreleri üzerindeki kombine tedavilerde doğal ajanların kullanılması, anti kanser ajanlara karşı bir kemoprotektif etki sağlamakta ve ayrıca anti-proliferatif etkinliği arttırmaktadır [10, 26]. Geniş çaplı bir literatür taramasından sonra NCI-H146, UMSCC-14C, A2780 (yumurtalık kanseri hücre hattı) gibi farklı kanser hücre hatlarına timokinon ve sisplatinin kombinasyonunun uygulandığı görülmüş; ancak, MCF-7 hücre hattı üzerinde bu kombinasyonun uygulandığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, TQ+CDDP kombinasyonunun MCF-7 hücrelerindeki anti-proliferatif etkinliğinin gösterildiği ilk çalışma olmuştur.

Önce sisplatin ve timokinonun tekli dozlarının uygulayıp IC_{50} değerlerinin belirlendiği bu çalışmada, daha sonra kombinasyon oranı hesaplanarak farklı kombinasyon dozları uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Buna göre, K1 konsantrasyonunda hafif antagonizm, K2 konsantrasyonunda ise antagonizm olduğu görülmüş, K3 ve K5' de orta sinerjizm, K4'de sinerjizm ve kombinasyonun IC_{50} dozunda hafif antagonizm görülmüştür.

Sonuç olarak, iki farklı ajan kullanarak çeşitli kombine dozlar belirlediğimiz çalışmamızda genel olarak ajanlar arasında antagonist bir etki görülmüştür. Sinerjizm görülen dozlarda ise TQ ve CDDP 'nin tekli dozlarından daha yüksek dozlar bulunmuştur. Bu çalışmada belirlediğimiz kombine dozların 24 saat boyunca MCF-7 hücrelerine uygulanması, uygun dozlarda sinerjizm yakalanmadığı için tavsiye edilmemektedir. İleride yapılacak olan çalışmalarda süre faktörünün değiştirilmesi ile iki ajan arasında sinerjizm yakalanabileceği; ayrıca bu kombinasyona ek olarak farklı ajanların eklenmesinin de sinerjizmi arttırabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

[1] Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*. 35, 3147–3154.

[2] Baguley, B.C., Leung, E. (2011). Heterogenity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. In: Gündüz M, Gündüz E, editors. Breast Cancer. *InTECH*; 2011. pp. 245–256.

[3] Yang, M., Li, H., Li, Y., Ruan, Y., Quan, C. (2018). Identification of genes and pathways associated with MDR in MCF-7/MDR breast cancer cells by RNA-seq analysis. *Molecular Medicine Reports*. 17, 6211–6226. doi:10.3892/mmr.2018.8704

[4] Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Perez, J.M. (2008). Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 7, 3–18. doi:10.2174/187152007779314044

[5] Dasari, S., Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 740, 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025

[6] Yde, C.W., Issinger, O.G. (2006). Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D1. *International Journal of Oncology*. 29, 1397–1404. doi:10.3892/ijo.29.6.1397

[7] Ali, B.H., Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. *Phytotherapy Research*. 17, 299–305. doi:10.1002/ptr.1309

[8] Darakhshan, S., Bidmeshki Pour, A., Hosseinzadeh Colagar, A., Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*. 95–96, 138–158. doi:10.1016/j.phrs.2015.03.011

[9] Jafri, S.H., Glass, J., Shi, R., Zhang, S., Prince, M., Kleiner-Hancock, H. (2010). Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 29, 1–11. doi:10.1186/1756-9966-29-87

[10] Alaufi, O.M., Noorwali, A., Zahran, F., Al-Abd, A.M., Al-Attas, S. (2017). Cytotoxicity of thymoquinone alone or in combination with cisplatin (CDDP) against oral squamous cell carcinoma in vitro. *Scientific Reports*. 7, 1–12. doi:10.1038/s41598-017-13357-5

[11] Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*. 70, 440–446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947

[12] Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J. (1999). Global Cancer Statistics: 2011. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 49, 1,33-64. doi:10.3322/caac.20107.Available

[13] Scully, O.J., Bay, B.-H., Yip, G., Yu, Y. (2012). Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*. 9, 311–320. doi:10.1007/978-981-32-9620-6_9

[14] Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 7, 573–584. doi:10.1038/nrc2167

[15] Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., et al. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 31, 1869–1883. doi:10.1038/onc.2011.384

[16] Pogribny, I.P., Filkowski, J.N., Tryndyak, V.P., Golubov, A., Shpyleva, S.I., Kovalchuk, O. (2010). Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *International Journal of Cancer*. 127, 1785–1794. doi:10.1002/ijc.25191

[17] Chavoshi, H., Vahedian, V., Saghaei, S., Pirouzpanah, M.B., Raeisi, M., Samadi, N. (2017). Adjuvant therapy with silibinin improves the efficacy of paclitaxel and cisplatin in MCF-7 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 18, 2243–2247. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2243

[18] Jänicke, R., Anderson, M., Jänicke, R., Deveraux, Q.L., Krajewski, S., Ja, R.U., et al. Caspase-3 is essential for procaspase- 9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells Related papers. *Cancer Research*. , 4386–4390.

[19] Crescenzi, E., Varriale, L., Iovino, M., Chiaviello, A., Veneziani, B.M., Palumbo, G. (2004). Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3, 537–544. doi:10.1158/1535-7163.537.3.5

[20] Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., et al. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. 59, 365–378. doi:10.1016/j.phrs.2009.01.017

[21] Imran, M., Rauf, A., Khan, I.A., Shahbaz, M., Qaisrani, T.B., Fatmawati, S., et al. (2018). Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 106, 390–402. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.159

[22] Aslan, M., Afşar, E., Kırımlıoglu, E., Çeker, T., Yılmaz, Ç. (2021). Antiproliferative Effects of Thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 Liver Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and ER Stress. *Nutrition and Cancer*. 73, 460–472. doi:10.1080/01635581.2020.1751216

[23] Woo, C.C., Loo, S.Y., Gee, V., Yap, C.W., Sethi, G., Kumar, A.P., et al. (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR-γ pathway. *Biochemical Pharmacology*. 82, 464–475. doi:10.1016/j.bcp.2011.05.030

[24] Dastjerdi, M.N., Mehdiabady, E.M., Iranpour, F.G., Bahramian, H. (2016). Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line. *International Journal of Preventive Medicine*. 2016-April, 3–8. doi:10.4103/2008-7802.180412

[25] Motaghed, M., Al-Hassan, F.M., Hamid, S.S. (2013). Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacognosy Research*. 5, 200–206. doi:10.4103/0974-8490.112428

[26] Aggarwal, B.B., Ichikawa, H., Garodia, P., Weerasinghe, P., Sethi, G., Bhatt, I.D., et al. (2006). From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: Identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 10, 87–118. doi:10.1517/14728222.10.1.87

[27] Soyocak A., Koç, G. (2020). Effect of black grape extract on MMP-9 gene expression in breast cancer cells. *Biological Diversity and Conservation.* 824105, 194-199. doi: 10.46309/biodicon.ü.