

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE TİMOKİNON VE 5-
FLUOROURACİLİN TERAPOTİK ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kolon kanseri, gelişmiş ülkelerde kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla 2 ve 3. sırada yer alan en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Kolon kanserinde rutin tedavi olan 5-Fluorouracil'in (5-FU) %30 başarısı alternatif tedavi yöntemleri arayışına neden olmuştur. Son yıllarda bitkisel kaynaklı doğal etken maddelerin kanser tedavisi üzerinde etkileri yanında konvansiyonel tedavilerle kombine edilmesi ile ilgili araştırmalar yoğunlaşarak sürmektedir.

Bu çalışmada amacımız, rutin tedavide kullanılan 5-FU ile *Nigella sativa*'nın etken maddesi Timokinon'nun (TQ) kolon kanseri üzerine kombine tedavisinin sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve anti-kanser etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılması ve olası etki mekanizmaların aydınlatılmasıdır.

Kolon kanser hücrelerine (LoVo) ilk olarak transfeksiyon ile Lusiferaz geni transfekte edildikten sonra hücre kültürü ortamında farklı konsantrasyonlarda TQ, 5-FU ve kombinasyonlarına maruz bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra ATP yöntemiyle luminometrik olarak sitotoksisite, comet assay yöntemi ile DNA hasarı, luminometrik yöntem ile hücre içi glutatyon düzeyi, florometrik yöntem ile mitokondriyal membran potansiyeli, akridin turuncusu/etidyum bromür boyası ile floresans mikroskopta apoptoz, *annexin V-FITC* boyası ile akış sitometrisinde apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu *western blot* yöntemiyle çalışıldı. Kontrol, TQ, 5-FU ve kombine olmak üzere beş grup *nude* fareye transfekte LoVo hücreleri zenograft yöntem ile subkutan olarak enjekte edildi. 3 hafta sonra oluşturulan tümörlerin tedavisine geçilip, yalnız TQ, yalnız 5-FU ve kombine gruplarına 3 hafta boyunca tedavi uygulandı. Tedavi sonucunda *in vivo* canlı hayvan görüntüleme sistemi ve kumpasla tümör boyutları ölçüldü. Ayrıca tedavi bitiminde alınan kanlarda oksidatif stres ve enflamasyon belirteçleri incelendi. Alınan doku örneklerinde de büyüme faktörleri ve vaskülerizasyon belirteçleri incelendi.

In vitro ortamda LoVo hücreleri üzerinde TQ ve 5-FU ile yapılan tekli terapiye göre kombine terapilerin, tekli tedaviye göre düşük dozlarının sitotoksisiteyi, DNA hasarını, apoptozu ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin düzeylerini arttırırken, mitokondriyal membran potansiyelini ve glutatyon düzeylerini düşürdüğü tespit

edilmiştir. Ayrıca anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu düşerken apoptotik proteinler Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9, P-53 ve P-21'in protein ekspresyonu artmıştır. Zenografik yöntemle oluşturulan *in vivo* kolon kanserinde ise kombine tedavinin tekli terapilere göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Tümör boyutu küçülürken, dokuda TGFβ1 düzeyi ve vaskülerizasyon belirteci VEGF düzeyleri azalmıştır. Tedavi sonrası alınan plazmalarda pozitif kontrole göre oksidatif stres düzeyleri düşmüştür.

Elde ettiğimiz veriler, rutin tedavide kullanılan 5-FU yanında bitkisel kökenli TQ'nun kombine kullanımının hem *in vitro* hem de *in vivo* oluşturulan kolon kanserinde anti-tümör etkilerini arttırdığını ve tedaviye bağlı yan etkileri azalttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, 5-Fluorourasil, kolon kanseri, IVIS

INVESTIGATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* THERAPOTIC EFFECT OF THYMOQUINONE AND 5-FLUOROURACIL ON COLON CANCER CELLS

SUMMARY

Cancer is a major public health issue worldwide. In developed countries, colon cancer is the 2nd most common observed type of cancer in women and the 3rd most common in men. The 30% success of 5-FU, which is a routine treatment for colon cancer, has led the researchers to seek different treatment modalities. Therefore, plant-derived natural substances have become the target of a significant amount of attention. In recent years, increasing efforts have been made to discover the effects of combined plant-derived substances with conventional therapy methods on cancer.

This study aimed to investigate the cytotoxic, genotoxic, apoptotic, and anti-cancer effects of thymoquinone – the active ingredient of *Nigella sativa* – and 5-Fluorouracil in combination against *in vitro* and *in vivo* colon cancer while illuminating possible action mechanisms.

Initially, Luciferase transfection was performed in LoVo colon cancer cells to which TQ, 5-FU, and combinations of different concentrations were given, and they were incubated for 24 hours. Luminometric cytotoxicity by ATP method, DNA damage by comet assay, luminometric intracellular glutathione level, fluorometric mitochondrial membrane potential, apoptosis by fluorescence microscopy with acridine orange/ethidium bromide dye, apoptosis in flow cytometry by annexin V-FITC dye, expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins with western blot method have been investigated. Transfected LoVo cells have been injected subcutaneously to five groups of nude mice for the following: control, TQ, 5-FU, and combined. 3 weeks of treatment with TQ, 5-FU, and combined therapy have been initiated 3 weeks after the injection. At the end of this period, tumor size was measured with the IVIS device and caliper. Also, oxidative stress and inflammation markers were examined in blood and growth factors, and vascularization markers were examined in tissue samples at the end of the treatment.

Compared to the monotherapy with TQ and 5-FU on colon cancer, combined treatment has been found in low doses to increase cytotoxicity, DNA damage, apoptosis and intracellular reactive oxygen species in the cell culture studies, while decreasing mitochondrial membrane potential and glutathione levels. Also, the expression of apoptotic proteins Bax, Caspase-3, Caspase-9, p53, and p21 increased while the anti-apoptotic protein Bcl-2 expression decreased. Combination therapy was found to be more effective than mono therapies *in vivo* colon cancer, which was formed by the

xenographic method. While tumor size decreased, TGF β 1 levels and VEGF levels – a vascularization indicator – were decreased in the tissue. In the plasma taken after treatment, oxidative stress levels decreased compared to the positive control group.

According to the data obtained through this study, in colon cancer TQ has been found to increase the anti-tumor properties of the routine therapy of 5-FU *in vitro* and *in vivo* while diminishing the side effects profile.

Keywords: Thymoquinone, 5-Fluorouracil, colon cancer, IVIS