

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

G Maddesi ve Thymoquinone'nun Diyabet Fare Modelinde Pankreas Beta Hücrelerinin Yenilenmesi Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak ve Gen Ekspresyon Düzeyinde İncelenmesi

Proje No: TOA-2014-4877

Proje Türü - ÖNAP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürüttücsü:

Adı Soyadı: Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR
Birim/Bölümü: ERÜ TIP Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D.

Araştırmacıların Adı Soyadı: Arş.Gör. Sedat SEZEN (1)

Prof.Dr. Halit CANATAN (1)

Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ (3)

Prof.Dr. PATRICK COLLOMBAT (Başka Üniversite Mensubu)

Öğrenci HURİYE AKSU (1)

Arş.Gör. MUSTAFA ÇAKIR (1)

Öğrenci ALİ TURAN (1)

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL (2)

Öğr.Gör. Kenan İZGİ (4)

Arş.Gör. Muhammet Ensar DOĞAN (2)

Birim/Bölümü: ERÜ TIP Fakültesi, 1, Tıbbi Biyoloji, 2, Tıbbi Genetik, 3, Histoloji ve 4, Tıbbi Biyokimya A.D.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	25
6. KAYNAKLAR	27

ÖZET

Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM), genellikle insülin üreten pankreatik β hücrelerinin immün aracılı tahribiyle meydana gelen ve bu tahribat neticesinde mutlak insülin yetersizliğiyle karakterize bir hastaliktır. Farelerde Streptozosin (STZ) enjeksiyonuyla T1DM modeli oluşturulmaktadır. Thymoquinone (TQ), *Nigella sativa*'nın biyoaktif komponentidir. Deneysel çalışmalarla STZ ile indüklenerek oluşturulan diyabetik hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda, TQ'nun hipoglisemik ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, G maddesi ve Thymoquinone'un diyabet fare modelinde terapötik potansiyelini ve Beta hücre yenilenmesine katkısını belirlemek, bu maddelerin diyabet fare modelinde pankreasta meydana getirdiği gen ekspresyon değişikliklerini açığa çıkarmak ve Thymoquinone'un hücre kültüründe meydana getirdiği gen ekspresyon değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamında, Diyabet oluşturulmuş farelerde TQ ve G maddesi uygulamaları gerçekleştirilmiş ve bu deney gruplarında kan şeker seviyelerini TQ ve G maddesinin kısmi olarak düşürdüğü gösterilmiştir. İnsüline spesifik immünohistokimya ile pankreastaki B hücre adacıkları skorlanmış ve G maddesinin diyabetik farelere kıyasla anlamlı şekilde skoru artırdığı gösterilmiştir ($P=0.03$). TQ ile muamele sonucu adacık skoru artmasına rağmen, P değeri anlamlı değere ulaşamamıştır ($P=0.26$). Pankreaslarda mikroarrayler ve Real-Time PCR metodları kullanılarak gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. TQ tarafından üretimi artırılan genlerin ağırlıklı olarak hücre çoğalması ve yara iyileşmesiyle ilgili olduğu görülmüştür. Ayrıca rejenerere olan B hücre adacıklarında üretilen faktörlerden olan Reg2 (52 kat), Reg3a (9 kat), Reg3b (13 kat), regenerating islet-derived 2, 3a, 3b genlerinin ekspresyonu TQ ile muamele edilen fare pankreaslarında 10-50 kat artmış görülmektedir. Yine TQ tarafından pankreasta çok sayıda G-proteine bağlı reseptörlerin ve olfactory reseptörlerin ekspresyon seviyeleri etkilenmektedir ($P=6.9E-155$).

Sonuç olarak TQ diyabet farelerin pankreasında B hücre adacıklarında kısmi onarım sağlamaktadır. Bu artışın moleküler mekanizmaları incelendiğinde yara iyileşme faktörlerinin ve adacık rejenerasyonunda rol alan Reg2, Reg3a ve Reg3b genlerinin önemli rolü olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Thymoquinone, Tip 1 Diyabet, Gen Ekspresyon Analizleri, Yara İyileşmesi

ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) occurs generally through destruction of pancreatic Beta cells by the immune system and insulin deficiency is the characteristics of this disease.

Streptozotocin (STZ) is used to induce T1DM model in mice. Thymoquinone (TQ), is the active component of *Nigella sativa*. TQ has been shown to have antidiabetic and hypoglycemic effects in diabetic animal models.

In this study, it's aimed to determine the therapeutic and regenerative potential of TQ and G compound (G), to find out gene expression profile of pancreas of diabetic mice treated with these compounds and to find out gene expression profile of cells treated with TQ.

Diabetic mice were treated were treated with TQ and G and blood glucose levels of diabetic mice were found to be decreased by these compounds. Pancreas Beta cells were scored using Insulin specific immuno staining and G was found to increase the scoring in diabetic mice ($P=0.03$). Tq treatment was also found to increase the scoring relatively, however the increase was not significant ($P=0.26$). In pancreas of mice of experimental groups, gene expression analysis was performed using microarrays and Real-Time PCR. TQ was found to upregulate genes involved cell proliferation and wound healing. Reg2 (52 folds), Reg3a (9 folds) and Reg3b (13 folds) that were produced by regenerating pancreatic islands, were found to be 10-50 folds upregulated by TQ. TQ was also found to modulate the expression of many G-protein coupled receptors and olfactory receptors in pancreas of diabetic mice ($P=6.9E-155$).

As a result, TQ induces partial recovery of the Beta cell islands in pancreas of diabetic mice. When the molecular mechanisms involved in this recovery was investigated, wound healing factors and Reg2, Reg3a and Reg3b genes involved in pancreatic island regeneration seems to have a role.

Keywords: Thymoquinone, Type 1 Diabetes, Gene Expression Analysis, Wound Healing

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışma kapsamında Thymoquinone (TQ) isimli etken maddenin diyabetik fare modelinde terapotik etkinliği, pankreas rejenerasyonuna etkisi ve bu süreçte etkilediği genler incelenmiştir. Bu çalışmada hayvan modelinin oluşturulmasından sonra ağırlıklı olarak immünohistokimya, Real-Time PCR ve mikroarray metodları kullanılmıştır.

Çalışmanın başlıca amaçları şagıdaki gibidir.

- 1. Farelerde streptozotocin (STZ) adlı kimyasal kullanılarak diyabet modeli oluşturmak**
- 2. G maddesi ve Thymoquinone'un diyabet fare modelinde terapötik potansiyelini ve Beta hücre yenilenmesine katkısını belirlemek**
- 3. G maddesi ve Thymoquinone'un diyabet fare modelinde pankreasta meydana getirdiği gen ekspresyon değişikliklerini açığa çıkarmak**
- 4. Thymoquinone'un hücre kültüründe meydana getirdiği gen ekspresyon değişikliklerinin araştırılması**

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABET

Diyabet, insülin eksikliği ya da insülin etkisinde meydana gelen bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, bunun sonucunda hiperglisemiye neden olan kronik bir metabolizma hastalığıdır [1, 2].

Diyabetin gelişiminde birçok patolojik süreçler önemli rol oynamaktadır. Patolojik olan bu süreçler, insülin etkisine karşı gelişen dirençten insülin eksikliğiyle pankreasın Beta hücrelerindeki otoimmün yıkımına kadar geniş bir skala içerisindeidir. İnsülin eksikliği ve/veya insülin direnci neticede kan glukoz seviyesini artırmakta ve hiperglisemi oluşturmaktadır [3]. İnsülinin bu şekilde bozukluk göstermesi, diyabetli hastalarda karbonhidrat, yağ ve proteinlerde meydana gelen anormalliklerin temelini oluşturmaktadır [4].

İnsülinde meydana gelen bozukluk, yetersiz insülin salgılanması veya insülin sinyal iletim yolaklarında oluşacak bir veya birden fazla anormalliklerden kaynaklanmaktadır.

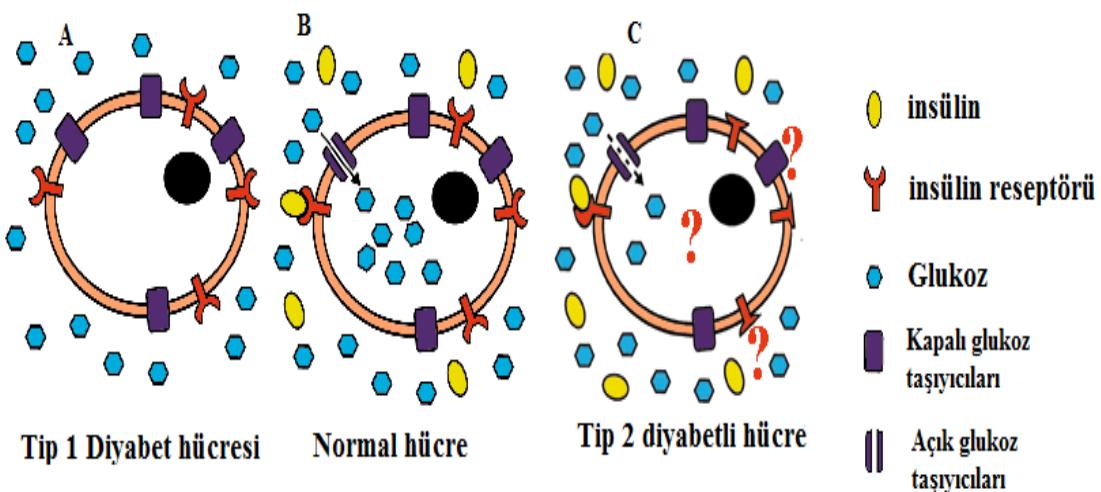
Diyabet, hiperglisemi sonucu gözlerde, böbreklerde, sinirlerde kalp ve damar sistemi gibi çeşitli yapılarda kronik komplikasyonlara yol açarak bu organların fonksiyonlarını bozan bir hastalıktır. Hiperglisemiye bağlı gelişen en belirgin semptomlar arasında kilo kaybı, poliüri, polidipsi, bazen polifaji, görmede bulanıklık ve büyümeye geriliği sayılabilir [5].

Diyabetin akut metabolik komplikasyonlarının yanında uzun süren dönemlerinde körlüğe neden olan retinopati [6], böbrek yetersizliği ile sonuçlanan nefropati [7], ayak yaraları ve ampütyasyona yol açan nöropati [8] ve ayrıca damar hastalığı, kardiyovasküler, gastrointestinal sistem bozukluklarına yol açabilen otonom nöropati, cinsel fonksiyon bozukluğu gibi kronik komplikasyonlarla seyreden morbidite ve erken mortalite riski yüksek bir hastalıktır [9].

Diyabetes mellitus sınıflandırılmasında hiperglisemiye neden olan patolojik sebeplerden faydalananlarak bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Bu bağlamda, Amerikan Diyabet Derneği, Diyabetes mellitusun sınıflandırmasını Tip 1 Diyabetes Mellitus, Tip 2 Diyabetes Mellitus, Diğer spesifik türler ve Gestasyonel Diyabetes Mellitus olmak üzere 4 ana başlık altında toplamışlardır [1] (Şekil A).

2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM), genellikle insülin üreten pankreastik β hücrelerinin doğrudan ve/veya dolaylı yollarlaimmün aracılı bağışıklığı tahribatıyla meydana gelen ve bu tahribat neticesinde mutlak insülin yetersizliğiyle karakterize bir hastalıktır [10, 11]. Tarihsel olarak bakıldığından T1DM, daha çok çocuksal bir rahatsızlık olarak görülsede, bu görüş son on yıl içerisinde yapılan araştırmalar ışığında değiştigini göstermiştir. Yapılan bu çalışmalarda polidipsi, polifaji ve poliüri gibi hastalığın başlangıcı ile ilişkili septomların birtakım yetişkin bireylerde de gözlenendiği görülmüştür. T1DM hastaları pankreatik β hücrelerindeki harabiyet neticesinde insülin üretemedikleri için hayatları devam ettiği müddetçe dışarıdan insülin takviyesi almaları gerekmektedir. Günümüzde hala T1DM hastalığının tedavisinde kullanılan kesin bir tedavi olmamakla beraber bu noktada yapılan çalışmalar devam etmektedir.



Şekil A. T1DM ve T2DM hücrelerinin normal hücre ile karşılaştırılması. Tip 1 diyabette insülin eksikliği neticesinde gelişen bir hastalık olduğu gösterilmiştir. Normal hücre reseptörlerinde ve taşıyıcılarda herhangi bir sorun yok. Tip 2 diyabetli hücrede insülin reseptörlerinde meydana gelen bozukluklar neticesinde glukoz taşıyıcılarında meydana gelen kısmi işlevsizlik sonucunda gelişen hastalık.

2.1.2. Diyabet Modelleri

2.1.2.1. İn Vivo Modeller

Birçok hastalıktan korunma ve tedavi yollarının araştırılması, aynı zamanda bu hastalıkların patogenezinin araştırılması amacıyla deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Genellikle insandaki hastalıkları taklit eden ve çalışılabilirliği etik olarak engel teşkil etmeyen hayvanlar üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir.

İnsanlarda yaygın bir hastalık olan diabetes mellitusun oluşmasında rol alan moleküler mekanizmaların araştırılmasında, engellenmesi ve yan etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı metodlar kullanılarak deneysel diyabet modelleri oluşturulmuştur [12].

Tip 1 Diyabet Modelleri;

1. Cerrahi yöntem ile oluşturulan modeller
2. Kimyasal ajanlar ile indüklenecek oluşturulan modeller
3. Spontan şekilde oluşan modeller
4. Virüsle oluşturulan modeller
5. Transgenik tip modeller

Tip 2 Diyabet Modelleri

1. Cerrahi yöntem ile oluşturulan modeller

2. Kimyasal ajanlar ile induklanerek oluşturulan modeller
3. Spontan şekilde oluşan modeller
4. Diyet ile oluşturulan modeller
5. Transgenik-Knockout tip modeller

Cerrahi yöntem kullanılarak oluşturulan diyabet modelleri

Pankreatektomi yöntemi kullanılarak pankreasın tamamı ya da pankreasın kısmi olarak çıkartılan işlemidir. Pankreasın tamamının çıkarılmasıyla Tip 1 Diyabet modeli, kısmi pankreatektomi işlemi uygulaması yapılarak pankreastaki beta hücrelerinin yaklaşık %60'ının çıkarılma işlemiyle de Tip 2 diyabet modeli oluşturulmaktadır [13]. Bu tür cerrahi işlemler büyük canlılarda denenmiştir [14]. Ancak günümüzde bu metod kullanımı azalmıştır.

Kimyasal ajanlar ile oluşturulan diyabet

Streptozosin (STZ) ve Alloksan diyabet model oluşturmada en çok kullanılan kimsayasal ajanlardır.

ALLOKSAN (2,4,5,6 Tetraokzohekzahidropirimidin)

Alloksan suda kolayca çözünebilen monohidrat yapısında olan, ürik asidin nitrik ası tarafından oksidasyonu ile elde edilen kimyasal ajandır [15]. Alloksan, hidrofilik özelliği ve kimyasal yapısı sayesinde glukozu taklit ederek pankreas beta hücrelerine rahatlıkla nüfuz edebilmektedir [16]. Bu şekilde iki mekanizma aracılığıyla diyabete neden olduğu düşünülmektedir. İlk olarak alloksan glukokinaz enzimini inhibe ederek pankreastaki beta hücrelerinin salgıladığı insülin salınımını inhibe etmektedir [17]. İkinci mekanizma ise beta hücresinde toksik etki oluşturan reaktif oksijen türlerinin oluşturarak nekroza neden olup insülin salınımını inhibe etmektir [18]. Bu şekilde pankreas beta hücrelerini hasara uğratarak doza bağlı olarak diyabete neden olduğu belirtilmektedir [19, 20].

Farelerde alloksan kullanılarak yapılan diyabet çalışmalarında, fareler öncelikle 18 saat aç bırakıldıktan sonra günde 150 mg/kg dozda, su yada serum fizyolojik sıvı içerisinde çözündürülüp periton içi yolla 48 saat arayla 3 kez olarak enjekte edilir. Son enjeksiyondan itibaren 7-9 gün sonrası fareler 18 saat aç bırakıldıktan sonra kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden kan alınarak ölçülür. Açılk kan şeker düzeyi 200 mg/dL üzerinde olanlar diyabet fare olarak kabul edilir [21].

Alloksan periton içi uygulamasının dışında intravenöz ve deri altı olarak da enjekte edilebilmektedir. Intravenöz uygulamanın diğer yöntemlerden 2-3 kat daha verimli olduğu tespit edilmiştir. Intravenöz uygulamarda ortalama doz 65 mg/kg verilirken, periton içi ve deri altı uygulamalarda ortalama 150 mg/kg şeklinde doz ayarlaması gerçekleştirilir [22, 23].

Steptozotosin

Streptozotosin, Streptomyces achromogenes suşundan elde edilen, 2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüreido) D-Glukopiranoz'dur. Yapısında glukoz moekülü bulunduğu için plazma membranında bulunan glikoz taşıyıcısına (GLUT2) bağlanıp insüline salınının inhibe ederek pankreasındaki beta hücrelerine toksitesini gösterir [24]. Böylelikle doza bağlı STZ uygulamasıyla hem insüline bağımlı, hemde insülden bağımsız modeller oluşturulabilmektedir [19]. Glut2 aracılığıyla beta hücrelerine giren STZ, nitrik oksit düzeyini etkileyerek, mitokondriyal ATP üretimini azaltır. Bunun neticesinde DNA hasarı oluşarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunda artma görülmektedir [25].

Streptozotosin yapılacak çalışmanın durumuna göre doz oranları düşük 40 mg/kg, toksik yaklaşık 60-70 mg/kg, yüksek doz 150-200 mg/kg olarak uygulanmaktadır [26]. Çakmak A. ve ark. farelere 250 mg/kg serum fizyolojik içerisinde damar içerisinde streptozosin verilmiştir. Streptozosin enjeksiyonunda 10 gün sonra kan glukoz seviyeleri ölçülmüş ve 300 mg/dL üzerinde olan değerler diyabetik model olarak kabul edilmiştir [27]. Sitrat tamponu içerisinde çözülen STZ farelerde tek doz halinde 200 mg/kg periton içi uygulanmaktadır [28]. Ayrıca tek doz 150 mg/kg periyon içi yoluyla verildiğinde de diyabet oluştuğu gözlenmiştir [29].

2.2. Timokinon (TQ)

2.2.1. Nigella Sativa

Nigella sativa yaygın olarak çörek otu olarak bilinen, Pakistan, Hindistan ve Akdeniz ülkelerinde yoğun olarak yetişen, *Ranunculaceae* (Düğün çiçeğiller) familyasından, 20-30 cm yükseklikte, tek yıllık çiçekli bir bitkidir. Uzun yillardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakla beraber günümüzde gıda üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır [30-33]. Ülkemizde başlıca Konya, Kütahya, Isparta, Antalya olmak üzere 12-14 arasında *Nigella* türü yetişmekte olup, özellikle *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, ile *Nigella arvensis* türleri yaygın olarak kullanılmaktadır [34].

2.2.2. Timokinon;

Çörek otunun biyoaktif komponenti olan timokinon ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) (Şekil 2.2.), uçucu yağında %18-24 oranında bulunan ve 164,2 g/mol moleküller ağırlığına sahip sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpendir [35, 36].



Şekil.2.2. Timokinon morfolojik ve moleküler yapısı

2.2.3. Timokinonun Etki Alanları

2.2.3.1. Antidiyabetik Etkisi

Diyabetes Mellitus organizmadaki insülin sentezi yetersizliği ya da insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Deneysel çalışmalarında STZ ile induklanerek oluşturulan diyabetik hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda, TQ hipoglisemik ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [37-40]. TQ'nun insülin sekresyonu üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, TQ'nun, insülin sekresyonunu yükselttiği ve buna bağlı olarak glikoz alımını artırdığı ve glukoneogenez oluşumunu inhibe ederek kan glukoz seviyesinin düşmesini sağladığı belirtilmiştir [36, 38]. Ratlarda Streptozotocin (STZ) ile induklanmış diyabet modelinde, *Nigella sativa* ucu muamele yağıyla edilen ratlarda, serum glikoz seviyeleri düşerek normale yaklaşmış, serumdaki insülin miktarının arttığı gözlemlenmiş ve pankreas Beta hücrelerinde kısmen rejenerasyon olduğu tespit edilmiştir [39]. Yapılan diğer bir çalışmada, kan glukoz seviyelerinin araştırılmasında klinik olarak önemi sahip belirteci olan HbA1C üzerine TQ'nun etkisi araştırılmış ve TQ'nun HbA1C (şekere bağlı hemoglobin seviyesi) seviyesi anlamlı şekilde düşürdüğü bildirilmiştir [36]. Aynı çalışmada, karaciğer enzim aktivitesini de iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca su ve katı yiyecek alımını dengeleyerek vücut ağırlığının normale yaklaşmasını sağladığı gözlenmiştir [36]. STZ ile induklanmış diyabet rat modelinde artan lipid peroksidasyon ve nitrik oksit seviyeleri, *Nigella sativa* ucu muamelesiyle tersine dönmüş ve antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir [40]. Aynı şekilde STZ ile induklanan diyabetik ratlarda TQ ile çalışmalar tekrarlanmış ve serum glikoz seviyelerinin düşüğünü ve buna bağlı olarak serumdaki insülin miktarında artış görülmüştür. Ayrıca diyabet rat modelinde, TQ ile muamele edildiğinde, pankreasta insülin üreten Beta hücrelerinde de önemli derecede artış tespit edilmiştir [41]. Yine STZ ile oluşturulan diyabetik

ratlarda, TQ'nun pankreastaki beta hücre üzerine etkisi daha detaylı araştırılmış, STZ sonucu oluşan birçok toksik etkinin TQ uygulamasıyla pozitif yönde düzeldiği gösterilmiştir [42]. Diğer bir çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulan farelerde gebelik döneminde TQ uygulaması yapılmış, embriyoların gelişimde ve boyutlarında artışın gözlendiği, ayrıca toksik etkilere neden olabilecek serbest radikallerin miktarında azalmayı sağlayarak sakat doğma oranlarını düşürdüğü görülmüştür [43].

2.2.3.2. Antitümör ve antikanser etkisi

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar *N.sativa* tohumlarının hem yağı hem aktif maddesi olan TQ'nun antitümör etkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada TQ'nun doza bağlı olarak hepatoselüler karsinoma hücrelerindeki proliferasyonu önemli ölçüde yavaşlatıldığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, pankreatik kanser hücrelerinde TQ'nun etkisi gemzar denilen kemoterapotik madde ile birlikte in vivo ve in vitro olarak araştırılmıştır. Farelerde oluşturulan kanser modelinde ve in vitro kanser hücre hatlarında uygulanan gemzar ve TQ' nun tümör büyümeyi engellediği ve pankreatik kanser hücrelerinin apoptozunu artırdığı görülmüştür. Aynı zamanda anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-xL, XIAP'ın aşağı regülasyonunu, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax gibi proapoptotik moleküllerin yukarı regülasyonunu sağladığı gözlemlenmiştir [44]. Başka bir çalışmada, kolanjiyokarsinom(CCA) hücrelerinde yine mezardan kemoterapik ajan ile TQ'nun etkisi araştırılmış, in vitro olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini in vivo olarak da tümör hücre büyümeyi ve anjiogenezini engellediği belirtilmiştir. Ayrıca PI3K/AKT ve NF- κ B ve gen ürünlerinin düzenleyicileri AKT, p65, XIAP, Bcl-2, COX-2, VEGF aşağı regule olduğu tespit edilmiştir [45]. Başka bir çalışmada, *N.sativa* yağı ve TQ' nun insan servikal kanser hücresi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. HeLa hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada TQ' nun kanser hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiği, pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını indüklerken (BIK, FASL, BCL2L10 ve CASP1), kanser ve NF-kappa-B sinyali ve kanserden sorumlu anti-apoptotik genlerdeki ekspresyon seviyesini de düşürdüğü belirtilmiştir [46]. Diğer bir çalışmada, fareler üzerinde oluşturulan kanser modelinde karaciğer toksisitesi oluşturulan CB 1954 (5-(Aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide) maddesiyle TQ kombinasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda TQ' nun karaciğer toksisitesine neden olan CB 1954 maddesinin etkisini azalttığı, buna bağlı olarak karaciğer enzimleri AST ve ALT miktarının normal düzeylere getirdiği belirtilmiştir. Ayrıca tümör boyunda ve buna bağlı kitle ağırlıklarında da TQ uygulanan grup ile kontrol grubu arasında önemli oranlarda farklılıklar gözlemlenmiştir [47]. Yapılan başka bir çalışmada, insan miyoblastik kanser hattı olan

hl-60 hücreleri üzerinde TQ' nun etkisi araştırılmış. Çalışma sonucunda TQ' nun HL-60 hücre hattı üzerinde antiproliferasyon etki gösterdiği, mitokondrinin membran yapısını bozduğu, kaspaz 3,8,9 aktivasyonlarını düzenleyerek apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca, TQ ile muamelede bulunan HL60 hücrelerinde proapototik Bax proteini yukarı regüle ederek, antiapoptotik protein olan Bcl2' yi ise aşağı regüle ederek Bax/Bcl2 oranının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [48].

2.3. İnsülin

İnsülin, Pankreasın Langerhans adacıklarında transkripte olan, β -hücreleri tarafından üretilen 51 amino asit (aa) uzunluğunda polipeptid bir hormondur (Joshi et al., 2007). İnsan insülini 21 aa A zinciri ve 30 aa B zinciri olacak şekilde çift disülfit bağları içermektedir [49]. İnsülin molekülleri histidin rezidüeleri çinko iyonuna bağlanarak oldukça stabil heksamerler oluştururlar. Endoplazmik retikulumdaki işleme esnasında sinyal peptidin koparılmasıyla proinsülin salınır (Joshi et al., 2007). Proinsülin, B zincirin N-ucundan ve A zincirinin C-ucundan bağlı, aynı zamanda C-peptide içinde barındıran yapıdır. C-peptid, karboksipeptidaz ve akabinde prohormon dönüştürücü 1 ve 2 enzimlerini kullanılarak, disülfid köprüleriyle bağlı olan A ve B zincirlerinden ayrılır [49].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Fare grupları oluşturulması ve diyabet oluşturma

Her bir grupta balb-c (n= 6) erkek fare kullanıldı. Gruplardaki kontrol hariç her bir fareye 200mg/kg STZ enjekte edilerek oluşturuldu. İlk enjeksiyondan 2 ve 4 gün arayla ölçümler yapıldı. Kan şeker değerleri 300 üzerinde olan farelerle devam edildi.

Gruplar

KONTROL,

STZ,

STZ +TQ,

TQ,

STZ+G ,

G olacak şekilde 6 grup oluşturuldu.

Timokinon(TQ) 1.2 mg /kg ip olarak enjekte edildi.

G maddesi 50 mikro molar olarak 200ul enjekte edildi.

Kontrol olarak da 1 ml PBS içinde 1ul DMSO verildi.

PANKREAS İZOLASYONU VE HAZIRLANMASI

Fareler servikal dislokasyonla sakrifiye edilir ve dikkatli bir şekilde pankreas izole edilir.

Pankreas 6'lı well'lerin içinde bulunan PBS solüsyonunun içine konulur . Sonra pankreaslar 4% para-formaldehit solüsyonuna aktarılır ve +4 °C de 20 dakika bekletilir.

Daha sonra 4% para-formaldehit solüsyonundan alınan pankreaslar 6 kez 20'ser dakikalık PBS solüsyonlarına aktarılır. Son yıkamadan sonra Paraffin Embedding işlemi aşağıdaki şekilde yapılır.

PARAFFİN EMBEDDİNG

Solüsyon	Süre
PBS	1 saat
0,86% NaCl	1 saat
50% EtOH	1 saat
70% EtOH	1 saat
80 % EtOH	1 saat

90% EtOH	1 saat
100% EtOH	1 saat
100% Isopropanol	1 saat
Xylol (Toluен)	1 saat
Paraplast	2* 1 saat (60 C)
Paraplast	Over- night

İmmunohistokimya

İzole edilen dokular parafinlendi ve 5 µm eninde kesitler alındı . Slaytlar uygun aparatla 65 °C'lik etüvde 40 dakika bekletildi.

Parafin eridikten sonra aşağıdaki stepler uygulanacak:

Solüsyon	Süre	Tekrar
Xylol	5 dakika	2 defa
95% EtOH	5 dakika	1 defa
80% EtOH	5 dakika	1 defa
60% EtOH	5 dakika	1 defa
30% EtOH	5 dakika	1 defa
ddH2O	5 dakika	2 defa

Slaytlar 3 kez 5'er dakika PBS de yıkanır. Sonra peçete dikkatli bir şekilde kurulanır. Sonra slaytlardaki dokuları içine alacak şekilde Grease pen (yağlı kalem) ile kare çizilir. PBS-FBS 10% solüsyonu dokuların etrafını kapatacak şekilde pipetle slaytların üstüne dökülür ve karanlık bir yerde 45 dakika muamele edilir .

(Dako polyclonal guinea pig anti insulin)Primer antikor Anti-İnsülin-GuineaPig + PBS-FBS 10% 1/500 oranında hazırlanır ve doku kesitlerinin yüzeyini kapatacak şekilde dökülür. Sonra +4 °C de karanlık ortamda slaytlar over-night edilir. Daha sonra slaytlar 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkanır ve sonra dikkatlice kurulanır.

(A11073 goat anti guinea pig)Sekonder antikor (İnsülin-anti- GuineaPig) + PBS-FBS 10% 1/250 oranında hazırlanır ve doku kesitlerinin yüzeyini kapatacak şekilde dökülür. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 45 dakika bekletilir. Daha sonra slaytlar 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkanır ve sonra dikkatlice kurulanır.

Mounting Medium + DAPI solüsyonu slaytlar üzerine damlatılır ve daha sonra lamel lamin üstüne açılı bir şekilde kapatılır. Floresan mikroskopta FITC ve DAPI ile görüntü alınır.

Hücre kültürü

Fare Meme kanser hücre hattı, 4T1 (ATCC), 37°C %5 CO² altında steril koşullarda, %10 FBS (Biochrom) ve Penisilin-Streptomisin (Sigma) ile RPMI-1640 büyümeye medyumu içerisinde kültüre edilmiştir. Fare embriyonik fibroblast, MEF (ATCC), 37°C %5 CO² altında steril koşullarda, %10 FBS (Biochrom) ve Penisilin-Streptomisin (Sigma) ile RPMI-1640 büyümeye medyumu içerisinde kültüre edilmiştir.

Mikroarray Çalışması

KONTROL, STZ, STZ + TQ, TQ, STZ+G fare gruplarında deney sonucunda pankreastan RNA izolasyonu gerçekleştirilerek, gen ekspresyon analizi için Ankara'da bulunan AY-KA ltd. şirketine gönderildi. GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix) mikroarray cipleri kullanılarak tüm genom ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

Real Time PCR Deneyi

Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında RNA izolasyon (Qiagen RNeasy Plus Mini Kit 50 Cat.No. 74134) kit protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu yapıldı ve miktarları ölçüldü. Her bir RNA için 500 ng/ μl konsantrasyonu kullanarak cDNA (RT2 First Strand Kit Cat no.330411) eldesi yapıldı. Daha sonra 2xRT2SYBR Green Mastermix 1350 μl , cDNA 102 μl , RNaz içermeyen sudan 1248 μl katılarak real time pcr mix hazırlandı ve her kuyucuğa 25 μl ilave edildi. Ön inkübasyon 95°C 'de 2 dakika 1 döngü, amplifikasyon, 95°C 'de 15 saniye, 60°C de 1 dakika - 45 döngü, erime eğrisi 60°C 'de 1 dakika olarak ayarlama yapılır. Cihaz olarak Roche LightCycler 480 kullanıldı.

Wound Healing Paneli için;

Hedef Genler:

Acta2, Actc1, Angpt1, Ccl12, Ccl2, Cd40lg, Cdh1, Col14a1, Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col4a1, Col4a3, Col5a1, Col5a2, Col5a3, Csf2, Csf3, Ctgf, Ctnnb1, Ctsg, Ctsk, Cts1, Cxcl1, Cxcl11, Cxcl3, Cxcl5, Egf, Egfr, F13a1, F3, Fga, Fgf10, Fgf2, Fgf7, Hbegf, Hgf, Ifng, Igf1, Il10, Il1b, Il2, Il4, Il6, Il6st, Itga1, Itga2, Itga3, Itga4, Itga5, Itga6, Itgav, Itgb1, Itgb3, Itgb5, Itgb6, Mapk1, Mapk3, Mif, Mmp1a, Mmp2, Mmp7, Mmp9, Pdgfa, Plat, Plau, Plaur, Plg, Pten, Ptgs2, Rac1, Rhoq, Serpine1, Stat3, Tagln, Tgfa, Tgfb1, Tgfbr3, Timp1, Tnf, Vegfa, Vtn, Visp1, Wnt5a

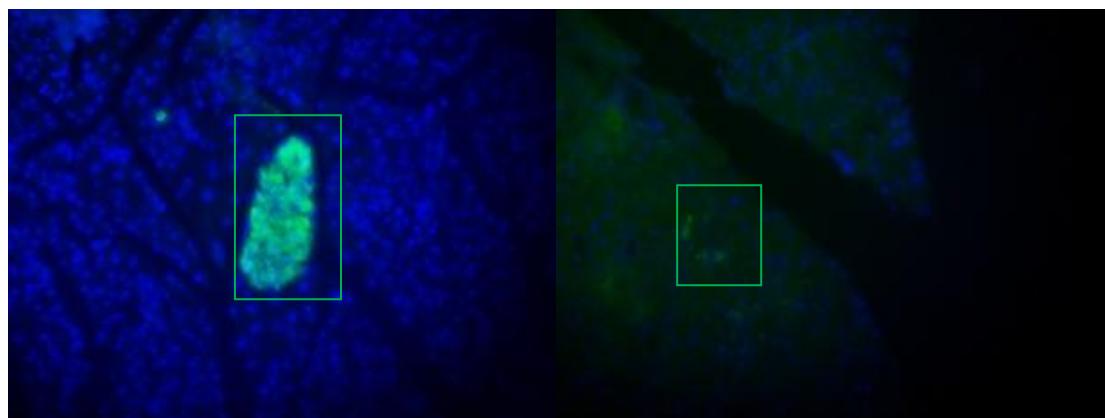
Referans Genler: Actb, B2m, Gapdh, Gusb, Hsp90ab1

4. BULGULAR

Proje kapsamında çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve çeşitli veriler elde edilmiştir.

4.1- immünohistokimya (ihk) çalışmaları optimize edilmiştir. Fare pankreasları alınarak insülin ve glukagon ihkları yapılmış, panreas adacıklarında boyama gösterilmiştir.

Şekil 1: Farelerde pankreasta adacıklarda immünohistokimya ile primer antikorlar ve floresan sekonder antikorlar ile insülin boyaması (solda, kare içinde) ve glukagon boyaması (sağda, sağda kare içinde). DAPI mavi renk ile hücre çekirdeklerini boyarken, FITC sekonder floresan antikorlar yeşil renk ile nihai olarak indirekt şekilde hedef antijeni boyamaktadır.

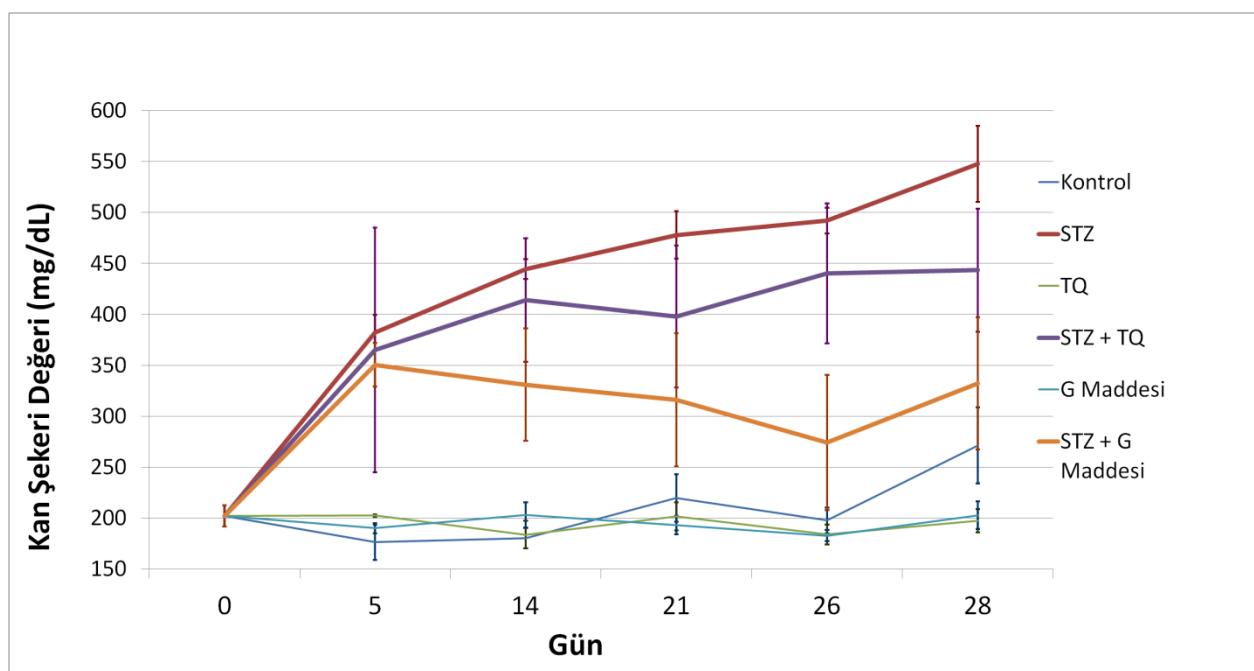


4.2- Farelerde sorunsuz, uzun süreli tolere edilebilen Thymoquinone (TQ) ve G maddesi (G) dozları belirlenmiştir. Günlük olarak TQ dozu 1.2 ve 2.4 mg/kg olarak uygulanırken, G maddesi bir fare için 50 mikrolitre hacim/ 50 mikromolar konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

4.3- Farelerde akut Tip I diyabet modeli oluşturulmuş ve bunun için uygulanacak tek doz STZ miktarı optimize edilmiştir. Bu doz 150 ile 200 mg/kg arasındadır.

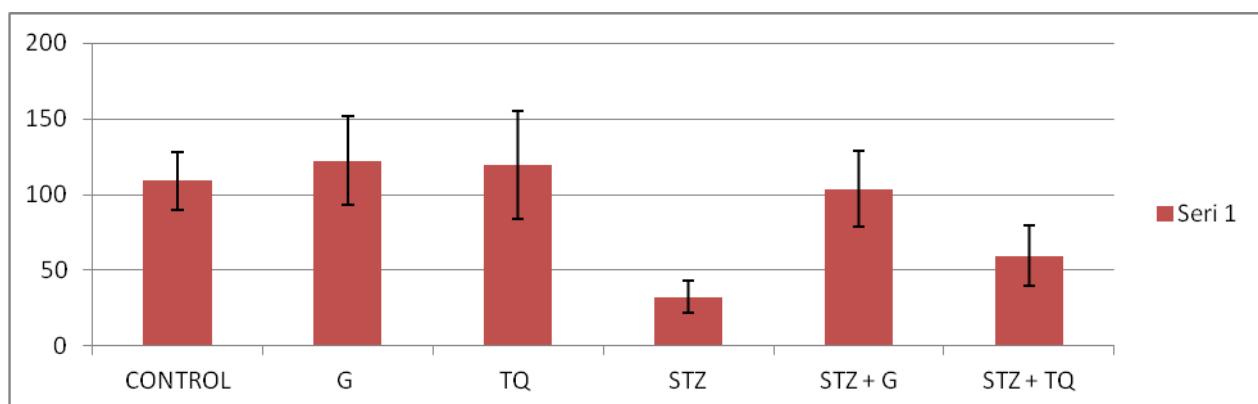
4.4- Diyabet oluşturulmuş farelerde TQ ve G maddesi uygulamaları gerçekleştirilmiş ve bu deney gruplarında kan şeker ölçümleri gerçekleştirılmıştır. Ayrıca bu farelerin pankreasları alınarak ihc ve gen ekspresyon çalışmaları için muhafaza edilmiştir. Aşağıda Şekil-2'de diyabet modelinde TQ ve G maddesiyle muamele edilmiş grupların kan şeker değerlerindeki kısmi düzeltme görülmektedir. Böylece TQ'nun fenotipik olarak diyabet modelinde kan şeker düzeylerine kısmi faydalı etkisi gösterilmiştir.

Şekil-2: STZ: Diyabet modeli, STZ-TQ: TQ ile muamele edilmiş diyabet modeli, STZ-G: G maddesi ile muamele edilmiş diyabet modeli, Kontrol: Herhangi bir muamele olmayan fareler, TQ: sadece TQ verilen normal fareler, G maddesi: sadece G maddesi verilen fareler.



4.5- Deney sonucunda deney gruplarındaki farelerin pankreasları alınarak İHK için kullanılmıştır. Pankreaslarda İnsüline spesifik immünohistokimya boyaması gerçekleştirilmiştir ve her bir farenin pankreasında adacık sayıları belirlenmiştir, ayrıca adacık büyülüğüne göre skorlama yapılmıştır. Böylece uygulanan maddenin diyabetik fare modelinde pankreas adacık sayısına etkisi belirlenmiştir. Şekil 3'te her bir gruptaki adacık skorlama sonuçları ve standart hataları verilmiştir.

Şekil 3:

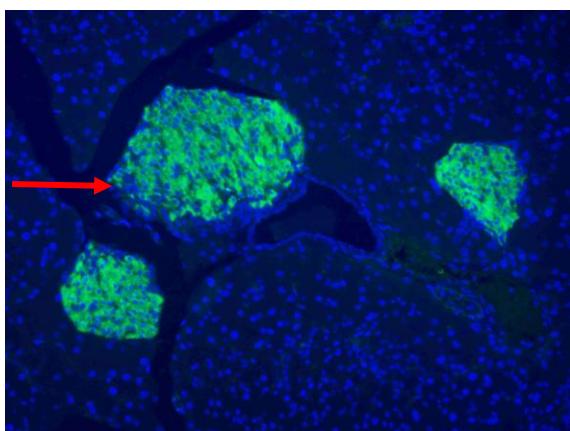


T-testi ile istatistiksel analiz yapılarak, STZ grubu ile STZ+TQ ve STZ+G grupları karşılaştırıldığında, STZ ve STZ+G grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmaktadır ($P=0.03$), ama STZ ve STZ-TQ arasında bir fark olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmamaktadır ($P=0.26$).

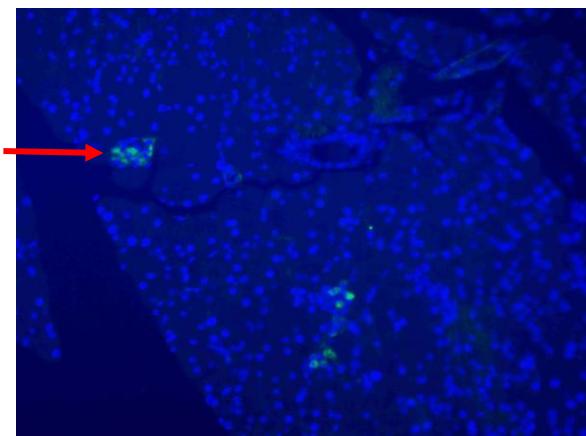
Yapılan İHK boyaması sonucu farklı grupların pankreaslarındaki boyamalar Şekil 4'te gösterilmiştir.

Şekil 4: Farklı grupların pankreaslarında yapılan İnsülin İHK boyaması ve pankreastaki adacıklardan örnekler okla gösterilmiştir.

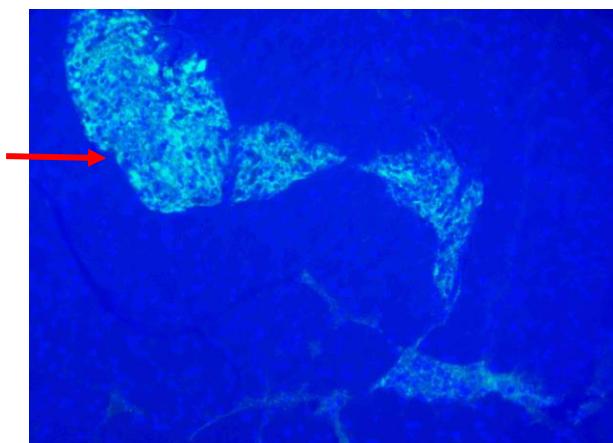
Kontrol:



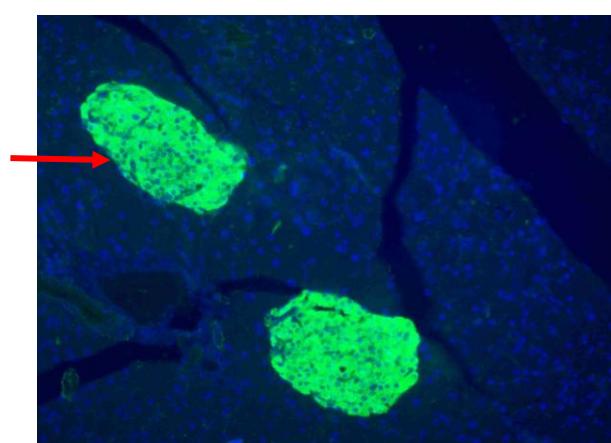
STZ:



STZ+G:



STZ+TQ:



4.6- Farklı deney gruplarından deney sonunda elde edilen pankreaslardan RNA izole edilerek, mikroarray analizi gerçekleştirılmıştır. Mikroarray analizinde farede bulunan genlerin ekspresyon seviyeleri global düzeyde analiz edilmiş ve gruplar arasında mRNA düzeyindeki farklılıklar tespit edilmiştir. TQ'nun terapotik uygulaması sonucu etkilenen genler belirlenmiştir.

Mikroarray sonuçlarının biyoinformatik analizi aşağıda özetlenmiştir.

TQ tarafından STZ modelinde upregüle edilen genler ve P değerleri (STZ-TQ vs. STZ)

Response to Wounding: Cfah, Itgb2, Lipa, Ncf1, Reg3b, saa3, Stat3, Tff1, Tnfrsf1b, P=1.5E-2

Carbonhydrate Binding: Cfah, Cyr61, Lamc2 Lgals3 Reg2 Reg3b Siglec1 Rpl29 Spock2, P=6.6E-3

Cell Proliferation: Cxcr4, Ccnd1, Gnai2, Itgb2, Ifnar2, Lipa, Ncf1, Rpl29, Tacc1, Tnfrsf1b, P=4.6E-4

Önemli genler: Reg2 (52 kat), Reg3a (9 kat), Reg3b (13 kat), regenerating islet-derived 2, 3a, 3b

TQ tarafından STZ modelinde downregüle edilen genler ve P değerleri (STZ-TQ vs. STZ)

G-protein coupled receptor protein signaling pathway: 256 genes, P=6.9E-155

Olfactory receptor, 207 genes, P=1.7E-139

Olfactory transduction, 179 genes, P=2.3E-105

Örneğin: Olfr1278 (-5 fold), Adam34 (-5 fold), Olfr1123 (-4 fold), Olfr115 (-4 fold), Vmr1r210 (-4 fold)

TQ tarafından normal farelerde upregüle edilen genler ve P değerleri (TQ vs. Control)

Pancreatitis-associated protein, Reg2, Reg3a, Reg3b, Reg3d, Reg3g, P=3.5E-9

Response to Wounding, Reg3a, Reg3b, Reg3g, Cd55, Ccl8, Cxcl9, Saa3, P=8.3E-4

G maddesi tarafından STZ modelinde upregüle edilen genler ve P değerleri (STZ-G vs. STZ)

Pancreatitis-associated protein, Reg2, Reg3a, Reg3b, Reg3d, Reg3g, P=1.3E-5

Ribosome, 18 genes, P=3.5E-11

Mitochondrial envelope, 30 genes, P=1.2E-7

G maddesi tarafından STZ modelinde downregüle edilen genler ve P değerleri (STZ-G vs. STZ)

G-protein coupled receptor protein signaling pathway, 244 genes, 7.6E-144

Sonuçlar incelendiğinde, TQ tarafından üretimi artırılan genlerin ağırlıklı olarak hücre çoğalması ve yara iyileşmesiyle ilgili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar TQ'nun pankreasta doku iyileşmesini hızlandırarak Beta hücre adacıklarının onarımına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca önemli bir not olarak rejenerere olan B hücre adacıklarında üretilen faktörlerden olan Reg2 (52 kat), Reg3a (9 kat), Reg3b (13 kat), regenerating islet-derived 2, 3a, 3b genlerinin ekspresyonu TQ ile muamele edilen fare pankreaslarında 10-50 kat artmış görülmektedir. Bu da büyük ihtimal TQ tarafından B hücre adacıklarının tamir edilme mekanizmalarından birini oluşturmaktadır.

Aynı şekilde B hücre rejenerasyonunda etkinliği bilinen G maddesi de regenerating islet-derived 2, 3a, 3b, 3d, 3g genlerinin ekspresyonunu artırmaktadır.

Yine TQ tarafından pankreasta çok sayıda G-proteine bağlı reseptörlerin ve olfactory reseptörlerin ekspresyon seviyeleri etkilenmektedir. Bu değişimin P değeri dikkat çekici şekilde düşük ve anlamlılığı kuvvetlidir (P=6.9E-155).

4.7- TQ tarafından hücre çoğalması ve yara iyileşmesi ile ilgili genlerin etkilendiği mikroarray analizi sonucunda gösterildikten sonra, TQ'nun yara iyileşmeyle ilgili genleri nasıl etkilediği hücre kültüründe Real-Time PCR ile incelendi. Bu kapsamda yara iyileşmeyle ilgili 84 geni içeren bir PCR paneli kullanıldı ve TQ ile muamele edilen 4T1 meme kanser hücrelerinde gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

Aşağıda TQ tarafından ekspresyon seviyeleri etkilenen yara iyileşmeyle ilgili genler listelenmiştir.

Angpt1, Col1a1, Col4a3, Csf2, Ctsk, Cxcl3, Cxcl5, Egf, Fgf2, Ifng, Il4, Il10, Il1b, Itga5, Mmp1a, Mmp2, Mmp9, Pdfga, Serpine1, Stat3, Tnf, Vegfa, Wisp1.

Etkilenen genler incelendiğinde ağırlıklı olarak ekstrasellüler matriks elemanları, doku remodel yapan enzimler, büyümeye faktörleri ve inflamatuar sitokinlerin listeyi oluşturduğu görülmektedir. TQ yara iyileşmede önemli birçok faktörün ekspresyon seviyelerini etkilemektedir.

5- TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmalarda *Nigella sativa*'nın aktif maddesi olan TQ'nun diyabet üzerine terapotik etkinliği olup olmadığı ve bu etkinliğin moleküller mekanizmaları ve moleküler düzeyde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir.

İlk olarak TQ'nun fare modelinde uygulanabilecek dozları belirlenmiştir ve uzun vadeli, farelerde toksisite oluşturmayacak doz olarak 1.2-2.4 mg/kg doz aralığı uygun olarak belirlenmiştir.

Yine aynı şekilde tek doz STZ verilerek Tip I diyabet oluşturma çalışmaları yapılarak STZ dozu optimize edilmiş ve 150-200 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Öncelikle TQ'nun terapotik etkinliği fenotipik olarak incelenerek, diyabet modelinde kan glukoz seviyelerinin nasıl değiştiği incelenmiş ve TQ'nun kısmi olarak kan glukoz seviyelerinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sonucun konfirme edilmesi için daha çok sayıda fare ile bu deneylerin tekrarlanması gerekmektedir.

Pankreasta hücresel düzeyde nasıl değişikliklerin meydana geldiğini belirlemel üzere insülin İHK boyaması gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu adacık sayısının ve büyülüğünün Tq ile muamele edilen diyabetik farelerin pankreaslarında arttığı gözlemlenmiştir, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır. Bu sonucun konfirme edilmesi ve daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi için daha çok sayıda fare ile bu deneylerin tekrarlanması gerekmektedir.

Pankreaslarda mikroarrayler kullanılarak global gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Önemli olarak, TQ ile muamele edilen diyabetik farelerin pankreaslarında hücre çoğalması ve yara iyileşmesi ile ilgili genlerin (*Cxcr4*, *Ccnd1*, *Gnai2*, *Itgb2*, *Ifnar2*, *Lipa*, *Ncf1*, *Rpl29*, *Tacc1*, *Tnfrsf1b* gibi) arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç TQ'nun pankreasta özellikle hücre çoğalmasını uyararak ve yara iyileşmesiyle ilgili faktörleri etkileyerek bir onarıma ve rejenerasyona sebep olabileceği göstermektedir. Bu sonuçlarla paralel olarak, TQ ile muamele edilen diyabetik farelerin pankreaslarında rejenerere olan B hücre adacıklarında üretilen faktörlerden olan Reg2 (52 kat),

Reg3a (9 kat), Reg3b (13 kat), regenerating islet-derived 2, 3a, 3b genlerinin ekspresyonunun 10-50 kat civarında arttığı yine mikroarray çalışmamız sonucunda tespit edilmiştir. Farelerde Reg2, Reg3a ve Reg3b'nin pankreasta ekspresyon seviyelerinin diğer dokulara oranla 20-600 kat civarında daha yüksek olduğu ve yaşa bağlı olarak ekspresyon seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir [50]. Reg2'nin tip1 diyabet oluşturulan farelerde kullanılan adjuvan terapisi sonucunda ekspresyonun arttığı ve bu artışın artmış insülin üretimi ve artmış Beta hücre adacık sayısıyla korrele olduğu gösterilmiştir [51]. Ayrıca Reg2'nin MIN6 fare insulinoma hücrelerinde STZ tarafından indüklenen mitokondri hasarını ve apoptozu geciktirdiği gösterilmiştir [52]. Elde ettiğimiz bulgular ve daha önceki literatür çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde TQ tarafından Reg2, Reg3a ve Reg3b genlerinin aktive edilmesinin pankreas Beta hücre adacık hasarının onarılmasında önemli bir role sahip olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Real-Time PCR metodıyla yara iyileşmesinde rolü olan 84 adet genin ifade seviyeleri incelenmiş ve TQ ile muamele edilen hücrelerde ekstrasellüler matriks elemanları, doku remodel yapan enzimler, büyümeye faktörleri ve inflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerinin etkilendiği bu çalışmamızda gösterilmiştir.

Yapılan mikroarray analiz çalışmalarında STZ ile muamele edilen farelerin pankreaslarında çok sayıda G-proteine bağlı reseptör ve olfactory reseptör geninin ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. İstatistiksel analiz yapıldığında bu genlerin oluşturduğu kümenin P değeri çok anlamlı bulunmuştur (196 gen, 2.9E-114). Bu nedenle bu genlerdeki değişimin fonksiyonel bir anlamı olduğu düşünülmektedir. Daha ilginç olanı ise TQ ile muamele edilen farelerin pankreaslarında ise bu genler normal ekspresyon seviyesi tekrar normale dönmüştür. Çok sayıda olfactory reseptörün pankreastaki fonksiyonu bilinmemektedir, bununla beraber başka organlarda özellikle böbrekte kimyasallara özel almaç resptörler olarak görev yaptıklarına ve böbrek fizyolojisinin regülasyonunda görev aldıklarına yönelik çalışmalar yapılmıştır [53]. Bu alanda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak TQ diyabet farelerin pankreasında B hücre adacıklarında kısmi onarım sağlamakta ve adacık sayısı ve insülin miktarında artışa sebep olmaktadır. Bu artışın moleküler mekanizmaları incelendiğinde yara iyileşme faktörlerinin ve adacık rejenerasyonunda rol alan Reg2, Reg3a ve Reg3b genlerinin önemli rolü olduğu görülmektedir.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir (TOA-2014-4877).

KAYNAKLAR

1. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
2. Kerner, W. and J. Bruckel, *Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014. **122**(7): p. 384-6.
3. Roden, M., [Diabetes mellitus: Definition, classification and diagnosis]. Wien Klin Wochenschr, 2012. **124 Suppl 2**: p. 1-3.
4. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care, 2012. **35 Suppl 1**: p. S64-71.
5. Alberti, K.G.M.M., P.Z. Zimmet, and W. Consultation, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation.* Diabetic Medicine, 1998. **15**(7): p. 539-553.
6. Fong, D.S., et al., *Retinopathy in diabetes.* Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S84-7.
7. Parving, H.H., et al., *Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy.* N Engl J Med, 2008. **358**(23): p. 2433-46.
8. Misur, I., et al., *Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy.* Acta Diabetologica, 2004. **41**(4): p. 158-66.
9. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care, 2010. **33 Suppl 1**: p. S62-9.
10. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes.* Immunity, 2010. **32**(4): p. 457-67.
11. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes.* Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
12. Cobelli, C., et al., *Diabetes: Models, Signals, and Control.* IEEE Rev Biomed Eng, 2009. **2**: p. 54-96.
13. Shilyansky, J., et al., *Is 95% pancreatectomy the procedure of choice for treatment of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the neonate?* Journal of Pediatric Surgery, 1997. **32**(2): p. 342-346.
14. Sullivan, S.J., et al., *Biohybrid Artificial Pancreas - Long-Term Implantation Studies in Diabetic, Pancreatectomized Dogs.* Science, 1991. **252**(5006): p. 718-721.
15. Bell, R.H. and R.J. Hye, *Animal-Models of Diabetes-Mellitus - Physiology and Pathology.* Journal of Surgical Research, 1983. **35**(5): p. 433-460.
16. Gorus, F.K., W.J. Malaisse, and D.G. Pipeleers, *Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells.* Biochem J, 1982. **208**(2): p. 513-5.
17. Lenzen, S. and U. Panten, *Alloxan - History and Mechanism of Action.* Diabetologia, 1988. **31**(6): p. 337-342.
18. Elsner, M., E. Gurgul-Convey, and S. Lenzen, *Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells.* Free Radic Biol Med, 2006. **41**(5): p. 825-34.
19. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.* Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
20. Alarcon-Aguilar, F.J., et al., *Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from Psacalium decompositum in mice.* J Ethnopharmacol, 2000. **69**(3): p. 207-15.
21. Chen, H., et al., *Hypoglycemic effects of aqueous extract of Rhizoma Polygonati Odorati in mice and rats.* J Ethnopharmacol, 2001. **74**(3): p. 225-9.
22. Gruppuso, P.A., et al., *Hepatic protein phosphotyrosine phosphatase. Dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors in normal and alloxan diabetic rats.* Journal of Clinical Investigation, 1990. **85**(6): p. 1754-60.
23. Katsumata, K., K. Katsumata, and Y. Katsumata, *Protective Effect of Diltiazem Hydrochloride on the Occurrence of Alloxan-Induced or Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats.* Hormone and Metabolic Research, 1992. **24**(11): p. 508-510.

24. Hayashi, K., R. Kojima, and M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1110-9.
25. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
26. Weide, L.G. and P.E. Lacy, *Low-Dose Streptozocin-Induced Autoimmune Diabetes in Islet Transplantation Model*. Diabetes, 1991. **40**(9): p. 1157-1162.
27. Cakmak, A., et al., *Statins pre-treatment protects brain against focal cerebral ischemia in diabetic mice*. Journal of Surgical Research, 2007. **138**(2): p. 254-258.
28. Sitasawad, S.L., Y. Shewade, and R. Bhonde, *Role of bittergourd fruit juice in STZ-induced diabetic state in vivo and in vitro*. J Ethnopharmacol, 2000. **73**(1-2): p. 71-9.
29. Grover, J.K., et al., *Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice*. J Ethnopharmacol, 2001. **76**(3): p. 233-238.
30. Gali-Muhtasib, H., A. Roessner, and R. Schneider-Stock, *Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(8): p. 1249-53.
31. Dauksas, E., P.R. Venskutonis, and B. Sivik, *Comparison of oil from Nigella damascena seed recovered by pressing, conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction*. J Food Sci, 2002. **67**(3): p. 1021-1024.
32. Salem, M.L., *Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed*. International Immunopharmacology, 2005. **5**(13-14): p. 1749-1770.
33. Aggarwal, B.B., et al., *Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention*. Planta Medica, 2008. **74**(13): p. 1560-1569.
34. Baytop, T., *Geçmişte ve Bugün Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. 1999, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
35. Arslan, S.O., et al., *The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat*. Nutrition Research, 2005. **25**(7): p. 673-680.
36. Pari, L. and C. Sankaranarayanan, *Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats*. Life Sciences, 2009. **85**(23-26): p. 830-834.
37. El-Mahmoudy, A., et al., *Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism*. International Immunopharmacology, 2005. **5**(1): p. 195-207.
38. Farah, K.M., et al., *Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters*. Research in Veterinary Science, 2005. **79**(3): p. 219-223.
39. Kanter, M., et al., *Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by Nigella sativa L. in Streptozotocin-induced diabetic rats*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2003. **201**(4): p. 213-219.
40. Kanter, M., et al., *Effects of Nigella sativa on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats*. Anatomical Record Part A-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology, 2004. **279A**(1): p. 685-691.
41. Kanter, M., *Effects of Nigella sativa and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy*. Neurochemical Research, 2008. **33**(1): p. 87-96.
42. Abdelmeguid, N.E., et al., *Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic beta-cells of streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal of Diabetes, 2010. **2**(4): p. 256-266.
43. Al-Enazi, M.M., *Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice*. Pak J Biol Sci, 2007. **10**(18): p. 3115-9.
44. Mu, G.G., et al., *Thymoquinone Pretreatment Overcomes the Insensitivity and Potentiates the Antitumor Effect of Gemcitabine Through Abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR Regulated Signaling Pathways in Pancreatic Cancer*. Dig Dis Sci, 2014.

45. Xu, D.S., et al., *Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo*. Oncology Reports, 2014. **31**(5): p. 2063-2070.
46. Sakalar, C., et al., *Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells*. Mol Cell Biochem, 2013. **383**(1-2): p. 243-51.
47. Talib, W.H. and M.M. Abukhader, *Combinatorial Effects of Thymoquinone on the Anticancer Activity and Hepatotoxicity of the Prodrug CB 1954*. Sci Pharm, 2013. **81**(2): p. 519-30.
48. El-Mahdy, M.A., et al., *Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells*. International Journal of Cancer, 2005. **117**(3): p. 409-417.
49. Joshi, S.R., R.M. Parikh, and A.K. Das, *Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology*. J Assoc Physicians India, 2007. **55 Suppl**: p. 19-25.
50. Wang, Y., et al., *Coordinated age-dependent and pancreatic-specific expression of mouse Reg2Reg3alpha, and Reg3beta genes*. Growth Factors, 2011. **29**(2-3): p. 72-81.
51. Huszarik, K., et al., *Adjuvant immunotherapy increases beta cell regenerative factor Reg2 in the pancreas of diabetic mice*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5120-9.
52. Liu, L., J.L. Liu, and C.B. Srikant, *Reg2 protects mouse insulinoma cells from streptozotocin-induced mitochondrial disruption and apoptosis*. Growth Factors, 2010. **28**(5): p. 370-8.
53. Pluznick, J.L., *Extra sensory perception: the role of Gpr receptors in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(5): p. 507-12.

Thymoquinone and Paclitaxel show synergistic anti-tumor activity through the modulation of genes in Fasl-Trail extrinsic apoptosis axis, p53 and JAK-STAT signalling. Çağrı Şakalar^{1, 2,*}, Kenan Izgi^{2,3}, Banu İskender^{1,2}, Ali Turan^{1,2}, Sedat Sezen^{1,2}, Huriye Aksu^{1,2}, Mustafa Cakir^{1,2}, Büşra Kurt^{1,2}, Halit Canatan^{1,2}. (**Plos One dergisine gönderildi, inceleme aşamasında**).

Diyabetle ilgili bir diğer yayın da yazım aşamasındadır.

Thymoquinone and Paclitaxel show synergistic anti-tumor activity through the modulation of genes in Fasl-Trail extrinsic apoptosis axis, p53 and JAK-STAT signalling

Çağrı Şakalar^{1, 2,*}, Kenan İzgi^{2,3}, Banu İskender^{1,2}, Ali Turan^{1,2}, Sedat Sezen^{1,2}, Huriye Aksu^{1,2}, Mustafa Cakir^{1,2}, Büşra Kurt^{1,2}, Halit Canatan^{1,2}

1: Erciyes University, School of Medicine, Department of Medical Biology, 38039, Melikgazi, Kayseri, Turkey

2: Erciyes University, Genome and Stem Cell Center, Melikgazi, Kayseri, Turkey

3: Erciyes University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Melikgazi, Kayseri, Turkey

*: Corresponding Author, sakalar11@hotmail.com

Corresponding author:

Cagri SAKALAR, PhD

Associate Professor

Department of Medical Biology, School of Medicine, and

Genome and Stem Cell Center,

Erciyes University, 38039, Melikgazi, Kayseri, Turkey

Tel: 090 352 207 66 66/13630

Fax: 090 352 437 52 85

E-mail: sakalar11@hotmail.com

E-mail2: csakalar@erciyes.edu.tr

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abstract

Thymoquinone (TQ) is the active ingredient of *Nigella sativa* which has a therapeutic potential in cancer therapy and prevention. In this study, the impact of TQ on breast cancer was studied both *in vitro* and *in vivo*. TQ has been shown to induce specific cytotoxicity, apoptosis and to inhibit wound healing. TQ also inhibited cancer growth in a mouse tumor model. Moreover, TQ and Paclitaxel (Pac) synergistically inhibited cancer growth in cell culture and in mice. Genes involved in TQ and TQ-Pac mediated anti-tumor function were studied using both global transcriptome profiling and focused real-time PCR arrays. After bioinformatics analysis, genes in apoptosis, cytokine and p53 signaling

categories were found to be enriched with a high significance in TQ treated cells. Interestingly, tumor suppressor genes such as Cst6, Cdkn1a and Hic1 were highly up-regulated by TQ. In addition, several growth factors such as Vegf, Egf and Fgf2 were upregulated and several pro-apoptotic factors such as caspases and Trail were downregulated possibly pointing out key pathways manipulated by TQ. In cells treated with the combination of TQ and Pac, genes in apoptosis cascade ($p<10^{-12}$), p53 signaling ($p=10^{-5}$) and JAK-STAT signaling ($p<10^{-3}$) were differentially expressed. Especially the cluster of genes involved in Fas and Trail mediated apoptosis such as Fas, Fasl, Trail, Tnfrsf22 and Tnfrsf23, were modulated by TQ-Pac combination.

Implications: The *in vivo* therapeutic potential of TQ-Pac combination and the genetic network involved in this synergy, have been shown for the first time to the best of our knowledge.

Keywords: Thymoquinone, Paclitaxel, Breast Cancer, Gene Expression Profile, Extrinsic Apoptosis, Trail, p53 signalling

1. Introduction

Thymoquinone (TQ) is the active ingredient of the essential oil of *Nigella sativa* [54]. Numerous studies demonstrated the therapeutic role of TQ in cancer therapy and prevention [55]. Therapeutic role of TQ has been shown to dependent on three regulatory networks: i) apoptosis, ii) cell cycle and iii) NF-Kappa-B signalling. TQ has been shown to induce apoptosis in various cancer types through the modulation of key factors including P53, P21WAF1, caspases 3, 8 and 9, Bax, Bcl-2, cyclin D1, c-MYC and PTEN [48, 56-59]. TQ also intervenes with cell cycle progression and inhibits G1 to S phase progression by affecting the mRNA levels of p53, cyclin dependent kinase inhibitors p16 and p21 [57-60].

TNF-alpha may involve in inflammation and cell proliferation through NF-Kappa-B signaling pathway [61]. TQ has been reported to inhibit NF-Kappa-B activation and TNF production in various auto-immune models and cancer cell lines, indicating the involvement of TQ in NF-Kappa-B related

inflammatory and survival signaling pathways [61-66]. One of the mechanisms that TQ suppressed NF-Kappa-B pathway is the inhibition p65 binding to DNA [59]. We recently reported that the transcription of multiple genes in the TNF-NF-Kappa-B signaling axis was found to be affected during TQ mediated apoptosis of HeLa cells [46]. TQ inhibited *in vivo* growth of mouse mammary tumor and NF-Kappa-B has been shown to be important in tumor progression in mouse mammary tumor model [63].

TQ has been shown effective against breast cancer in various studies. In breast cancer cell lines, TQ arrested cells in G1 phase, affected cell cycle genes (cyclin D1, cyclin E and p27) and induced apoptosis. Interestingly, in the same study, TQ disturbed the structure and function of mitochondria in cancer cells [67]. TQ has been shown to arrest cells in G1 and to induce apoptosis through mitochondrial pathway in triple negative breast cancer cells lacking functional P53 [68]. Anti-tumor effect of TQ through P38 MAPK and synergy between TQ and doxorubicin has been found in *in vitro* and *in vivo* breast cancer models [69]. TQ has been demonstrated to inhibit Akt phosphorylation and invasive potential of breast cancer cells and synergise with cisplatin [70]. TQ has also been found to sensitize breast cancer cells to a single dose of ionizing radiation [71]. TQ has also sensitized multi-drug resistant breast cancer cell line to widely used chemotherapeutic agent doxorubicin [72].

Taxol was first isolated from *Taxus brevifolia* in 1971 in an effort by National Cancer Institute in USA [73]. Taxol targets cancer cells through stabilization of microtubules and interferes with cell division [74]. Paclitaxel (Pac) and docetaxel are active compounds of two taxol-based commercial preparations and currently used in breast and ovarian cancer therapies [75]. There are only few studies on *in vitro* combination of TQ and Pac. In one study, TQ loaded nanoparticles have been shown to sensitize cancer cells to Pac induced cytotoxicity [66]. In another study, TQ and docetaxel combination had synergistic cytotoxicity *in vitro* in prostate cancer cells [76]. To the best of our knowledge, there is not a study on the combination of TQ and pac *in vivo* and the data on *in vitro* synergy of TQ and Pac is very limited.

Ehrlich ascites tumor is a non-differentiated tumor cell line which is derived from mouse mammary adenocarcinoma and can form ascites progressively when injected intraperitoneally in mice [77]. 4T1 is a mammary carcinoma cell line derived from a spontaneous tumor of Balb/c mice and represents a high grade, metastatic breast cancer [78, 79]

In this study, synergistic effect of TQ and Pac has been demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* breast cancer models. Importantly, detailed investigation on functional pathways and genetic networks

involved in the action of TQ and Pac was performed using both microarray based global transcriptome profiling and pathway focused real-time PCR panels. Genes that take part in apoptosis, cell proliferation, growth factor activity and cytokine activity have been demonstrated to have significant importance in the therapeutic role of TQ.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

8-12 weeks female Balb/c mice obtained from the Hakan Çetinsaya Experimental and Clinic Research Center, Erciyes University, Kayseri, Turkey, were used for this study. All the animals received humane care according to the standard guidelines. Ethical approval for the study was obtained from Erciyes University Animal Research Local Ethics Committee and the ethic regulations have been followed in accordance with international, national and institutional guidelines.

2.2 Cell culture

Mouse breast cancer cell line, 4T1 (ATCC CRL-2539), was cultured in RPMI-1640 growth medium (Biochrom) with the supplements (10 % FBS (Biochrom), 2 mM L-Glutamine (Biochrom), 1 mM

Sodium-Pyruvate (Biochrom), 10 mM HEPES (Biochrom) and Penicillin–Streptomycin (Biochrom)) at 37⁰ C and 5 % CO₂ under sterile conditions. Mouse embryonic fibroblasts, PMEF (PMEF-CFL-P1), was cultured in DMEM growth medium (Biochrom) with the supplements.

2.3 Cell viability assays

4T1 and MEF cells were incubated in the presence of certain doses of TQ (Sigma) for 48 h. Cell viability assays were performed as described by us earlier [46].

2.4 Assessment of apoptosis with giemsa staining of 4T1 cells

4T1 breast cancer cells were grown to 60-70 % confluency in 6-well plate for 24 h. Then, cells were incubated at 37 °C and 5 % CO₂ with certain concentrations of TQ (control, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µM) for 24 h. Assessment of apoptosis with giemsa staining was performed as described in [46].

2.5 Wound healing assay

4T1 cells were grown to 100 % confluency in 25 cm² flasks. A scratch wound was made in all flasks. Cells were incubated at certain different concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µM) of TQ for 48 h. Wound healing assay was performed as described in [46].

2.6 In vitro cytotoxicity assay for the combination of Thymoquinone (TQ) and Paclitaxel (Pac)

4T1 breast cancer cells were grown to 70% confluency in 6-well plate. TQ (Sigma) and Pac (Bristol Myers Squibb) were added at certain concentrations and cells were incubated for 24 h. Cell viability assays were performed as described in [46].

Ehrlich tumor cells were injected intraperitoneally (*i.p.*) into mice and after 8-10 days cells were collected from tumors ascites of mice and counted using trypan blue staining. Approximately, 5x10⁵ cells were plated in 2 ml in 24 well plates. TQ and Pac were added at certain concentrations and cells were

incubated for 24 h. Total number of viable cells was calculated by counting in hemacytometer using trypan blue staining.

2.7 In vivo Mouse Tumor Model

Ehrlich Tumor Ascites (EAC) were kindly provided by Assoc. Prof. Dr. Tolga Ertekin, Erciyes University. EAC cells were obtained from tumor ascite fluids of previously injected female Balb/c mice. Each mice were injected with 5×10^6 cells in 200 μ l volume and mice were weighed daily. Tumor growth was monitored by the evaluation of the weights of mice. The doses of TQ and Pac (Bristol Myers Squibb) were administered intraperitoneally daily for TQ and weekly for Pac. TQ was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then diluted in ddH₂O on the day of injection. Pac was in a suspension including 50% ethanol and diluted in ddH₂O on the day of injection. Control mice were injected with the same amount of DMSO and/or Ethanol in ddH₂O.

2.8 RNA isolation and cDNA synthesis

For RNA isolation, 4T1 cells were grown to 90-100 % confluence for 48 h in 25 cm² flasks. Then, certain concentrations of TQ were added and cells were incubated for 24 h. As a control, only DMSO was added as vehicle. 4T1 cells were washed with PBS and trypsinized. RNA isolation was performed using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). RNA quality and concentration were checked with NanoDrop. OD 260/280 and 260/230 values were above 1.8 for all samples. RNAs were kept frozen at -80 °C.

500 ng RNA was used for cDNA synthesis using RT² First Strand Kit (Qiagen). Briefly, RNA, BufferGE2 and RNase-free H₂O were mixed and incubated at 37 °C for 5 min for genomic DNA elimination. Then, Buffer BC4 including reverse transcriptase, random hexamers, oligo-dT and other components, were added. The mix was incubated at 42 °C for 15 min and 95°C for 5 min. cDNAs were diluted with RNase-free H₂O and kept frozen at -20 °C until the gene expression analysis.

2.9 Gene expression analysis by quantitative real-time PCR

In this study, QIAGEN RT² Profiler PCR Arrays were utilized. Three panels used were as the following: i) Mouse Apoptosis Array, ii) Mouse Breast Cancer Array, iii) Mouse Wound Healing Array. These panels have primers for 84 pathway related genes, 5 housekeeping genes, additionally 3 primers for reverse transcription control, 3 primers for positive PCR control and 1 primer for genomic DNA contamination control. For real-time PCR experiment, briefly, 2xRT²SYBR Green Mastermix, cDNA and RNase-free H₂O were mixed and added into each well of 96-well plate. Roche LightCycler 480 instrument was used to run real-time PCR. The protocol for real-time PCR was as the following: one cycle of preincubation for 10 min at 95 °C, 45 cycles of amplification for 15 s at 95 °C, for 1 min at 60 °C. Each experiment was performed twice. The expression data was analyzed online using the 'Data Analysis Center' software (QIAGEN). Ct cut-off threshold was set as 35. Average of the expression values of five housekeeping reference genes were used for the normalization of target genes. Genes that were down-regulated or up-regulated more than two-fold were considered to be modulated. The bioinformatics analysis of the gene list was performed using the functional annotation tool of the bioinformatics software, DAVID [80, 81].

2.10 Global gene expression profile analysis with microarrays

100 ng RNA from 4T1 cells treated with TQ and/or Pac was used for each experiment. GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix) were used. Microarray experimental procedure including cDNA synthesis, hybridization and scanning was performed in a microarray facility (AYKA, Ankara, Turkey). Each experiment was performed as triplicate. The bioinformatics analysis of the gene list was performed using DAVID.

3. Results

3.1 Thymoquinone(TQ) induces stronger cytotoxicity in 4T1 mouse breast cancer cells compared to control fibroblast cells

Cytotoxic effect of TQ was studied using cell viability assay by the utilization of 4T1 mouse breast cancer cell line and mouse embryonic fibroblasts (MEF). 4T1 and MEF cells were incubated at different concentrations of TQ ranging from 3.125 to 100 μ M by two-fold increments. TQ induced effective cytotoxic effect on 4T1 cells with an IC₅₀ value of approximately 1.3 μ M (Supplementary Fig. 1B). Interestingly cytotoxic effect of TQ on MEF was milder with an IC₅₀ value of 10.3 μ M (Supplementary Fig. 1C).

3.2 TQ inhibits wound healing and migration in 4T1 cells

An *in vitro* cell culture wound healing assay was performed to evaluate the impact of TQ on the proliferation and migration of 4T1 breast cancer cells. After making the scratch wound, cells were grown in culture medium containing TQ in concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ M together with control. Microscope images were taken at the beginning and at every 12 h (Fig. 1A). The closure of the wound gap was monitored and calculated by making multiple measurements using specific

image software. TQ significantly inhibited wound healing at all doses except for 6.25 μ M (Fig. 1A, B). Averages of measurements of wound healing were plotted (Fig. 1B, Supplementary Table 1).

3.3 TQ induces apoptosis in 4T1 cells

Degree of apoptosis induced by TQ was evaluated in 4T1 cells using Giemsa staining. Treatment with TQ for 24 h resulted apoptosis in 4T1 cells at all doses ranging from 6.25 μ M to 100 μ M (Supplementary Fig. 2). Apoptotic cells were identified by their condensed and darker nucleus and changed morphology (Supplementary Fig. 2A-E). Percentages of apoptotic cells were 11.8 ± 1.6 for the control, 25.8 ± 2.8 for 6.25 μ M, 67.6 ± 3.2 for 12.5 μ M, 86.6 ± 1.6 for 25 μ M, 98.4 ± 0.9 for 50 μ M, and 100 ± 0 for 100 μ M dose of TQ in 4T1 breast cancer cells, respectively. Percentages of apoptotic cells were plotted (Supplementary Fig. 2F).

3.4 Combination of TQ and Pac strongly induces cytotoxicity in 4T1 cells and Ehrlich tumor cells *in vitro*

TQ and Pac both induced cytotoxicity in 4T1 cells (Fig. 2A). When TQ and Pac were combined together (TQ: 6.25, 12.5 and 25 μ M; and Pac: 10 μ g/ml), they induced a stronger cytotoxicity compared to each agent alone (TQ 6.25 μ M + Pac 10 μ g/ml vs. Pac 10 μ g/ml $p = 0,0004$; TQ 12.5 μ M + Pac 10 μ g/ml vs. Pac 10 μ g/ml $p = 0,0001$; TQ 25 μ M + Pac 10 μ g/ml vs. TQ 25 μ M, $p = 0,0002$) (Fig. 2A). Interestingly, when TQ was added before Pac, TQ sensitized 4T1 cells to Pac and the induced cytotoxicity was significantly higher compared to when two agents were given at the same time (TQ 12.5 μ M + Pac 10 μ g/ml vs. TQ 12.5 μ M / Pac 10 μ g/ml, $p = 0.0025$). The same phenomenon was observed in Ehrlich tumor cells. TQ and Pac both induced cytotoxicity in Ehrlich tumor cells (Fig. 2B). When TQ and Pac were combined together (TQ: 6.25 μ M; and Pac: 5 μ g/ml and 10 μ g/ml), they induced a stronger cytotoxicity compared to each agent alone (TQ 6.25 μ M / Pac 5 μ g/ml vs. Pac 5 μ g/ml, $p = 0.0009$; TQ 6.25 μ M / Pac 10 μ g/ml vs. Pac 10 μ g/ml, $p = 0.02$) (Fig. 2B).

3.5 TQ significantly inhibits the growth of Ehrlich tumor *in vivo*

Ehrlich tumor cells form ascites in 8-12 days when injected into mice intraperitoneally. TQ significantly inhibited the growth of i.p. injected ehrlich tumor in mice when given 5 times a week at a dose of 3.2 mg/kg ($p = 0.012$) (Fig. 3A). A lower dose of TQ (0.64 mg/kg) inhibited the growth of tumor to some degree, although it was not statistically significant ($p = 0.14$) (Fig. 3A).

3.6 Combination of TQ and Pac synergistically inhibits the growth of Ehrlich tumor *in vivo*

A moderate dose of Pac (1.25 mg/kg) inhibited the growth of ehrlich tumor to some degree at earlier stages however the inhibition was not significant at later stages. A lower dose of TQ (0.64 mg/kg) did not have an inhibitory effect on tumor growth. The combination of Pac and the lower dose TQ significantly inhibited the tumor growth compared to both TQ alone and Pac alone groups ($p = 0.003$ and $p = 0.007$, respectively) (Fig. 3B). A higher dose of TQ (2.4 mg/kg) inhibited the tumor growth until later stages ($p < 0.001$) (Fig. 3C). The combination of Pac and the higher dose TQ significantly inhibited the tumor growth compared to both TQ alone and Pac alone groups ($p < 0.001$ in both) (Fig. 3C).

3.7 TQ modulates cell cycle, apoptosis and cytokine genes as revealed by microarray based global gene expression analysis and focused real-time PCR panels

4T1 cancer cells were untreated (control) or treated with TQ (12.5, 25 and 50 μ M), Pac (10 μ g/ml) and their combination (TQ, 12.5 μ M + Pac, 10 μ g/ml). Global gene expression profiles of each sample was analyzed using a mouse whole-transcriptome microarray. Bioinformatic analysis and grouping of modulated genes was performed using the bioinformatics software DAVID [80, 81]. TQ, at doses of 12.5 μ M and 25 μ M, affected a total of 167 and 327 DAVID IDs (mRNAs, miRNAs etc.), respectively (Supplementary data 1 and 2). When these genes were analyzed, genes in four helical cytokine, nucleosome and cell death categories are found to be enriched significantly ($p = 1.4E-7$, $p = 6.1E-6$, $p = 1.4E-3$, respectively). TQ, at the dose of 50 μ M, affected the expression of a total of 1495 DAVID IDs (mRNAs, miRNAs etc.) (Supplementary data 3). After bioinformatics analysis, genes in cell cycle, apoptosis, mitochondrion and chromosomal part categories were found to be enriched significantly ($p = 2.5E-12$, $p = 5.1E-7$, $p = 1.4E-8$ and $p = 5.6E-8$, respectively) (Supplementary table 2).

Profiling of the expression of the genes modulated by high dose TQ (50 μ M) was performed using three focused real-time PCR panels containing 224 genes. These three panels were apoptosis, breast cancer and wound healing panels. More than 70 genes were found to be either down-regulated or up-regulated by high dose TQ. These genes were analyzed and categorized into functional groups. Genes in the regulation of programmed cell death, immune response, regulation of cell proliferation, p53 signaling pathway categories were found to be enriched significantly. Details of categories, modulated genes and P values were given in Table 1. A representative list of genes strongly modulated by TQ and their fold changes were given in Table 2. Interestingly, tumor suppressor genes such as Cst6, Cdkn1a and Hic1 have been found to constitute a pivotal portion of the highly up-regulated genes (Table 2).

3.8 Combination of TQ and Pac differentially modulates Fasl and Trail mediated apoptosis, p53 signalling and JAK-STAT signalling genes as revealed by microarray based analysis of gene expression and focused real-time PCR panels

Genes that were differentially expressed in the combination of TQ (12.5 µM) and Pac (10 µg/ml) compared to Pac and TQ alone, were investigated by both microarray and real-time PCR methodology. These doses of TQ were selected because their combination resulted in the most significant cytotoxicity in 4T1 cells (Fig. 2A). Combination of TQ and Pac affected the expression of a total of 347 DAVID IDs compared to Pac alone group (Supplementary data 4). After bioinformatics analysis, genes in 'de novo' protein folding (the process of assisting in the folding of a nascent peptide chain into its correct tertiary structure), DNA replication initiation, cell cycle and four-helical cytokine categories were found to be enriched significantly ($p = 3.5E-5$, $p = 3.1E-4$, $p = 1.5E-3$ and $p = 2.6E-3$, respectively) (Supplementary table 3). Important to note that Trail decoy receptor genes, Tnfrsf22 and Tnfrsf23, were strongly modulated (5 folds and 10 folds, respectively) by TQ-Pac combination.

Profiling of the expression of the genes modulated by the combination of TQ and Pac was also performed using three focused real-time PCR panels. The genes that were modulated in the combination compared to Pac alone samples, were selected and analyzed. 64 genes were found to be either down-regulated or up-regulated in the combination of TQ and Pac. These genes were analyzed and categorized into functional groups. Genes in apoptosis, p53 signaling, cytokine-cytokine receptor interaction and JAK-STAT signaling were found to be enriched specifically in the combination TQ and Pac. Especially genes involved in Fasl and Trail mediated extrinsic apoptosis such as Fasl, Fas, Trail, Tnfrsf11b, Dff45, Casp7 and Bid were affected. Details of categories, modulated genes and P values were given in Table 3.

4. Discussion

In this study, the anti-tumor affect of TQ has been shown both *in vitro* and *in vivo* in mouse breast cancer model. TQ has been shown to inhibit the growth of Ehrlich tumor in mice at high dose (3.2 mg/kg), however the inhibition was not significant at low dose (0.64 mg/kg). Next, we have demonstrated that TQ and Pac show cooperative anti-tumor effect when combined *in vitro* (Fig. 2) and interestingly, the cooperation was stronger when TQ precedes Pac (Fig. 2A). Furthermore, in our experiments in mice, combination of Pac and low dose TQ had a stronger tumor inhibitory effect compared to Pac and TQ alone (Fig. 3B), however low dose of TQ did not have an inhibitory effect by itself. We speculate that TQ sensitizes tumor cells to Pac *in vivo*. Combination of Pac and high dose TQ had a longer term protective effect and the protection was stronger compared to Pac alone or TQ alone groups (Fig. 3C). This again indicates a synergistic cooperation of these two therapeutic agents. It's important to note that *in vivo* data clearly support *in vitro* data for the cooperative anti-tumor action of TQ and Pac.

In order to find out the molecular mechanisms through which TQ exerts its anti-tumor impact, gene expression profile of TQ treated 4T1 cells was investigated. First, whole transcriptome analysis was performed and a global list of genes modulated by TQ in 4T1 cells was obtained. It has been found that TQ modulates the expression genes mainly involved in cell cycle, apoptosis and chromosomal regulation with a high significance (Supplementary table 2). Interestingly, genes involved in mitochondrial function was also found to be modulated. This might be due to an effect of intracellular, mitochondria-dependent apoptotic process or a metabolic regulation. In accordance with our data, TQ has been reported to arrest cells in G1 phase, to disturb the structure and function of mitochondria and to induce apoptosis through mitochondrial pathway in breast cancer cells [67, 68]. Second, focused real time PCR arrays were used. TQ has been found to modulate the expression of genes involved in apoptosis through Death Receptors and mitochondrial pathway, immune response, regulation of cell proliferation and p53 signalling pathway (Table 1). The results of microarray data and real-time PCR data are in accordance. However, focused real-time PCR arrays additionally imply that genes involved in immune response and cytokine activity were modulated by TQ. This is probably due to a relatively lower expression of these factors in cancer cells and since real-time PCR is more sensitive compared to microarray analysis, cytokine genes were detected by real-time PCR.

Another important point to note is the complexity of the gene expression profile induced by TQ. For instance, several anti-apoptotic factors such as Bcl2a1a, Birc3 and Birc5 were found to be downregulated by high dose TQ, however, several pro-apoptotic factors such as Casp4, Casp12 were also found to be downregulated. Similarly growth factors including Vegfa, Egf and Fgf2 were up-regulated when cancer cells were treated with high dose TQ. This might be a result of the response of cancer cells to resist to the apoptosis induced by TQ or a result of genetic feedback mechanism. These genes may give strong clues about the pathways that TQ intervenes with. As we already know that TQ induces apoptosis and activates the caspase cascade [48, 56-59], the downregulation of caspases with high dose TQ suggests that cancer cells down-regulate caspase expression to escape apoptosis. Therefore, a comprehensive analysis of up-regulated and down-regulated genes together, seems to be a more useful approach.

Gene expression profile of 4T1 cells treated with the combination of TQ and Pac, was analyzed to reveal the potential molecular actors responsible for the cooperative anti-tumor activity of these two agents. Genes involved in apoptosis, growth factor activity and cell cycle were found to be modulated in TQ-Pac combination compared to each agent alone. These findings suggest that TQ increase the sensitivity and decrease the resistance of 4T1 cells to Pac by tuning the activity of these factors. In our study, we found that the expression of cytokine genes were modulated in TQ-Pac combination. In accordance with our findings, TQ has been reported to modulate the levels of several cytokines and chemokines and extracellular matrix components such as collagen-I, IL-6 and MCP-1 [82, 83]. TQ has been reported to inhibit NF-Kappa-B and IL-8 expression which is overexpressed in hepatocellular carcinoma [84]. TQ also has been reported to suppress STAT3 phosphorylation and Cxcl12 induced migration in multiple myeloma cells [85-87]. TQ has also been shown to inhibit proinflammatory mediators including TNF-alpha and IL-1beta in pancreatic cancer cells [65]. Therefore, it seems that the modulation of inflammatory mediators may be an important aspect of the anti-tumor impact of TQ. More importantly, many cytokine genes were differentially modulated in TQ-Pac combination suggesting the role of cytokine mediated signaling in the synergy of TQ and Pac (Table 3).

TQ has been found to radiosensitize breast cancer cells through the modulation of the levels of integrin αV, MMP9, and MMP2 [88]. Similarly, in our study, we've also found out that the expression levels of many wound healing related genes including Ctsk, Itga5, Mmp1a, Mmp2, Mmp9, Serpine1 were

modulated by TQ. It has been shown that TQ inhibits the phosphorylation of EGFR through JAK2 and Src [89]. Interestingly, in our study, TQ was found to affect levels of several growth factors including Egf, Fgf2, Pdgfa, Vegfa (Table 1). At the same time, JAK-STAT signaling was found to be affected in TQ-Pac combination (Table 3).

One of the important findings of this study was the tremendous up-regulation of several key tumor suppressor genes in TQ treated breast cancer cells. These genes were normally hypermethylated in cancer [90-92]. For example, Cst6 (~19 folds), Cdkn1a (~11 folds), Hic1 (~10 folds), Gata3, Gstp1 and Brca1 were among these tumor suppressor genes that were upregulated by TQ (Table 2).

We have shown that TQ sensitized cancer cells to Pac both *in vitro* and *in vivo*. There have been several reports on the basis of Pac resistance. Increased expression of anti-apoptotic factors such as Bcl-2 and Bcl-XL and decreased pro-apoptotic factors such Bax and Bad, have been shown to be related with Pac resistance [93]. Interestingly, we have shown that TQ induces apoptosis in breast cancer cells and strongly modulates many genes involved in apoptosis with a P value of 2.2E-29 (Table 1). Therefore, it's quite likely that TQ breaks the resistance of breast cancer cells to Pac through interplaying with key actors in apoptosis. We have also shown that genes in apoptosis cascade (especially genes related with extrinsic cascade such as Fas, Fasl, Trail, Trail decoy receptors (Tnfrsf22 and Tnfrsf23), Casp7 and Bid) and EGFR-AKT axis (such as Egfr and Akt1) were differentially expressed in TQ-Pac combination (Fig. 4). This finding suggests that TQ may stimulate extrinsic apoptosis pathway and may inhibit EGFR-AKT signaling axis to make cancer cells more prone to Pac cytotoxicity. Especially the affected cluster of genes involved in Fasl and Trail mediated apoptosis (Fasl, Fas, Trail, Tnfrsf11b, Tnfrsf22, Tnfrsf23, Dff45, Casp7 and Bid) should be noted in TQ-Pac combination and Fasl-Trail mediated apoptosis axis should be taken into consideration for their role in TQ-Pac synergy.

It has also been reported that IL-6 and IL-8 are overexpressed in pac resistant cancer cell lines [93]. We have shown that Il6 and Stat3 and other genes in JAK-STAT signalling are modulated in cells treated with the combination of TQ and Pac. This finding suggests that TQ breaks the resistance to Pac possibly also through IL-6 since IL-6 is overexpressed in pac resistant cancer cell lines [93]. In another study, Pac resistance in breast cancer cells has been connected to the downregulation of

caspase-7, caspase-9 and BIM [94]. In accordance with these findings, TQ and TQ-Pac combination affected the expression of many caspase genes including Casp1, Casp2, Casp4, Casp6, Casp7 and Casp12 in breast cancer cells (Tables 1-3, Fig. 4). Regulation of caspase activity might be another mechanism through which TQ acts synergistically with Pac.

In this study, the *in vivo* synergy of TQ-Pac combination and the genes involved in TQ-Pac cooperation have been shown for the first time to the best of our knowledge. At the same time, the detailed analysis of genes involved in TQ mediated apoptosis of breast cancer cells were performed using both microarray based whole transcriptome profiling and focused real-time PCR panels.

Funding and Acknowledgements:

This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK), Grant Number: 113S322 (C. SAKALAR) and Erciyes University Scientific Research Fund (EU-BAP), Grant Number: TOA-2014-4877 (C. SAKALAR). Authors would like to thank to Prof. Dr. Nedime Serakinci, Near East University, Cyprus and Prof. Dr. Feridoun Karimi-Busheri University of Alberta, Canada for critically reading the manuscript. The authors declare that there are no conflicts of interest.

References:

1. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. **37 Suppl 1**: p. S81-90.
2. Kerner, W. and J. Bruckel, *Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014. **122**(7): p. 384-6.
3. Roden, M., *[Diabetes mellitus: Definition, classification and diagnosis]*. Wien Klin Wochenschr, 2012. **124 Suppl 2**: p. 1-3.
4. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2012. **35 Suppl 1**: p. S64-71.
5. Alberti, K.G.M.M., P.Z. Zimmet, and W. Consultation, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation*. Diabetic Medicine, 1998. **15**(7): p. 539-553.

6. Fong, D.S., et al., *Retinopathy in diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. S84-7.
7. Parving, H.H., et al., *Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2008. **358**(23): p. 2433-46.
8. Misur, I., et al., *Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy*. Acta Diabetologica, 2004. **41**(4): p. 158-66.
9. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2010. **33 Suppl 1**: p. S62-9.
10. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 457-67.
11. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
12. Cobelli, C., et al., *Diabetes: Models, Signals, and Control*. IEEE Rev Biomed Eng, 2009. **2**: p. 54-96.
13. Shilyansky, J., et al., *Is 95% pancreatectomy the procedure of choice for treatment of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the neonate?* Journal of Pediatric Surgery, 1997. **32**(2): p. 342-346.
14. Sullivan, S.J., et al., *Biohybrid Artificial Pancreas - Long-Term Implantation Studies in Diabetic, Pancreatectomized Dogs*. Science, 1991. **252**(5006): p. 718-721.
15. Bell, R.H. and R.J. Hye, *Animal-Models of Diabetes-Mellitus - Physiology and Pathology*. Journal of Surgical Research, 1983. **35**(5): p. 433-460.
16. Goros, F.K., W.J. Malaisse, and D.G. Pipeleers, *Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells*. Biochem J, 1982. **208**(2): p. 513-5.
17. Lenzen, S. and U. Panten, *Alloxan - History and Mechanism of Action*. Diabetologia, 1988. **31**(6): p. 337-342.
18. Elsner, M., E. Gurgul-Convey, and S. Lenzen, *Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(5): p. 825-34.
19. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
20. Alarcon-Aguilar, F.J., et al., *Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from Psacalium decompositum in mice*. J Ethnopharmacol, 2000. **69**(3): p. 207-15.
21. Chen, H., et al., *Hypoglycemic effects of aqueous extract of Rhizoma Polygonati Odorati in mice and rats*. J Ethnopharmacol, 2001. **74**(3): p. 225-9.
22. Gruppuso, P.A., et al., *Hepatic protein phosphotyrosine phosphatase. Dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors in normal and alloxan diabetic rats*. Journal of Clinical Investigation, 1990. **85**(6): p. 1754-60.
23. Katsumata, K., K. Katsumata, and Y. Katsumata, *Protective Effect of Diltiazem Hydrochloride on the Occurrence of Alloxan-Induced or Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats*. Hormone and Metabolic Research, 1992. **24**(11): p. 508-510.
24. Hayashi, K., R. Kojima, and M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1110-9.
25. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
26. Weide, L.G. and P.E. Lacy, *Low-Dose Streptozocin-Induced Autoimmune Diabetes in Islet Transplantation Model*. Diabetes, 1991. **40**(9): p. 1157-1162.
27. Cakmak, A., et al., *Statin pre-treatment protects brain against focal cerebral ischemia in diabetic mice*. Journal of Surgical Research, 2007. **138**(2): p. 254-258.
28. Sitasawad, S.L., Y. Shewade, and R. Bhonde, *Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state in vivo and in vitro*. J Ethnopharmacol, 2000. **73**(1-2): p. 71-9.
29. Grover, J.K., et al., *Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice*. J Ethnopharmacol, 2001. **76**(3): p. 233-238.

30. Gali-Muhtasib, H., A. Roessner, and R. Schneider-Stock, *Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(8): p. 1249-53.
31. Dauksas, E., P.R. Venskutonis, and B. Sivik, *Comparison of oil from Nigella damascena seed recovered by pressing, conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction*. J Food Sci, 2002. **67**(3): p. 1021-1024.
32. Salem, M.L., *Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed*. International Immunopharmacology, 2005. **5**(13-14): p. 1749-1770.
33. Aggarwal, B.B., et al., *Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention*. Planta Medica, 2008. **74**(13): p. 1560-1569.
34. Baytop, T., *Geçmişte ve Bugün Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. 1999, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
35. Arslan, S.O., et al., *The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat*. Nutrition Research, 2005. **25**(7): p. 673-680.
36. Pari, L. and C. Sankaranarayanan, *Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats*. Life Sciences, 2009. **85**(23-26): p. 830-834.
37. El-Mahmoudy, A., et al., *Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism*. International Immunopharmacology, 2005. **5**(1): p. 195-207.
38. Farah, K.M., et al., *Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters*. Research in Veterinary Science, 2005. **79**(3): p. 219-223.
39. Kanter, M., et al., *Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of langerhans by Nigella sativa L. in Streptozotocin-induced diabetic rats*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2003. **201**(4): p. 213-219.
40. Kanter, M., et al., *Effects of Nigella sativa on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats*. Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology, 2004. **279A**(1): p. 685-691.
41. Kanter, M., *Effects of Nigella sativa and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy*. Neurochemical Research, 2008. **33**(1): p. 87-96.
42. Abdelmeguid, N.E., et al., *Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic beta-cells of streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal of Diabetes, 2010. **2**(4): p. 256-266.
43. Al-Enazi, M.M., *Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice*. Pak J Biol Sci, 2007. **10**(18): p. 3115-9.
44. Mu, G.G., et al., *Thymoquinone Pretreatment Overcomes the Insensitivity and Potentiates the Antitumor Effect of Gemcitabine Through Abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR Regulated Signaling Pathways in Pancreatic Cancer*. Dig Dis Sci, 2014.
45. Xu, D.S., et al., *Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo*. Oncology Reports, 2014. **31**(5): p. 2063-2070.
46. Sakalar, C., et al., *Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells*. Mol Cell Biochem, 2013. **383**(1-2): p. 243-51.
47. Talib, W.H. and M.M. Abukhader, *Combinatorial Effects of Thymoquinone on the Anticancer Activity and Hepatotoxicity of the Prodrug CB 1954*. Sci Pharm, 2013. **81**(2): p. 519-30.
48. El-Mahdy, M.A., et al., *Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells*. International Journal of Cancer, 2005. **117**(3): p. 409-417.
49. Joshi, S.R., R.M. Parikh, and A.K. Das, *Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology*. J Assoc Physicians India, 2007. **55 Suppl**: p. 19-25.

50. Wang, Y., et al., *Coordinated age-dependent and pancreatic-specific expression of mouse Reg2Reg3alpha, and Reg3beta genes*. Growth Factors, 2011. **29**(2-3): p. 72-81.
51. Huszarik, K., et al., *Adjuvant immunotherapy increases beta cell regenerative factor Reg2 in the pancreas of diabetic mice*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5120-9.
52. Liu, L., J.L. Liu, and C.B. Srikant, *Reg2 protects mouse insulinoma cells from streptozotocin-induced mitochondrial disruption and apoptosis*. Growth Factors, 2010. **28**(5): p. 370-8.
53. Pluznick, J.L., *Extra sensory perception: the role of Gpr receptors in the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(5): p. 507-12.
54. El-Dakhakhany, M., *Studies on the chemical constitution of Egyptian N. sativa L. Seeds*. Planta Medica, 1963. **11**: p. 465-470.
55. Rahmani, A.H., et al., *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.
56. Gali-Muhtasib, H., et al., *Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism*. International Journal of Oncology, 2004. **25**(4): p. 857-866.
57. Arafa el, S.A., et al., *Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells*. Mutat Res, 2011. **706**(1-2): p. 28-35.
58. Banerjee, S., et al., *Antitumor Activity of Gemcitabine and Oxaliplatin Is Augmented by Thymoquinone in Pancreatic Cancer*. Cancer Research, 2009. **69**(13): p. 5575-5583.
59. Sethi, G., K.S. Ahn, and B.B. Aggarwal, *Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis*. Molecular Cancer Research, 2008. **6**(6): p. 1059-70.
60. Gali-Muhtasib, H.U., et al., *Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes*. Anti-Cancer Drugs, 2004. **15**(4): p. 389-399.
61. Guicciardi, M.E. and G.J. Gores, *Life and death by death receptors*. Faseb Journal, 2009. **23**(6): p. 1625-1637.
62. Mohamed, A., et al., *Thymoquinone inhibits the activation of NF-kappaB in the brain and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Biomed Sci Instrum, 2005. **41**: p. 388-93.
63. Connelly, L., et al., *Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden*. Oncogene, 2011. **30**(12): p. 1402-12.
64. Tekeoglu, I., et al., *Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models*. Phytother Res, 2007. **21**(9): p. 895-7.
65. Chehl, N., et al., *Anti-inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells*. HPB (Oxford), 2009. **11**(5): p. 373-81.
66. Ravindran, J., et al., *Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(11): p. 1640-7.
67. Rajput, S., et al., *Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells*. Life Sciences, 2013. **93**(21): p. 783-790.
68. Sutton, K.M., A.L. Greenshields, and D.W. Hoskin, *Thymoquinone, A Bioactive Component of Black Caraway Seeds, Causes G1 Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells with Mutant p53*. Nutrition and Cancer-an International Journal, 2014. **66**(3): p. 408-418.

69. Woo, C.C., et al., *Thymoquinone Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis in a Breast Cancer Xenograft Mouse Model: The Role of p38 MAPK and ROS*. PLoS One, 2013. **8**(10).
70. Attoub, S., et al., *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): p. 557-569.
71. Velho-Pereira, R., et al., *Radiosensitization in human breast carcinoma cells by thymoquinone: role of cell cycle and apoptosis*. Cell Biol Int, 2011. **35**(10): p. 1025-1029.
72. Effenberger-Neidnicht, K. and R. Schobert, *Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2011. **67**(4): p. 867-874.
73. Wani, M.C., et al., *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971. **93**(9): p. 2325-7.
74. Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz, *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*. Nature, 1979. **277**(5698): p. 665-7.
75. N. Erdemoğlu, B.Ş., *The antitumor effects of the taxane class compounds*. Ankara Ecz. Fak. Derg. , 2000. **29**(1): p. 77-90.
76. Dirican, A., et al., *Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K-AKT pathway*. Clin Transl Oncol, 2015. **17**(2): p. 145-51.
77. Lettre, R., et al., *Sublines of the Ehrlich-Lettre mouse ascites tumour. A new tool for experimental cell research*. Naturwissenschaften, 1972. **59**(2): p. 59-63.
78. Dexter, D.L., et al., *Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor*. Cancer Research, 1978. **38**(10): p. 3174-81.
79. Heppner, G.H., F.R. Miller, and P.M. Shekhar, *Nontransgenic models of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(5): p. 331-4.
80. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nature Protocols, 2009. **4**(1): p. 44-57.
81. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.
82. Bai, T., et al., *Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice*. International Immunopharmacology, 2014. **19**(2): p. 351-357.
83. Ghazwani, M., et al., *Anti-fibrotic effect of thymoquinone on hepatic stellate cells*. Phytomedicine, 2014. **21**(3): p. 254-260.
84. Ashour, A.E., et al., *Thymoquinone suppression of the human hepatocellular carcinoma cell growth involves inhibition of IL-8 expression, elevated levels of TRAIL receptors, oxidative stress and apoptosis*. Mol Cell Biochem, 2014. **389**(1-2): p. 85-98.
85. Badr, G., M. Mohany, and F. Abu-Tarboush, *Thymoquinone decreases F-actin polymerization and the proliferation of human multiple myeloma cells by suppressing STAT3 phosphorylation and Bcl2/Bcl-(XL) expression*. Lipids in Health and Disease, 2011. **10**.
86. Badr, G., E.A. Lefevre, and M. Mohany, *Thymoquinone Inhibits the CXCL12-Induced Chemotaxis of Multiple Myeloma Cells and Increases Their Susceptibility to Fas-Mediated Apoptosis*. PLoS One, 2011. **6**(9).
87. Li, F., P. Rajendran, and G. Sethi, *Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway*. British Journal of Pharmacology, 2010. **161**(3): p. 541-554.

88. Rajput, S., et al., *Thymoquinone Restores Radiation-Induced TGF-beta Expression and Abrogates EMT in Chemoradiotherapy of Breast Cancer Cells*. Journal of Cellular Physiology, 2015. **230**(3): p. 620-629.
89. Kundu, J., et al., *Thymoquinone induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through inactivation of STAT3 by blocking JAK2- and Src-mediated phosphorylation of EGF receptor tyrosine kinase*. Oncology Reports, 2014. **32**(2): p. 821-828.
90. Chou, J., S. Provot, and Z. Werb, *GATA3 in Development and Cancer Differentiation: Cells GATA Have It!* Journal of Cellular Physiology, 2010. **222**(1): p. 42-49.
91. Radpour, R., et al., *Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array*. Oncogene, 2009. **28**(33): p. 2969-2978.
92. Fujii, H., et al., *Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2159-64.
93. Yusuf, R.Z., et al., *Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation*. Curr Cancer Drug Targets, 2003. **3**(1): p. 1-19.
94. Ajabnoor, G.M.A., T. Crook, and H.M. Coley, *Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells*. Cell Death & Disease, 2012. **3**.
95. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 27-30.

Table 1: Results of the Gene Expression Profiling of TQ (50 µM) Treated Cancer Cells using 3 Real-Time PCR Focus Panels

Function/Pathway	P-value	Affected Genes in the Category (total of 80 genes)
Regulation of programmed cell death	2.2E-29	Bcl2a1a, Bag3, Bid, Cflar, Fas, Fadd, Fasl, Notch1, Traf2, Birc3, Birc5, Brca1, Casp12, Casp1, Casp2, Casp4, Casp6, Casp7, Cidea, Col4a3, Csrf2, Cdkn1a,

		Fgf2, Il10, Il4, Mmp9, Myc, Nr3c1, Nol3, Prdx2, Bnip3, Bnip3l, Snai2, Trp53, Tnf, Vegfa
Immune response	2.9E-9	Fas, Fasl, Ccl7, Cxcl3, Csf2, Ifng, Il1b, Il10, Il4, Prdx2, Bnip3, Cxcl5, Bnip3l, Trp53, Tnf, Tnfsf10, VegfA
Cytokine	3.0E-9	Fasl, Ccl7, Cxcl3, Csf2, Ifng, Il1b, Il10, Il4, Cxcl5, Tnf, Tnfsf10
Induction of apoptosis through Death Receptors	5.5E-5	Bid, Cclar, Fadd, Traf2, Casp6, Casp7, Ripk1, Tnfsf10
Apoptotic mitochondrial changes	8.9E-6	Bid, Aifm1, Casp7, Myc, Trp53
Regulation of cell proliferation	2.5E-9	Gata3, Gli1, Notch1, Csf2, Cdkn1a, Egf, Fgf2, Ifng, Il10, Il4, Myc, Plau, Sfn, Ptgs2, Serpine1, Trp53, Tnf, VegfA
p53 signaling pathway	2.2E-7	Bid, Fas, Ccnd1, Ccne1, Cdk2, Cdkn1a, Sfn, Serpine1, Trp53

Table 2. A representative list of apoptosis, breast and wound-healing related genes mediated by TQ in 4T1 cells as revealed by using 3 real-time PCR arrays.

Gene symbol	Description	Gene expression fold change ± SD
Cst6*	Cystatin E/M	18.77±8.97
Cdkn1a*	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	10.61±4.14
Hic1*	Hypermethylated in cancer 1	9.97±3.13
Ctsk	Cathepsin K	9.52±0.75
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	8.65±1.06
Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	5.89±2.52
Il1b	Interleukin 1 beta	5.45±1.43

Trp53*	Transformation related protein 53	4.98±0.41
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	4.91±2.62
Egf	Epidermal growth factor	4.73±1.34
Gata3*	GATA binding protein 3	4.47±2.45
Gstp1*	Glutathione S-transferase, pi 1	3.65±0.35
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	3.64±0.15
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	3.25±0.09
Tnf	Tumor necrosis factor	2.89±0.85
Ccne1	Cyclin E1	2.86±0.85
Brca1*	Breast cancer 1	2.51±0.46
Il10	Interleukin 10	2.09±0.21
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	2.01±0.03
Mmp2	Matrix metallopeptidase 2	0.50±0.26
Mmp9	Matrix metallopeptidase 9	0.49±0.01
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	0.41±0.03
Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	0.31±0.14
Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	0.31±0.15
Casp7	Caspase 7	0.29±0.21
Casp12	Caspase 12	0.27±0.11
Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	0.25±0.02
Plau	Plasminogen activator, urokinase	0.22±0.04
Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (Trail)	0.22±0.15
Casp1	Caspase 1	0.18±0.14

*: Tumor suppressor and/or hypermethylated in breast cancer

Table 3: Results of the gene expression profile specific for the cancer cells treated with the combination TQ and Pac using 3 real-time PCR focus panels

Function/Pathway	P-value	Affected Genes in the Category (total of 64 genes)
Apoptosis	5.3E-13	Bad, Bid, Dffa, Fas, FasL, Naip2, Birc5, Casp4, Casp7, Cidea, Col4a3, Fgf2, Id1, Il6, Krt18, Bnip3l, Akt1, Tnfrsf11b, Tnfsf10 (Trail)
p53 Signaling	1.0E-5	Bid, Fas, CcnE1, Cdk2, Gadd45a, Sfn, Thbs1
Cytokine-Cytokine Interaction	1.1E-6	Il1b, Il2, Il4, Il6, Csf2, Csf3, Tnfsf10, Tnfrsf11b, Fasl, Fas, Cd40, Egfr
JAK-STAT Signaling	8.5E-4	Il2, Il4, Il6, Csf2, Csf3, Stat3, Akt1
Fas Signaling	4.5E-2	Fas, Fasl, Dff45, Casp7

Figure Legends:

Figure 1: A) Scratch wound healing assay in the presence of different concentrations of TQ. (A) Representative images were obtained at the beginning, at 12 hours and at 24 hours. a–f, Images of scratch wounds in cultures for the control, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M concentrations of TQ, respectively at the beginning. g–l, Images of scratch wounds in cultures at 12 hours. m–s, Images of scratch wounds in cultures at 24 hours. Arrows indicate the width of the wound. B) Wound width was depicted at the beginning, 12 hours and 24 hours for the control and all concentrations of TQ in the graph. Error bars indicate standard error. Star signs indicate the significant difference between the control and TQ treated samples ($p < 0.05$).

Figure 2: Induction of cytotoxicity by the combinations of TQ and Paclitaxel (Pac) *in vitro* (A) in 4T1 breast cancer cells, (B) in Ehrlich breast tumor cells. Doses of TQ (μ M) and Pac (μ g/ml) were indicated. Error bars indicate standart deviation. TQ+Pac indicates that first, TQ was added, then Pac

was added 4 h later. TQ/Pac indicates that TQ and Pac were added at the same time. Single star sign indicates the significant difference from the control. Double star sign indicates the significant difference between compared groups.

Figure 3: The effect of TQ, Pac and their combination on the growth of Ehrlich tumor *in vivo*. (A) The effect of low dose (0.64 mg/kg) and high dose (3.2 mg/kg) TQ on the growth of Ehrlich tumor in mice. (B) The effect of the combination of low dose TQ (0.64 mg/kg) and Pac (1.25 mg/kg) on the growth of Ehrlich tumor in mice. (C) The effect of the combination of high dose TQ (2.4 mg/kg) and Pac (1.25 mg/kg) on the growth of Ehrlich tumor in mice. The significant differences ($p < 0.05$) between individual groups were indicated by using a star sign. Error bars indicate standard error. The number of mice in each group (n) was shown.

Figure 4: Summarized graphical illustration of interactions of genes involved in apoptosis cascade (mainly extrinsic) and the relation of EGFR-AKT axis with apoptosis. →: Stimulatory interaction, \dashv : Inhibitory interaction, - ->: Multiple stimulatory interactions. Genes that were modulated by TQ-Pac combination are marked by star sign. Pathway related data from DAVID and KEGG databases were utilized to construct the graphical illustration [80, 81, 95].