

NRK-52E Hücre Serisinde Timokinon İndüklü PI3K/AKT/mTOR Yolak Aktivasyonu

Veysel YÜKSEK^{1*}

ÖZET: Çalışma birçok hastalığın geleneksel tedavisinde kullanılan *Nigella sativa* (çörek otu)'nın önemli içeriklerinden biri olan ve bazı ilaçların üretiminde kullanılan timokinonun (TQ), hücre proliferasyonunda rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan kavşak genlerinin ekspresyon seviyesine etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Çalışma materyali olarak NRK-52E hücre serisi kullanıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda TQ uygulanarak MTT canlılık testi ile TQ'nun proliferatif konsantrasyonu belirlendi. Belirlenen TQ konsantrasyonu hücrelere uygulandı ve PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan önemli kavşak genlerin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemiyle tespit edildi. TQ'nun belli konsantrasyona kadar hücre canlılığını artırdığı, sonrasında ise artan konsantrasyon miktarıyla birlikte sitotoksite oluşturduğu tespit edildi. TQ'nun proliferatif konsantrasyonu 10 µM olarak belirlendi. TQ uygulandıktan 24 saat sonra bir reseptör kinaz alt ünitesi olan ERBB2 artışı ile birlikte PI3K ve AKT1 gen düzeylerinin de arttığı, buna karşın mTOR ekspresyon düzeyinde azalma olduğu belirlendi. Bu verilere göre, geleneksel tıpta çokça kullanılan ve içeriğinde timokinon bulunan *N. Sativa*'nın düşük konsantrasyonda tüketilmesinin yararlı olabileceği, buna karşın yüksek konsantrasyonda tüketilmesinin böbrek hasarına yol açabileceği düşünülmektedir. Bu olasılığın araştırılmaya değer olduğu ve bu amaçla daha ileri çalışmaların planlanmasının yararlı olabileceği, TQ'un moleküler düzeyde farklı hücre türlerine olan etkisinin araştırılmasında ileriki çalışmalara ışık tutabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, hücre proliferasyonu, PI3K, AKT, mTOR

Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Thymoquinone-induced in NRK-52E Cell Line

ABSTRACT: The study was carried out to investigate the effect of thymoquinone (TQ), one of the important ingredients of *Nigella sativa* (*N. Sativa*-black seed) used in traditional treatment of many diseases and production of some drugs, on the expression level of some major genes involved in cell proliferation in the PI3K/AKT/mTOR pathway. NRK-52E cell line was used as study material. The proliferative concentration of TQ was determined by MTT viability assay by treating different concentrations of TQ on the cells. The determined TQ concentration was administered to the cells and the expression levels of the important junctional genes in the PI3K/AKT/mTOR pathway were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). It was determined that TQ increased cell viability up to a certain concentration, and then caused cytotoxicity with increasing concentration. In this study, the proliferative concentration of TQ was determined as 10 µM. It was detected that 24 hours after TQ administration, ERBB2, a receptor tyrosine kinase subunit, increased with the increase in PI3K and AKT1 gene levels, however a decrease in the mTOR expression level. According to these data, it is thought that consuming TQ and its contents in low concentrations may be beneficial, whereas consumption in high concentrations may lead to kidney damage. It was concluded that this possibility is worth investigating and it may be useful to plan further studies for this purpose and shed light on future studies in investigating the effect of TQ on different cell types at the molecular level.

Keywords: Thymoquinone, cell proliferation, PI3K, AKT, mTOR

¹Veysel YÜKSEK (Orcid ID: 0000-0001-7432-4989), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü, Van, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Veysel YÜKSEK, e-mail: veyselyukse@yyu.edu.tr

GİRİŞ

Nigella sativa (çörek otu) baharat olarak ve geleneksel tedavide yüzyıllardır kullanılan bir bitki tohumudur. Tıbbi-Nebevi'de faydalı olduğu bildirilen *N. Sativa*, Orta ve Uzak Doğu toplumlarında geleneksel tıpta; karaciğer hastalıkları, bronşit, enfeksiyonel hastalıklar ve kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2014; Khader ve Eckl, 2014). *N. sativa* tohumlarının ana bileşenleri timokinon (TQ), timol ve ditimokinon'dur. TQ, antineoplastik, antiinflamatuvar ve antioksidan ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. TQ'nun böbrekler ve böbrek hücre hattı üzerindeki önemli etkilerine dair bazı çalışmalar yapılmıştır (Ghosheh ve ark., 1999; Hosseinzadeh ve ark., 2012; Dede ve ark., 2019).

PI3K/AKT/mTOR yolağı, hücre dışı sinyallere cevap olarak metabolizmayı, hücre sağ kalımını, çoğalmayı, büyümeyi ve anjiyogenezi destekleyen bir hücre içi sinyal iletim yoludur. Bu sinyal yolunda rol oynayan kilit moleküller; reseptör tirozin kinaz (RTK'ler), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2), fosfatidilinositol-3,4,5-bisfosfat (PIP3), AKT ve Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) (Brazil ve Hemmings, 2001; Hemmings ve Restuccia, 2012).

Bu çalışmanın amacı, proliferatif konsantrasyondaki timokinonun (TQ), proliferatif etkiyi gerçekleştirirken, hücre içi moleküler düzenlemede önemli role sahip olan PI3K/AKT/mTOR yolak üzerine etkisini ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda NRK-52E böbrek hücrelerine proliferatif konsantrasyonda TQ uygulanarak PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan önemli kavşak genlerin ekspresyonu belirlendi.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Materyali

Çalışmada rat renal epitelyal NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) hücre hattı kullanıldı. PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan majör genlerin ekspresyon seviyelerine bakıldı. Hedef gen bölgelerine ait forward(F), reverse(R) primer diziliminde NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) ve Primer3web version 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee/>) web sitelerinden yararlanıldı. Her bir gene ait primer gen dizilimleri Çizelge 1 'de verildi. Çalışma öncesinde hedef genlere ait gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) reaksiyon şartları optimize edilerek tespit edildi (Çizelge 2).

Çizelge 1. RT-qPCR için hedef genler ve dizilimleri

| Gen | F (5'-3') | R (5'-3') |
|-------|------------------------|------------------------|
| ERBB2 | ATGCTCATCGCTCACAACCA | AACTCCTCCCTTCAGGATCTC |
| AKT1 | CTCCTCAAGAATGATGGCACC | ACTCAAACCTCGTTCATGGTC |
| PI3K | GGAGAACTATGAACAACCTGTG | CATCTTCCAGTAACGTAGGCAG |
| ACTB | CTCCTCAAGGATGGCACC | GCTCATTGTAGAAAGTGTGGT |
| mTOR | GCCATTGCCAGCCTCATTG | GAAAGTGTCCCCTGCCATTG |

Hücre Kültürü

NRK-52E hücresi; 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin RPMI 1640 (Kat. No: RPMI-A) besisi yerinde çoğaltıldı. Hücrelerin yoğunluğu flask içerisinde %70-80 sıklığa (confluency) ulaşıncaya pasajlandı. MTT testi için 96'lık pleytlere kuyucuk başına 10⁴ hücre ekildi. Bu pasajlama süreci, eşit sayıda hücre içeren deney grupları oluşturulurken de takip edildi.

TQ Konsantrasyonlarının Hazırlanması

TQ, Dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözdürüldü. Final konsantrasyonları (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 μ M), toksik olmayan oranda DMSO ($\leq 0.05\%$) içerecek şekilde hücre medyumunda hazırlandı.

MTT Hücre Canlılık Testi

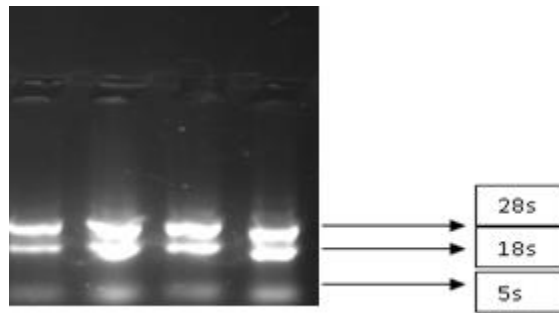
MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) canlılık testi, redoks potansiyelinin bir fonksiyonu olarak hücre canlılığını değerlendirmek için kullanıldı. Aktif olarak solunum yapan hücreler MTT'yi suda çözünmeyen mor formazana dönüştürür. Bu çalışmada hücrelere TQ final konsantrasyonları 6, 12 ve 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki medyum atılarak yerine 1/10 oranında medyumla sulandırılmış MTT solüsyonu eklenerek formazan kristalleri oluştu. Oluşan formazan MTT lizingde (100 ml için 90ml izopropil alkol, 9 ml 0.1 N HCl, 1 ml Triton-x) çözülerek herbir kuyucuğun konsantrasyonu 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlendi. TQ verilen hücrelerin canlılığı kontrol grubu %100 kabul edilerek belirlendi.

Deney Gruplarının Hazırlanması

Çalışma grupları kontrol ve TQ olarak belirlendi. Proliferatif TQ konsantrasyonu MTT ile belirlendikten sonra her bir çalışma grubu için 25 cm² lik flasklara, flask başına 75x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklendikten sonra üzerindeki medyum atıldı. Atılan medyum yerine hücrelere FBS içermeyen medyum eklenerek hücrelerin G1 fazında durması için 8 saatlik serum açlığına bırakıldı. 8 saatlik serum açlığından sonra hücrelere çalışma gruplarına göre medyumları ilave edildi. 24 saat inkübasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. Total mRNA izolasyon aşamasına geçildi.

Total mRNA İzolasyonu ve Analizi

Bu basamaktaki işlemler aksi belirtilmedikçe soğuk ortam üzerinde devam edildi. Hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra trizol reagent protokolü kullanılarak total RNA elde edildi. Saflık ve miktar tayini için spektrofotometrede (Biodrop, İngiltere) ölçüldü. rRNA'nın kırılmadan sağlam olduğunu anlamak için ise 5-7 μ L alınarak agaroz jelde yürütüldü (Şekil 1). Komplementer DNA (cDNA) sentez aşamasına geçildi.



Şekil 1.Çalışma gruplarına ait RNA agaroz jel görüntüsü.

cDNA sentezi

Elde edilen mRNA'lardan, RT-qPCR'da ekspresiyon analizinde kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA Wizbio marka (WizScript, catno: W2211) kitin önerdiği protokol kullanılarak elde edildi.

RT-qPCR

PI3K/AKT/mTOR yolak mekanizması için, Beta aktin (ACTB), ERBB-2, AKT-1, PI3K mTOR genlerinin ekspresyonları belirlendi.

RT- qPCR aşamasında, master mix kit (wizPure, kat no: w1711) kullanıldı. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır. Yöntemin aşamaları kit protokoline göre aşağıdaki Çizelge 2’de özetlendiği şekilde yapıldı.

Çizelge 2. RT-qPCR için reaksiyon içeriği

| Reaksiyon içeriği | Bir örnek için | Reaksiyon döngüsü |
|-------------------|--------------------------------|--|
| Master miks (2X) | 10 µL | *95°C 7' denatürasyon |
| Primer | Forward: 1 µL Reverse: 1 µL | *95°C 20" *52-55°C 60" |
| dH ₂ O | 7 µL | } 40 döngü <i>MeltingCurve</i> |
| cDNA | 1 µL | |
| Toplam | 20 µL | Ramp: 50-99 (1'er derece artış) ‘‘90 °C 5’’ |

*Başlangıç denatürasyonu, master mix protolüne göre yapıldı. Hedef genlerin baz uzunluğu yaklaşık olarak 140-180 bp aralığındadır. Daha önce optimizasyonu yapılan tüm hedef genlerin primer bağlanma sıcaklığı (tm) belirlendi. Dolayısıyla tm sıcaklıkları değişkenlik gösterdi.

Kontrol geni olarak beta aktin (ACTB) kullanıldı. Her bir örnek için üç bağımsız tekrar yapıldı. Bir ct (cyclethreshold), amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi.

Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla tespit edildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Gruplar arasındaki farklılık kontrol genin ekspresyonunun artış-azalış kat (foldchanges) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

İstatistik Analiz

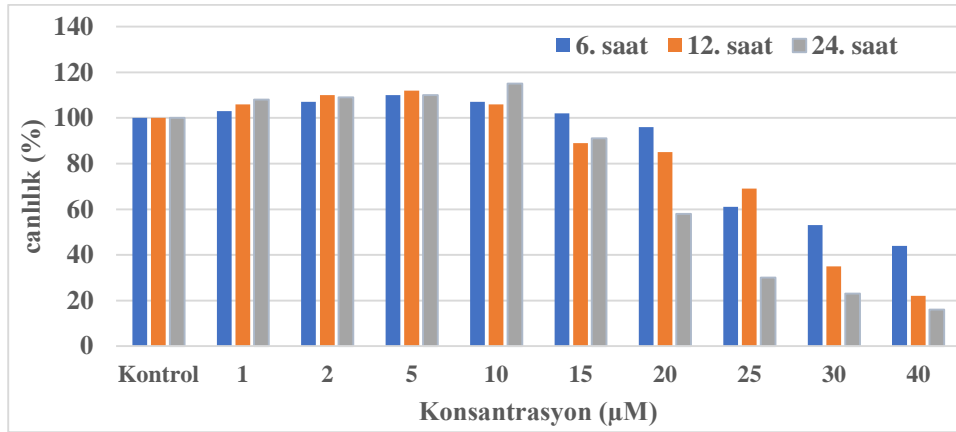
Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edildi. Gruplar arasında özelliklere göre farklılık olup olmadığını belirlemek için Student-t testi yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmıştır. Hesaplamalar için SPSS (ver: 22) istatistik paket programı kullanıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA**MTT sonuçları**

Çalışmadan elde edilen MTT sonuçları, kontrol grupları %100 canlı olarak kabul edilerek hesaplandı. 12 ve 24 saat için 10 µM konsantrasyona kadar, 6 saat için ise 15 µM kadar kontrol grubuna göre hücre canlılığının arttığı tespit edildi. Genel itibarıyla 20 µM konsantrasyondan sonra TQ sitotoksik etki gösterdiği görüldü. 6 saat için en yüksek hücre proliferasyonu %10 artışla 5 µM, 12 saat için %12 artışla 5 µM ve 24 saat için ise %15 artışla 10 µM olarak hesaplandı (Çizelge 3 ve Şekil 2). RT-qPCR çalışması için gruplara uygulanacak TQ konsantrasyonu 10 µM olarak belirlendi.

Çizelge 3. Süre ve konsantrasyona bağlı olarak elde edilen MTT canlılık testi sonuçları

| | Kontrol | 1 µM | 2 µM | 5 µM | 10 µM | 15 µM | 20 µM | 25 µM | 30 µM | 40 µM |
|----------|---------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 6. saat | 100 | 103 | 107 | 110 | 107 | 102 | 96 | 61 | 53 | 44 |
| 12. saat | 100 | 106 | 110 | 112 | 106 | 89 | 85 | 69 | 35 | 22 |
| 24. saat | 100 | 108 | 109 | 110 | 115 | 91 | 58 | 30 | 23 | 16 |



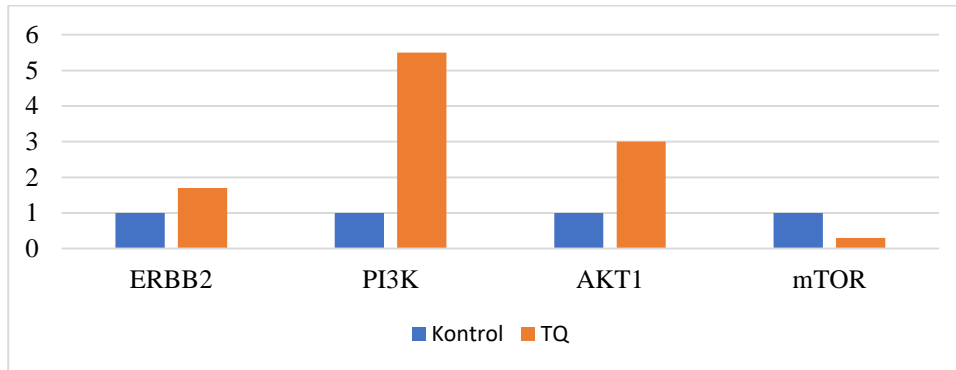
Şekil 2. Süre ve konsantrasyona bağlı olarak uygulanan farklı konsantrasyondaki TQ MTT grafiği

Çalışmaya ait hedef genlerin ekspresyon seviyeleri Çizelge 4 ve Şekil 3'te verildiği gibidir. Kontrol grubuna göre, ERBB2, PI3K ve AKT1 genlerde ekspresyonun istatistiksel olarak artış ($P<0.05$) gösterdiği tespit edildi. mTOR gen ekspresyonunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma ($P<0.05$) belirlendi.

Çizelge 4. Çalışma gruplarına ait hedef genlerin RT-qPCR ekspresyon değişimleri

| | Kontrol grubu S±SD (N:6) | TQ grubu S±SD (N:6) | *p. |
|-------|--------------------------|---------------------|-------|
| ERBB2 | 1.00±0.00 | 1.73±0,91 | 0.042 |
| PI3K | 1.00±0.00 | 5.54±2,54 | 0.005 |
| AKT1 | 1.00±0.00 | 2.97±2.07 | 0.005 |
| mTOR | 1.00±0.00 | 0.31±0.23 | 0.028 |

*($P<0.05$) göre sonuçlar önemlidir.



Şekil 3. Hedef genlere ait gen ekspresyon düzey grafiği

Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada, NRK-52E hücre serisine zaman ve süreye bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda TQ uygulandı ve TQ'nun süreye bağlı olarak belli konsantrasyona kadar hücre proliferasyonunu artırdığı, sonrasında ise sitotoksik etki göstererek hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edildi (Yüksek ve ark., 2017). Bu sonuçların, mevcut sunulan çalışma ile uyumlu olduğu görüldü.

Kanser hücre serilerine zamana ve konsantrasyona bağlı olarak TQ uygulanarak hücre proliferasyonu ve sitotoksik konsantrasyon belirlenmesi yapılan çalışmalar mevcuttur. Xu ve ark. (2014), TFK-1 and HuCCT1 hücre serilerine farklı dozlarda (0-80 µM) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak TQ uyguladıkları çalışmada 10 µM'dan itibaren hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre hızla düştüğünü saptamışlar. Ayrıca aynı çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonunda PI3K/AKT

yolağında yer alan p-AKT ve AKT miktarı belirlenmiş ve AKT miktarının değişmediği, p-AKT miktarının TQ konsantrasyonu artıktça azaldığı görülmüş.

HSCs ve sağlıklı hücelere farklı konsantrasyonlarda (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 μ M) TQ uygulandıktan 24 sonra yapılan MTT testi sonucunda, 3.125 ve 6.25 μ M TQ uyguladıkları hücelerde hücre proliferasyonun kontrol grubuna göre değişmediği, fakat 12.5'dan itibaren hücre proliferasyonun giderek azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmada sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki TQ'nun HSC hücelerinde PI3K ve AKT miktarını değiştirmedeği, fakat bunların fosforilasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Bai ve ark., 2013). Yapılan birçok farklı çalışmalarda sitotoksik konsantrasyondaki TQ nun kanser hücelerinde PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Yang et al., 2014; Iskender et al., 2016).

Sunulan bu çalışmada NRK-52E hücelerine farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulan TQ'nun konsantrasyon ve süreye bağlı olarak proliferasyon artış miktarları değişkenlik gösterse de 10 μ M kadar olan konsantrasyonlarda hücre proliferasyonun arttığı tespit edildi. MTT sonucuna göre TQ konsantrasyonun belli bir konsantrasyona kadar hücre proliferasyonunu artırması literatürlerle uyumlu değildir. Bunun nedenleri, yapılan farklı çalışmalarda kullanılan hücre türlerinin birçoğunun kanser hüceleri olması, yani sağlıklı hücre serileri olmaması, kullanılan hücelerin insan kökenli olması ve kuyucuk başına ekilen hücre sayılarının farklı olmasından kaynaklı olabilir. Buna karşın 10 μ M dan sonra artan TQ konsantrasyonların sitotoksik etki göstermesi ise literatürlerle uyumludur.

Bu çalışmada proliferatif konsantrasyon olarak 10 μ M uygulandıktan 24 saat sonra RT-qPCR ile tespit edilen gen ekspresyon sonuçlarına göre, bir reseptör kinaz alt ünitesi olan ERBB2 gen ekspresyonunda artış olduğu, bununla birlikte PI3K ve AKT1 gen düzeylerinin de arttığı ve bu durumun proliferatif konsantrasyonda verilen TQ'nun MTT sonuçlarıyla uyumlu olduğu görüldü. Fakat TQ uygulaması sonucu artan PI3K, AKT1 artışına karşı mTOR gen ekspresyon düzeyinde bir azalma tespit edildi. Ancak kanser hücelerindeki hücre proliferasyonu ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalarda PI3K/AKT yolağında yer alan AKT gen ekspresyon artışı ile birlikte mTOR ekspresyonun arttığı rapor edilmiş (Beck ve ark., 2014; Porta ve ark., 2014). Bu durumun, TQ uygulanan hücre hatlarının ve uygulama dozlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, proliferatif TQ konsantrasyonlarının NRK-52E çoğalmasını arttırdığı, buna karşın artan TQ konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu azaldığı görüldü. TQ'nun NRK-52E proliferasyonunu arttırırken hücre döngüsü, hücre çoğalması, hücre sağ-kalımı vb hücre içi moleköleri düzenleyen PI3K/AKT/mTOR yolağını kullandığı, bu yolağın aktivasyonunu hücre dışı sinyalizasyon iletimini kullanarak reseptör tirozin kinazı (RTK) arttırarak yaptığı, proliferasyonu mTOR üzerinden değil, farklı bir yolak üzerinden sağladığı düşünölmektedir. Bu verilere göre, geleneksel tıpta çokça kullanılan ve içeriğinde timokinon bulunan *N. Sativa*'nın düşük konsantrasyonda tüketilmesinin yararlı olabileceği, buna karşın yüksek konsantrasyonda tüketilmesinin böbrek hasarına yol açabileceği düşünölmektedir. Bu olasılığının araştırılmaya değer olduğu ve bu amaçla daha ileri çalışmalarda planlanmasının yararlı olabileceği ve TQ'un molekölür düzeyde, farklı hücre türlerine olan etkisinin araştırılmasında ileriki çalışmalara ışık tutabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

Bai T, Lian LH, Wu YL, Wan Y, Nan JX, 2013. Thymoquinone Attenuates Liver Fibrosis via PI3K and TLR4 Signaling Pathways in Activated Hepatic Stellate Cells. *International Immunopharmacology*, 15(2):275-281. doi: 10.1016/j.intimp.2012.12.020.

- Beck JT, Ismail A, Tolomeo C, 2014. Targeting The Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway: an Emerging Treatment Strategy for Squamous Cell Lung Carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 40(8): 980-989. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.06.006.
- Brazil DP, Hemmings BA, 2001. Ten Years of Protein Kinase B Signalling: A Hard Akt to Follow. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11): 657-664. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01958-2.
- Dede S, Yur F, Taşpınar M, Çetin S, Usta A, Yüksek V, 2019. In Vitro Evaluation of Thymoquinone and Lycopene Supplementation on Oxidative DNA Damage and Oxidant Status in High Glucose Conditions. *Latin American Journal Pharmacy*, 38 (1): 209-912.
- Ghosheh OA, Houdi A, Crooks PA, 1999. High Performance Liquid Chromatography Analysis of The Pharmacologically Active Quinines and Related Compounds in The Oil of The Black Seed (*Nigella Sativa*). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(5): 757-762.
- Hemmings BA, Restuccia DF, 2015. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1;4(9): a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189.
- Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M, 2012. Effect of Thymoquinone, a Constituent of *Nigella Sativa* L., On İschemia–Reperfusion İn Rat Skeletal Muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(5), 503-508.
- Iskender B, Izgi K, Canatan H, 2016. Novel Anti-Cancer Agent Myrtucommulone-A And Thymoquinone Abrogate Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells Mainly Through The İnhibition of PI3K/AKT Signalling Axis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 416(1-2):71-84. doi: 10.1007/s11010-016-2697-y.
- Khader M, Eckl PM, 2014. Thymoquinone: An Emerging Natural Drug withth a Wide Range of Medical Applications. *Iran Journal Basic Medicine Science*, 17(12): 950-957
- Porta C, Paglino C, Mosca A, 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 14;4:64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064.
- Xu D, Ma Y, Zhao B, Li S, Zhang Y, Pan S, Wu Y, Wang J, Wang D, Pan H, Liu L, Jiang H, 2014. Thymoquinone Induces G2/M Arrest, Inactivates PI3K/Akt and Nuclear factor-κB Pathways in Human Cholangiocarcinomas both *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*, 31(5):2063-2070. doi: 10.3892/or.2014.3059..
- Yang XL, Lin FJ, Guo YJ, Shao ZM, Ou ZL, 2014. Gemcitabine Resistance in Breast Cancer Cells Regulated By PI3K/AKT-Mediated Cellular Proliferation Exerts Negative Feedback via The MEK/MAPK and mTOR Pathways. *OncoTargets and Therapy*, 7:1033-1042. doi: 10.2147/OTT.S63145.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Yur F, Çetin S, 2017. Effects of Thymoquinone Application in The Renal Cell Line. *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, Konya, May 10-12, 2017*, pp: 842-844.