



T.C

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TİMOKİNONUN SİRTÜİN
GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şahadet YEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezli Yüksek Lisans Programı

DANIŞMAN

Prof.Dr. Emel ŞAHİN

Gaziantep

2024



T.C

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TİMOKİNONUN SİRTÜİN
GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şahadet YEL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezli Yüksek Lisans Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Gaziantep

2024

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TİMOKİNONUN SİRTÜİN GEN
İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞAHADET YEL

Tez Savunma Tarihi: 11/06/2024

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne; Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmza

Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Doç. Dr. Gülper NACARKAHYA

Dr. Öğr. Üyesi Murat KORKMAZ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

11.06.2024

Şahadet YEL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilimsel katkısını, tecrübeleri, önerileri ve tüm desteklerinden dolayı değerli tez danışmanım Prof. Dr. Emel ŞAHİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans boyunca desteklerini esirgemeyen maddi manevi her türlü yanımda olan çok kıymetli arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, tecrübelerini ve güleryüzlerini eksik etmeyen Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ederim.

Beraber bu yola çıktığımız ve her anımızı paylaştığımız canım arkadaşım Kevser İNCE'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan hiçbir desteğini esirgemeyen, benim için her zaman en iyisini isteyen, bu günlere gelmemi sağlayan ve hayattaki en büyük şansım olan canım babam Hıfzullah YEL ve canım annem Celile YEL başta olmak üzere tüm AİLEM'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF. YLT.22.74 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam için maddi olarak destek olan Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Akciğer Kanseri.....	5
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemolojisi.....	6
2.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri	8
2.1.3. Akciğer Kanseri Tedavi Yaklaşımları	8
2.2. Sirtüinler.....	9
2.2.1. Sirtüin 1 (SIRT 1)	12
2.2.2. Sirtüin 2 (SIRT 2)	16
2.2.3. Sirtüin 3 (SIRT3)	18
2.2.4. Sirtüin 4 (SIRT4)	21
2.2.5. Sirtüin 5 (SIRT5)	23
2.2.6. Sirtüin 6 (SIRT6)	24
2.2.7. Sirtüin 7 (SIRT 7)	26
2.3. Timokinon (TQ)	28
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	31
3.1. Hücre Kültürü ve Hazırlık	32
3.1.1. Sterilizasyon.....	32
3.1.3. Besiyerinin Hazırlanması.....	32
3.1.4. Hücre Hatlarının Kültürü	32
3.1.5. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	33
3.1.6. Hücre Hatlarının Dondurulması.....	33
3.2. Timokinon Stok Hazırlanması.....	34
3.3. MTT ile Hücre Canlılık Deneyleri	34
3.3.1. Timokinon'un Farklı Dozları ile MTT Deneyi.....	34
3.4. İlaç Uygulamasının Gen İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi	35
3.4.1. Total RNA İzolasyonu	35
3.4.2. Elde Edilen RNA'nın Kalite ve Miktar Tayini	36

3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	37
3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	38
3.5. İstatistiksel Analizler	
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre proliferasyonu	42
4.2. Timokinon'un BEAS-2B Hücre Hattındaki Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	45
4.2.1. Sirtüin 1 (SIRT 1)	45
4.2.2 Sirtüin 2 (SIRT 2)	46
4.2.3 Sirtüin 3 (SIRT3)	46
4.2.4. Sirtüin 4 (SIRT4)	47
4.2.5. Sirtüin 5 (SIRT5)	48
4.2.6. Sirtüin 6 (SIRT6)	49
4.2.7. Sirtüin 7 (SIRT7)	50
4.3.1 Sirtüin 1 (SIRT1)	51
4.3.2 Sirtüin 2 (SIRT2)	52
4.3.3 Sirtüin 3 (SIRT3)	53
4.3.4 Sirtüin 4 (SIRT4)	54
4.3.5. Sirtüin 5 (SIRT5)	55
4.3.6. Sirtüin 6 (SIRT6)	56
4.3.7. Sirtüin 7 (SIRT7)	57
4.4. Timokinon'un CALU-1 Hücre Hattındaki Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	58
4.4.1 Sirtüin 1 (SIRT1)	58
4.4.2 Sirtüin 2 (SIRT2)	59
4.4.3 Sirtüin 3 (SIRT3)	60
4.4.4. Sirtüin 4 (SIRT4)	61
4.4.5. Sirtüin 5 (SIRT5)	62
4.4.6. Sirtüin 6 (SIRT6)	63
4.4.7. Sirtüin 7 (SIRT7)	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	66
6. KAYNAK	74
7. ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR ve SİMGELER

ADP:	Adenozin difosfat
ATP:	Adenozin trifosfat
ATM	Ataksi-telonjektazı
ATG7	Esansiyel otofaji geni
ACOX1	Asitil koenzim A oksidaz 1
AMPK/mTOR	Adenozin monofosfat protein kinaz
AMP	Adenozin monofosfat
ATGL	Adipoz trigliserit lipaz
AO	Osteoartrit
AR	Androjen reseptörü
AKT	Protein kinaz
AMPAR	a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonat reseptörü
APC	Antijen sunucu hücreler
AROS	Endojen aktif düzenleyici
BUB	Uzun ömür geni
CAT	Katalaz
CAF-CM	Karsinoma ile ilişkili fibroblast
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CPS:	Karbamoilofosfat sentetazını
CNS	Merkezi sinir sistemi
dsRNA/dsDNA	Çift sarmallı asit
DNA:	Deoksiriboz nükleik asit
ECM	Ekstraselüloz matriks

EMT	Epitel mezenkimal dönüşümü
E2F1	Transkripsiyon faktörü
FAO	Yağ asidi oksidasyonu
FOXO3 _a	Forkhead box-O transkripsiyon faktörleri 3 alfa
GES	Mide epitel hücreleri
GSK-3 β	Glikojen sentaz 3 beta
H:	Histon
H3K18:	H3 lizin 18
H3K9	Histon 3 lizin 9
HDAC2	Histon deasetilaz 2
HIF-1 α	Hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 alfa
Hst:	Histon deasetilaz
H4Lys16	Histin 4 lizin 16
hESC	İnsan embriyonik kök hücre
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HBE	Hepatit B virüs
hMSC	Mezenkimal kök hücreleri
HRE	Hipoksi tepki elemanı
IHC	İmmünohistokimya
IDH2	İzositrat dehidrojenaz 2
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IC50	İnhibitör konsantrasyonu
KHDAK:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KHAK:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KLF4	Krüppel benzeri faktör 4
KDa	Kilodalton
LAD	Lökosit adezyon defekti
LUAD :	Akciğer adenokarsinomu
LUSC :	Akciğer skuamöz hücreli karsinomu (Lung squamous cell carcinoma,)
Lys	Lizin
LPS	Lipopolisakkarit
LSD1	Demetilaz 1
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MEK/ERK	Mitojenle Aktifleştirilen protein kinaz
MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
NAD ⁺ :	Nikotinamid Adenin Dinükleotit okside
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NAFLD	Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı
NAM	Nikotinamid
NBS1:	Nijmegen kırılma sendromu 1
NHEJ:	Homolog olmayan uç birleştirme
NF-κB:	Nükleer faktör kappa B
nNTP	Deoksinükleotid trifosfat
NLS	Nükleer lokalizasyon sekansları
NoLS	Nükleolar lokalizasyon sekansları
NIH/3T3	Fare embriyonik fibroblast
N.Sativa	Nigella sativa
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

NOX4	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz 4
NRF2	Nükleer faktör eritroid ile ilişkili faktör 2
PARP1:	Poli(ADP-riboz) polimeraz 1
PDH	Piruvat dehidrojenaz kompleks
PD:	Parkinson Hastalığı
PGC-1a	Enerji metabolizması düzenleyici 1 alfa
PEPCK1	Fosfoenol piruvat karboksikinazın
PPAR- γ	Nükleer reseptör protein gama
PML	Promiyelostik lösemi proteini
p53:	Tümör protein 53
53BP1:	p53 bağlayıcı protein 1
rDNA:	Rekombinant DNA
rRNA:	Ribozomal RNA
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SASP	Yaşlılık ile ilişkili salgı fenotipi
SIRT:	Sirtüinler
Sir2:	Maya sessiz bilgi düzenleyici 2
SOD	Süperoksit dismutaz
SMC1a	Kromozomların yapısal bakımı proteini 1 alfa
T2D	Tip 2 diyabet
TNF _a	Tümör nekroz faktörü alfa
TRL	Toll benzeri reseptör
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asid

3T3-L1	Fare fibroblast diyabet hücre modeli
TSP:	Tümör baskılayıcı protein
TQ:	Thymoquinone
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. 2020 yılında ülkemizde hem kadınlarda hemde erkeklerde en sık görülen kanser türleri istatistikleri gösterimi	7
Şekil 2. 2. Yedi memeli sirtüinlerin fonksiyonları, hedefleri ve işlevleri bulundukları konumları gösterimi	10
Şekil 2. 3. Sir 2 tarafından katalize edilen protein asetilasyonlarının deasetillenmesi... 11	
Şekil 2. 4. SIRT 1'in NAD ⁺ hidrolize ederek ve asetilenmiş protein substratların kullanarak deasetillenme oluşurması	13
Şekil 2. 5. Çeşitli dokularda SIRT 1'in fayda sağladığı metabolik düzenlemeler	14
Şekil 2. 6. SIRT2 kanserde düzensizdir. SIRT2 diğer kanserler ile ilişkisi	18
Şekil 2. 7. SIRT3 hedeflerinin ve biyolojik fonksiyonlarının şematik gösterimi;.....	20
Şekil 2. 8. SIRT4 ve mitokondriyal metabolik yollardaki substratları	22
Şekil 2. 9. SIRT 6'nın rol aldığı mekanizmalar	25
Şekil 2. 10. SIRT7'nin özelliklerinin gösterimi.	27
Şekil 2. 11. Nigella Sativa bitkisi, tohumu ve timokinonun kimyasal formülü	29
Şekil 4. 1. Timokinon'un BEAS-2B hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri.....	42
Şekil 4. 2. Timokinon'un A549 hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri.....	43
Şekil 4. 3. Timokinon'un CALU-1 hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri.....	44
Şekil 4. 4. Sirtüin 1'in BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	45
Şekil 4. 5. Sirtüin 2'nin BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	46
Şekil 4. 6. Sirtüin 3'ün BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.	47
Şekil 4. 7. Sirtüin 4'ün BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	48
Şekil 4. 8. Sirtüin 5'in BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	49
Şekil 4. 9. Sirtüin 6'nın BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	50
Şekil 4. 10. Sirtüin 7'nin BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi.....	51
Şekil 4. 11. Sirtüin 1'in A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	52
Şekil 4. 12. Sirtüin 2'nin A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	53
Şekil 4. 13. Sirtüin 3'ün A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	54
Şekil 4. 14. Sirtüin 4'ün A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	55
Şekil 4. 15. Sirtüin 5'in A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	56
Şekil 4. 16. Sirtüin 6'nın A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	57

Şekil 4. 17. Sirtüin 7'nin A549 hücre hattındaki ifade düzeyi.	58
Şekil 4. 18. Sirtüin 1'in CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.	59
Şekil 4. 19. Sirtüin 2'nin CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	60
Şekil 4. 20. Sirtüin 3'ün CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	61
Şekil 4. 21. Sirtüin 4'ün CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	62
Şekil 4. 22. Sirtüin 5'in CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi..	63
Şekil 4. 23. Sirtüin 6'nın CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	64
Şekil 4. 24. Sirtüin 7'nin CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi.....	65



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3. 1. Çalışmada kullandığımız akciğer kanseri hücre soylarının özellikleri (ATCC).....	33
Tablo 3. 2. 2X RT-master mix içeriği.....	37
Tablo 3. 3. PCR zaman ve sıcaklık ayarları.....	38
Tablo 3. 4. Gerçek zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri	39
Tablo 3. 6. RT-PCR sıcaklık ve zaman ayarı	39
Tablo 3.7. Gen primer dizileri	40



ÖZET

AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TİMOKİNONUN SİRTÜİN GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şahadet YEL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

HAZİRAN 2024, 103 sayfa

Akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen ölümcül heterojen malign bir hastalıktır. Sirtüinler (SIRT), NAD⁺-bağımlı lizin deasetilazlar ve/veya ADP ribozil transferazlar olarak bilinirler. Memelilerde bulunan yedi farklı sirtüinin (SIRT1-7) ekspresse edildiği bilinmektedir. Timokinonun (TQ), *Nigella sativa* bitkisinin (% 54) uçucu yağının biyoaktif bir bileşeni olduğu bilinmektedir. Hem laboratuvar koşullarında (in vitro) hem de canlı organizmalarda (in vivo) yapılan çalışmalarda TQ'nun anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser etkileri olduğu açıklanmıştır. Bu çalışmanın amacı akciğer kanseri hücrelerinde timokinonun sirtüin gen ifadeleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla akciğer normal ve kanser hücre hatları, 0, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda TQ ile 24, 48 ve 72 saat kültüre edilmiş, ardından hücre canlılıklarının ve IC50 değerlerinin tespiti için MTT deneyleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, TQ'un 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda 24 saatlik inkübasyonlarının normal ve akciğer kanseri hücrelerinde sirtüin (SIRT1-7) gen ifadeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile qRT-PCR deneyleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, timokinonun farklı konsantrasyonda bulunan dozlarının akciğer normal hücre hattında sirtüin aktivitelerini anlamlı bir şekilde artırdığı görülmüştür. Kanser hücre hatlarında timokinonun, doza bağlı olarak sirtüin gen ifadelerini anlamlı bir şekilde artırdığı, bununla birlikte A549 hücrelerinde SIRT5 ve SIRT7 ile Calu-1 hücrelerinde ise SIRT3 ve SIRT5 gen ifadelerini doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, Gen ifadesi, qRT-PCR, Sirtüin, Timokinon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THYMOQUINONE ON SIRTUIN GENE EXPRESSIONS IN LUNG CANCER CELLS

Şahadet YEL

Master of Science Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

JUNE 2024, 103 pages

Lung cancer is the most common lethal heterogeneous malignant disease in both men and women. Sirtuins (SIRT) are known as NAD⁺-dependent lysine deacetylases and/or ADP ribosyl transferases. Seven different sirtuins (SIRT1-7) are known to be expressed in mammals. Thymoquinone (TQ) is known to be a bioactive component of the essential oil of the *Nigella sativa* plant (54%). Studies conducted both under laboratory conditions (in vitro) and in living organisms (in vivo) have revealed that TQ has anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-cancer effects. This study aims to investigate the effects of thymoquinone on sirtuin gene expressions in lung cancer cells. For this purpose, lung normal and cancer cell lines were cultured with TQ at 0, 25, 50, 100 and 200 µM concentrations for 24, 48 and 72 hours, and then MTT experiments were performed to determine cell viability and IC₅₀ values. In line with the findings, qRT-PCR experiments were carried out to determine the effects of 24-hour incubation of TQ at 25, 50 and 100 µM concentrations on sirtuin (SIRT1-7) gene expressions in normal and lung cancer cells. According to the findings, it was found that different concentrations of thymoquinone significantly increased sirtuin activities in the lung normal cell line. It was determined that in cancer cell lines, thymoquinone significantly increased sirtuin gene expressions dose-dependently, while it decreased SIRT5 and SIRT7 gene expressions in A549 cells and SIRT3 and SIRT5 gene expressions in Calu-1 cells dose-dependently.

Keywords: Gene expression, Lung cancer, qRT-PCR, Sirtuin, Thymoquinone

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen ölümcül heterojen malign bir hastalıktır (1). Akciğer malignitelerinin tedavi süreci oldukça güçtür ve bu hastalığın geç aşamalarda teşhis edilmesi ölümcül olmasına neden olmaktadır (2). Akciğer kanseri histolojik olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak sınıflandırılır (3). Akciğer kanserinin yaklaşık %85'ini oluşturan KHDAK, temel olarak akciğer adenokarsinomu (Lung adenocarcinoma, LUAD) ve akciğer skuamöz hücreli karsinomu (Lung squamous cell carcinoma, LUSC) olarak iki alt gruba ayrılır (4). Akciğer kanseri için yapılan sınıflandırılma tedavi kararları ve prognozu belirlemek için kullanılır. Adenokarsinomlar genellikle akciğer hastalığı olan bireylerde erken metastaz yapan heterojen periferik kitlelerdir (5). Skuamöz hücreli karsinomlar hemoptizi, postobstrüktif pnömoni veya lobar kollaps ile ortaya çıkabilen santral yerleşimli endobronşiyal kitlelerdir ve hastalık aşamasında skuamöz hücreli karsinomlarda geç metastaz görülür. Küçük hücreli karsinomlar genellikle geniş mediastinal tutulum ile merkezi yerleşim gösterir ve küçük hücreli karsinomlar erken ekstratorasik metastazlarla ilişkilidir. Küçük hücreli karsinomlar kemoterapiye yanıt vermelerine rağmen tanı anında ileri evrelerde görüldükleri bilinmektedir. Büyük hücreli karsinomlar kötü diferansiyeli ve erken metastazlar ile ilişkili büyük periferik tümör kitleleridir (6). KHDAK'de tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapidir. Akciğer kanserinin tümörjenezisi karmaşıktır ve akciğer kanser gelişiminin hem iç faktörler hem de dış faktörler ile ilişkili olduğu bilinmektedir (4). Akciğer kanseri vakalarında en yaygın görülen semptomlar; öksürük, yorgunluk, nefes darlığı, göğüs ağrısı, kilo kaybı ve hemoptizidir (5).

Sirtüinler (SIRT), NAD⁺-bağımlı lizin deasetilazlar ve/veya ADP ribozil transferazlar olarak bilinirler. Sirtüinler tarafından katalize edilen deasetilasyon sırasında, NAD⁺ molekülündeki nikotinamid ve riboz arasındaki kimyasal bağın kırılması, asetil grubunun substrattan (asetillenmiş lizin kalıntısı) ADP-riboz molekülü içindeki riboza transferi ile birleştirilir. Reaksiyonun ürünleri, deasetillenmiş lizin kalıntısı, 2'-O-asetil ADP-riboz ve nikotinamid'dir. ADP ribozil transferaz aktivitesinin bulunduğu reaksiyonlarda NAD⁺ hedef proteinler için ADP-riboz grubu donörü olarak kullanılır (7). Memelilerde bilinen

yedi sirtüin bulunur ve bu sirtüinler 275 aminoasitlik katalitik alt birimden oluşur. Bu yedi sirtüin ailesinden bazıları deasetilaz aktivitesi gösterirken bazıları da deasilaz/desüksinilaz ve demalonilaz aktivitesi gösterir (8). Maya sessiz bilgi düzenleyici 2'ye (Sir2) homolog olan sirtüinler (SIRT1-7) memelilerde yaygın olarak ekspresse edilmektedir. (9) Memeli hücrelerinde sirtüinler çeşitli hücre altı konumlarda bulunurlar. SIRT1 çekirdekte gibi görünse de belirli hücrel koşullarda sitoplazmada da saptanabilmektedir. SIRT2 sitoplazmiktir fakat hücre döngüsünün belirli aşamalarında çekirdekte lokalize olurlar. SIRT1 en sık çalışılan ve en iyi keşfedilen insan sirtüinidir (10). SIRT1 aracılı deasetilasyon birçok biyolojik sürecin yanı sıra hücrel yaşlanma, şeker ve lipid metabolizması, apoptoz, oksidatif stres ve inflamasyon gibi süreçleri etkiler (11). Apoptoz, hücre döngüsü, sirkadiyen ritimler, mitokondriyal fonksiyon ve metabolizma için memeli SIRT1, önemli bir dizi hedef proteinini deasetiller (12). Sitoplazmada bulunan SIRT2 normal ve metabolik hastalıkta ATP oluşumunu, mitokondriyal dinamikleri, oksidatif stresi ve mitokondriyal biyogenezi düzenler (13). SIRT2 α - tübülini deasetilleyerek mikrotübül dinamiklerinin düzenlenmesinde rol alır. SIRT2, p53'ü, nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B) ve bir dizi metabolik enzimi deasetiller (14, 15). SIRT2, H4 histonu içindeki Lys 16' yı deasetilleyerek G2/M kontrol noktasında kromatin yoğunlaşmasına neden olur (16).

SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondriyaldir (17). SIRT3, SIRT4 ve SIRT5, ATP sentezi, apoptoz, metabolizma ve hücre içi sinyalleşmenin düzenlenmesinde rol alırlar. SIRT3'ün DNA hasarı önleyici etkisi bulunur ve bu özelliğinden dolayı SIRT3 bir tümör baskılayıcı protein (TSP)'dir (7). SIRT3, deaasetilasyon aktivitesi ile mitokondriyal aktiviteyi düzenler (18). Mitokondriyal solunum zincir kompleksinin alt biriminde bulunan proteinlerini deasetilleyen SIRT3'ün, enerji üretimini destekleyebildiği açıklanmıştır. Ayrıca SIRT3'ün hücre içi metabolik dengeyi sağlayabildiği görülmüştür (19). SIRT4, ADP-ribozil-transferaz ve lizin deasetilaz aktivitesi gösterir. Birçok besinin katabolizmasının düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün ilerlemesinde sinyal yollarına aracılık eder (20). SIRT4'ün yaşa bağlı hastalıkların ilerlemesi ile bağlantılı mitokondriyal fonksiyonları doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediği bildirilmiştir. Bunun yanında, beyaz yağ dokusunun ve iskelet kasındaki malonil-CoA dekarboksilazın aktivitesini deasetilleyerek inhibe eder (21, 22). SIRT4, lizin metabolizmasının ve insülin sekresyonunun kontrolünde rol alan lizin deaasilaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, mitokondride lipid metabolizmasının düzenlenmesinde ve reaktif oksijen türlerinin

retiminde rol alır. Mitokondriyal glutamin metabolizmasını inhibe ederek tümör baskılayıcı aktivite sağlar (23, 24). SIRT5 mitokondriyaldır ve desüksinilaz ile demalonilaz aktivitesi gösterir. Karbamoil fosfat sentetazı (CPS) aktive ederek üre döngüsünü düzenler (25). SIRT5 farklı kanser türlerinde bir tümör baskılayıcı veya onkogen görevi görür (26). Ayrıca, yağ asidi β -oksidasyonunu ve keton cisimleri sentezini düzenlemede rol alır (27).

SIRT6 enzimatik aktiviteleri bulunan çok işlevli nükleer bir proteindir. SIRT6 translasyon sonrası modifikasyonlar yolu ile gen ekspresyonunu ya da protein aktivitesini düzenler. SIRT6 bir mono-ADP-ribozilasyon enzimi olarak bilinir ve DNA hasarı onarımını sağlar. Kromozom yapısını koruması ve enerji metabolizmasını dzenleyebilmesinden dolayı hücrelerin, dokuların, organların ve vücudun yaşlanmasını engellemektedir. SIRT6 kanser gelişim sürecini düzenler (28). SIRT7 bir nükleer proteindir ve rRNA transkripsiyonunu düzenler, DNA onarımını ve genomik stabiliteyi korur. SIRT7, deasetilaz, mono-ADP-ribosilaz, desüksinilaz, buttirilaz yağ-aılab ve deketonilaz aktivitelerine sahiptir (29). SIRT7 eksikliği DNA hasarı onarımının azalmasına ve hücre ölümünün artmasına neden olur (30). Ayrıca, replikatif yaşlanma esnasında, nkleolustan kromatin ve sitoplazmaya g ederek rDNA transkripsiyonunu azaltır (31).

Yeni bir antikanser ilacı elde etmek ve minimum toksisiteye ulaşmak için birçok strateji geliştirilmektedir. Bu stratejilerde sekonder metabolitler birçok hastalığın tedavi yöntemlerinde büyük önem kazanmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen ilaçlar dünyanın farklı yerlerinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (32). Bu bitkilerden bir tanesi de Ranunculaceae familyasına ait tek yıllık iekli bir bitki olan *Nigella sativa*'dır ve halk dilinde çörek otu olarak adlandırılmaktadır (33). *Nigella sativa*'nın antienflamatuar, antioksidan, nöro-koruyucu ve reno-koruyucu özellikleri bulunmaktadır. *Nigella sativa* farklı hastalıkların tedavisinde olumlu etkileri olan timokinon (TQ, (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone)), alkaloidler, saponinler, flavanoidler, proteinler, yağ asitleri gibi aktif bileşenler içerir. TQ, *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağında en fazla bulunan bileşendir (34). *Nigella sativa*'nın ana biyoaktif bileşenlerinden biri olan TQ'nun kanser tedavisinde ve önlenmesinde etkili olmasının yanında, anti-enflamatuar, antioksidan ve lipid metabolik fonksiyonlara sahip bir flavonoid olduğu bilinmektedir (35).

Yapılan literatür taramaları sonucunda timokinonun akciğer kanserinde sirtüin gen ifadeleri ve sirtüin tarafından kontrol edilen diğer yollar üzerindeki olası etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu projenin amacı, akciğer kanseri hücrelerinde timokinonun 7 farklı sirtüin gen ifadeleri üzerine etkilerini araştırmak ve normal akciğer epitel hücrelerindeki ifadeleri ile karşılaştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Hücrelerin birçok fizyolojik ve genetik değişiklikler ile birlikte kontrolsüz çoğalma özelliği kazanması sonucunda meydana gelen kötü huylu tümör oluşumunun neden olduğu kompleks hastalığa kanser denir. Çok sayıda kanser hastası için tümör hücrelerinin çevre dokulara ve uzak organlara invazyonu, morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir. Kanserde biyolojik anormal hücre büyümesi (neoplazi) son noktayı oluşturmaktadır. Normal hücrelerin kötü huylu kanser hücrelerine dönüştüğü biyolojik süreç yıllarca araştırma konusu olmuştur (36).

Hanahan ve Weinberg'in yaptığı incelemede hücre fizyolojisindeki altı temel değişikliğin malign hücre büyümesinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Büyüme sinyalinde kendi kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyici sinyallere karşı duyarsızlık, programlı hücre ölümünden kaçınma (apoptoz), sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli vaskülarite ve metastaz neredeyse tüm kanserlerin ortak özellikleri olarak tanımlanmıştır (37).

Kanser, dünya çapında başlıca ölüm nedenlerinden biridir (38). Kanser teşhisi 11 milyondan daha fazla kişiye konulmuştur ve bu oranın yıllar geçtikçe daha çok artacağı tahmin edilmektedir (39). Daha iyi bir sağlık yönetimi için kanserin erken teşhisi ve tedavisi gerekmektedir. Kanser hücreleri erken bir aşamada genellikle hiçbir belirti veya semptom göstermezler. Bundan dolayı kanser erken evrelerde tedavi edilememektedir (40). Birçok kanser çeşidi vardır. Kanser çeşitlerinden birisi de akciğer kanseridir.

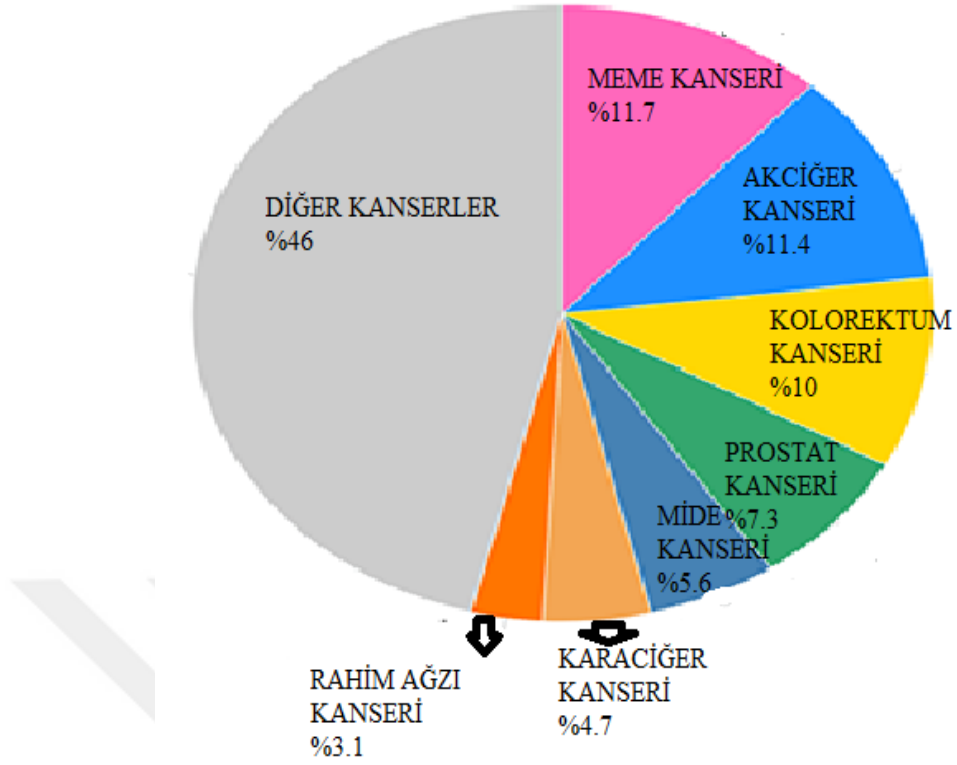
Akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve görülen en yaygın ikinci kanser türüdür (41). Akciğer kanseri heterojen bir malign hastalıktır (42). Akciğer kanserinin büyümesi, invazyonu ve metastazı, tümör dokusunun içsel genetik anormalliklerini ve bağışıklık sistemi ile etkileşimlerini içeren, karmaşık ve dinamik bir süreçtir (42). Akciğer kanseri hastalarının en yaygın semptomları öksürük, yorgunluk, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve kilo kaybıdır (43).

Akciğer kanseri histolojik tiplerine göre küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak sınıflandırılır. Akciğer kanserinin yaklaşık

%85'ini oluşturan KHDAK, temel olarak akciğer adenokarsinomu (LUAD) ve akciğer skuamöz hücreli karsinomu (LUSC) olarak iki alt gruptan oluşur. Bu sınıflandırma, tedavi kararları ve prognozu belirlemede kullanılır (4). Tümör tipine ve metastazların yaygınlığına bağlı olarak semptomlar değişkenlik gösterebilir. Adenokarsinomlar, akciğer hastalığı olan bireylerde görülen heterojen periferik kitleler olup erken metastaz yapar. Skuamöz hücreli karsinomlar tipik olarak hemoptizi, postobstrüktif pnömoni veya lobar kollaps ile birlikte görülür ve hastalık seyrinde geç metastaz yapar. İnsan akciğer kanseri genetik alt tiplerine yönelik son zamanlarda tedaviler geliştirilmesine rağmen hayatta kalma oranları çok düşüktür (5). Küçük hücreli karsinomlar klinik olarak agresiftir ve geniş mediastinal tutulum ile merkezi yerleşim özelliği gösterir. Aynı zamanda küçük hücreli karsinomlar erken ekstratorasik metastazlar ile ilişkilidir (44). Kemoterapiye yanıt vermelerine rağmen, küçük hücreli karsinomlar genellikle tanı anında ilerlemiş durumdadır ve kötü prognoza sahiptir. Büyük hücreli karsinomlar kötü diferansiyedir. Bu tümörler, erken metastazlar ile ilişkili büyük periferik kitlelerdir (45). Küçük hücreli akciğer kanseri hava yolu submukozunun neden olduğu merkezi bir tümör peri-hiler kitlesidir. Yapılan histolojik çalışmalar, küçük hücreli akciğer kanserinin bazal bronş epitelinde bulunan nöroendokrin hücrelerden kaynaklandığı açıklanmıştır. Küçük hücreli akciğer kanserinde bulunan hücrelerde yaygın olarak nekroz görülür ve granüler kromatin içeren küçük, iğsi veya yuvarlak hücreler şeklinde gözlemlendiği bilinmektedir. Küçük hücreli akciğer kanseri ikinci akciğer lobuna, lenf düğümlerine ve kemik iliği gibi vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabildiğinden dolayı tek bir radyasyon noktasıyla sınırlı değildir. Küçük hücreli akciğer hastalarının tedavi yöntemleri göğüs radyoterapisi ile kombine kemoterapidir (46).

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemolojisi

Dünya genelinde akciğer kanseri erkeklerde en çok görülen ve ölüm oranlarının en yüksek olduğu kanser türlerindendir (Şekil 2.1). Kadınlarda ise akciğer kanseri üçüncü en yaygın kanserdir ve ölüm oranları en yaygın ikinci kanser türüdür (47).



Şekil 2.1. 2020 yılında dünya çapında hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık görülen kanser türleri istatistikleri (48) (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

Akciğer kanseri genellikle küçük hücreli veya küçük hücreli dışı olarak bilinir. Küçük hücreli akciğer kanseri merkezi yerleşimlidir ve birincil veya ikincil bronşlar gibi daha büyük hava yollarında görülür. Küçük hücreli akciğer kanseri çok hızlı yayılım gösteren ve erken metastaz yapan bir tümör olduğundan dolayı genellikle erken evrelerde tespit edilemez. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri periferik akciğer dokusunda bulunan ve tarama yöntemi ile tespit edilen bir hastalıktır (45).

Yapılan çalışmalarda dünya genelinde gün geçtikçe kadınların akciğer kanserine yakalanma riskinin arttığı gözlenmiştir. Dünya çapında akciğer kanseri bazı önemli coğrafi farklılıklara da sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri olan kadınların yüzde 19'unun sigara içmediği ve akciğer kanser olan erkeklerin yüzde 9'unun sigara içmediği bilinmektedir. Bu verilere göre sigara içmeyen bireylerde akciğer kanseri kadınlarda daha sık görülmektedir (49).

2.1.2. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Akciğer kanserinde bazı risk faktörleri vardır fakat bu risk faktörlerinin doğrudan akciğer kanserine neden olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Akciğer kanserindeki temel risk faktörleri; Sigara içmek, pasif içicilik, çevresel faktörler, radon, ve genetik faktörler gibi birçok faktör yer almaktadır (49). Pasif sigara içimi sigara içmeyen bireylerde akciğer kanserine neden olmaktadır. Pasif sigara içimi aktif sigara içenlerden daha fazla kanserojen bileşik içermektedir. (5).

Akciğer kanserinde çevresel etkilere maruz kalmak akciğer kanserinin artmasına neden olmuştur. Çeşitli araştırmalarda akciğer kanseri radon, asbest, krom ve arsenik, berilyum, gibi bazı çevresel etkiler ile ilişkilendirilmiştir (50). Radon akciğer kanserinde önemli bir risk faktörüdür. Toprakta bulunan toryum ve uranyum radyoaktif bozunması esnasında doğal olarak üretilen radon; görünmez ve kokusuz bir biyoaktif gaz olarak bilinmektedir. Dünya genelinde coğrafi farklılıklar radon konsantrasyon farklılıklarına neden olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde radon maruziyeti akciğer kanserinin önde gelen nedenidir ve radonun akciğer kanseri ölümlerini büyük oranda etkilediği tahmin edilmektedir. Kapalı alanlarda radona maruz kalmak akciğer kanser riskini artırmaktadır (51).

Çevresel etkilerin yanı sıra akciğer kanseri gelişimini etkileyen genetik faktörler vardır. Ailesinde akciğer kanser öyküsü olan bireylerin akciğer kanseri riski taşıma olasılığı daha fazla olur. Akciğer kanseri aile öyküsü çeşitli risk faktörlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Aile bireylerinde akciğer kanseri olan bireylerin sigara içmeleri sonucunda akciğer kanser riski daha fazla artış göstermektedir (52).

2.1.3. Akciğer Kanseri Tedavi Yaklaşımları

Solunum semptomu olan hastalarda akciğer kanser şüphesi vardır. Genellikle göğüs röntgeni ile müdahaleye başlanılır. Göğüs röntgeni normal çıkan hastalarda bilgisayarlı tomografi taraması yapılır. Teşhis çalışmaları tümörün konumuna bağlıdır. Merkezi tümörlerin hava yollarının doğrudan görüntülenmesinin sağlanması ve histolojik tanı için biyopsi materyalinin alınması gerekmektedir (53). Akciğer kanser şüphesi olan hastaların

tanısal değerlendirilmesi gerekmektedir. Histolojik tanı, balgam sitolojisi, torasentez erişilebilir lenf nodu biyopsisi, bronkoskopi, transtorasik iğne aspirasyonu, video yardımcı torakoskopi veya torakotomi ile belirlenir. Metastatik hastalık için ilk değerlendirmelerin, hastanın öyküsüne ve fizik muayenesine, laboratuvar testlerine, bilgisayarlı akciğer tomografisine, pozitron emisyon tomografisine ve mediastinal tutulumun doku onayına dayandığı bilinmektedir (5).

Akciğer kanseri ölümcül bir hastalıktır, fakat bu hastalığın neden olduğu ölümleri önlemek için çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (54). Bu tedavi yöntemleri; radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahalelerdir. Sigara içmeyen akciğer kanseri hastalarında, sigara içen hastalara göre standart tedaviye daha olumlu yanıtlar alındığı ve sağ kalım oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Akciğer kanser tedavisi kanserin evresine, histolojik tipine ve hastanın fonksiyonel değerlendirmesine göre farklılıklar göstermektedir (4).

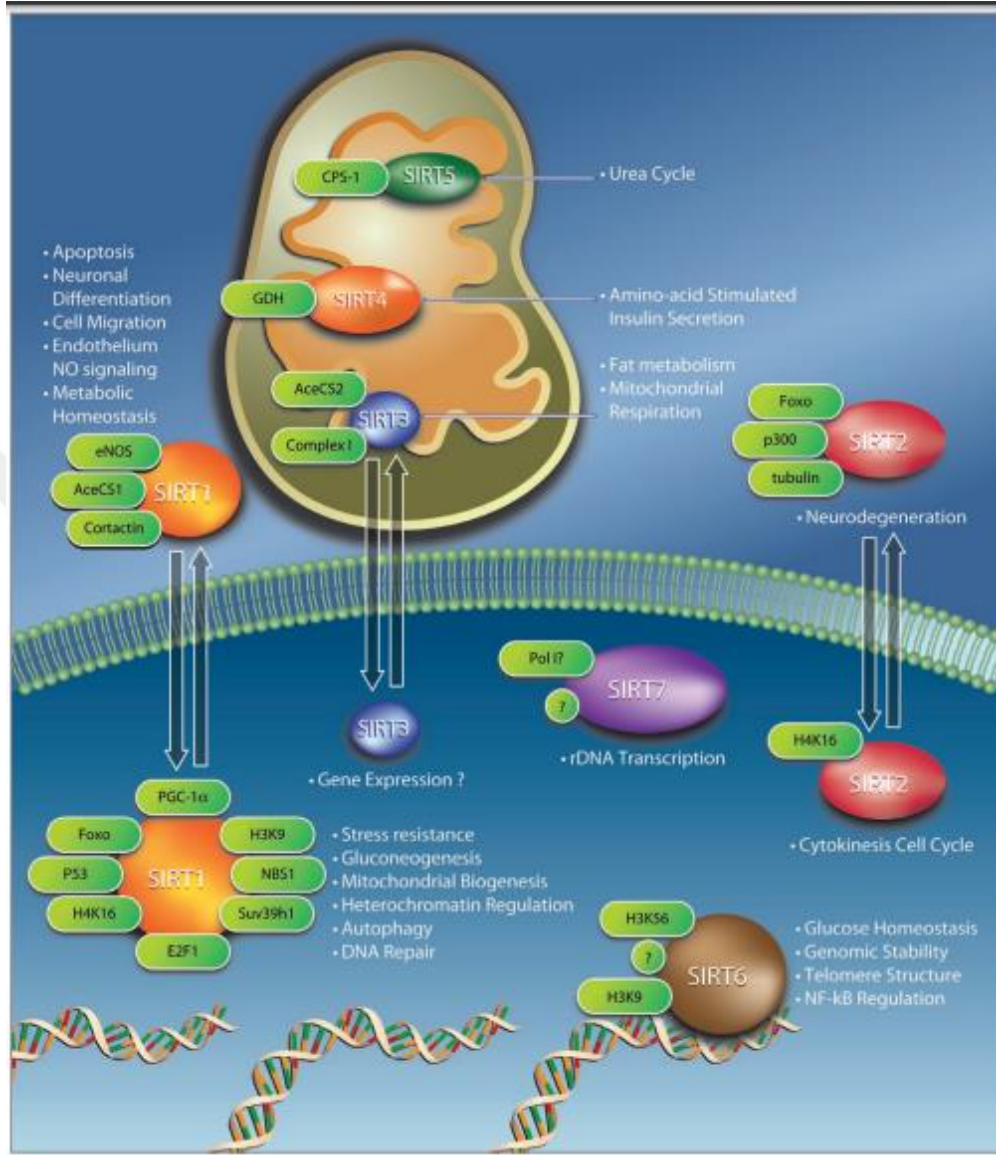
2.2. Sirtüinler

Memelilerde yedi farklı sirtüin (SIRT1-7) bulunur. Sirtüinler (SIRT1-7) hücrel lokalizasyonlarına, aktivasyonlarına ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılıklar gösterirler. Sirtüinlerin deasetilaz aktivitesi, hücrel [nikotinamid adenin dinükleotid (okside form, NAD⁺)]/ [nikotinamid adenin dinükleotid (redükte form, NADH)] oranı tarafından kontrol edilir ve NAD⁺'nin aktivatör olarak, nikotinamid ve NADH'ın ise inhibitör olarak görev yaptığı açıklanmıştır (55). Sirtüinler sadece deasetilaz aktivitesi göstermez. Bazı sirtüinlerin deasilaz aktivitesi (SIRT6), bazılarının ise desüksinilaz ve demalonilaz aktivitesi (SIRT5) gösterdiği bilinmektedir (55).

Sirtüinler NAD⁺-bağımlı katalitik yapılardan oluşur ve biyolojik işlemlerine bağlı olarak farklı substratlar üzerinde spesifik etkiler oluşturabilirler. Sirtüinler N- ve C- terminal alanlarında dizi ve uzunluk olarak farklıdırlar bu nedenle farklı lokalizasyon ve işlev gösterirler. Sirtüinler deasetilasyon ve ADP-ribozilasyon işlevlerini katalizlerler (56).

Memeli hücrelerinde sirtüinler çeşitli hücre altı konumlarda bulunurlar. SIRT1 çekirdekte gibi görünse de belirli hücrel koşullarda sitoplazmada da saptanabilir. SIRT2 sitoplazmiktir fakat hücre döngüsünün belirli aşamalarında çekirdekte lokalize olurlar (Şekil 2.2.). SIRT3 ve SIRT4 mitokondriyaldir ancak SIRT3 küçük bir alt popülasyonda

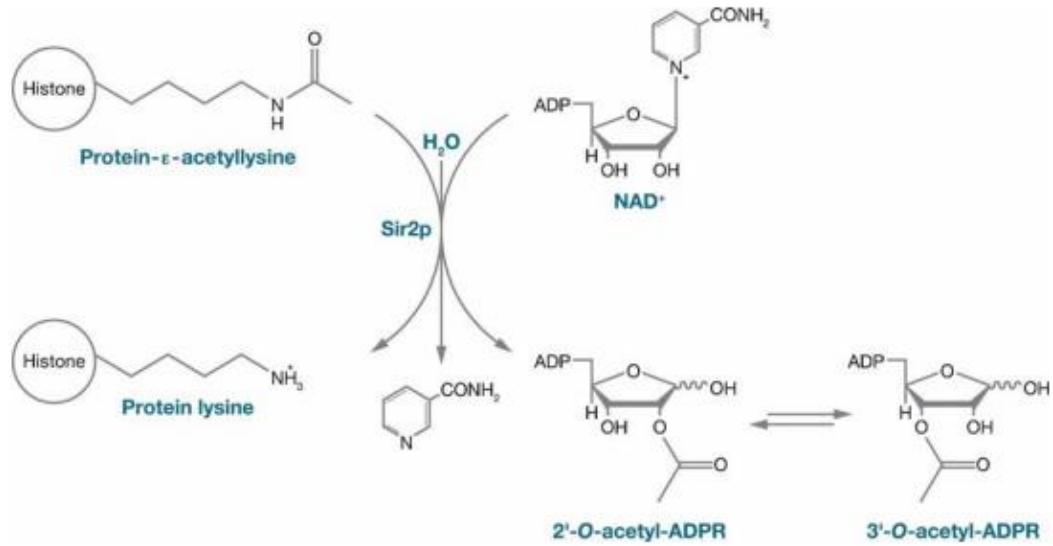
çekirdekte lokalize olmaktadır (57). SIRT5 mitokondriyaldır ve mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenleyebilir. SIRT6 ve SIRT7 çekirdekte bulunur (12).



Şekil 2.2. Yedi adet memeli sirtuinlerinin fonksiyonları, hedefleri, işlevleri ve lokalizasyonları (57).

Sirtuinler uzun ömür, kalori kısıtlaması ve DNA hasarı onarımının faydalı etkileri ile ilişkilidir. Sirtuinlerin yaşlanma, düşük kalori mevcudiyetine karşı enerji tepkileri, stres direnci ile apoptoz ve iltihaplanma gibi çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere dahil oldukları bilinmektedir (58). Mitokondriyal biyogenezi ve sirkadiyen saatleri düzenleyebilirler. SIRT3'ün kalpte FOXO3_a yoluyla MnSOD aktivitesini düzenleyerek antioksidan etkisini artırdığı bildirilmiştir (59). Sirtuinlerin histon ve histon olmayan proteinlerin NAD⁺ bağımlı deasetilasyonuna aracılık ettiği bilinmektedir (11).

Sirtüinler, maya sessiz bilgi düzenleyici 2'ye (Sir2) homolog memeli protein ailesi olarak bilinirler. Sirtüinler hücre metabolizması genomik stabilite, hücre döngüsü, hücre bölünmesi, farklılaşma ve transkripsiyonel düzenleme gibi birçok biyolojik süreç ile bağlantılıdır. Ayrıca, metabolik hastalıklar, nörodejenaratif hastalıklar, yaşlanma ve kardiyovasküler gibi çeşitli patolojik hastalıklar ile ilişkilendirilmişlerdir (9). SIRT2 ile maya histon deasetilaz (Hst)1 ve Hst2'nin daha fazla homolojiye sahip olduğu açıklanmıştır. Sirtüinler güçlü deasetilaz aktivitesine sahiptirler (60). Sirtüinler tarafından katalize edilen deasetilasyon sırasında, NAD^+ molekülündeki nikotinamid ve riboz arasındaki kimyasal bağın kırılması, asetil grubunun substrattan (asetilenmiş lizin rezidüsü) ADP-riboz molekülündeki riboza transferi işlemi ile birlikte gerçekleşir (Şekil 2.3.). Sirtüinler belirli genlerin ekspresyonunu engeller, bu nedenle replikatif ömrünü uzatırlar (7).



Şekil 2. 3. Sir 2 tarafından katalize edilen protein asetilasyonlarının deasetillenmesi (61)

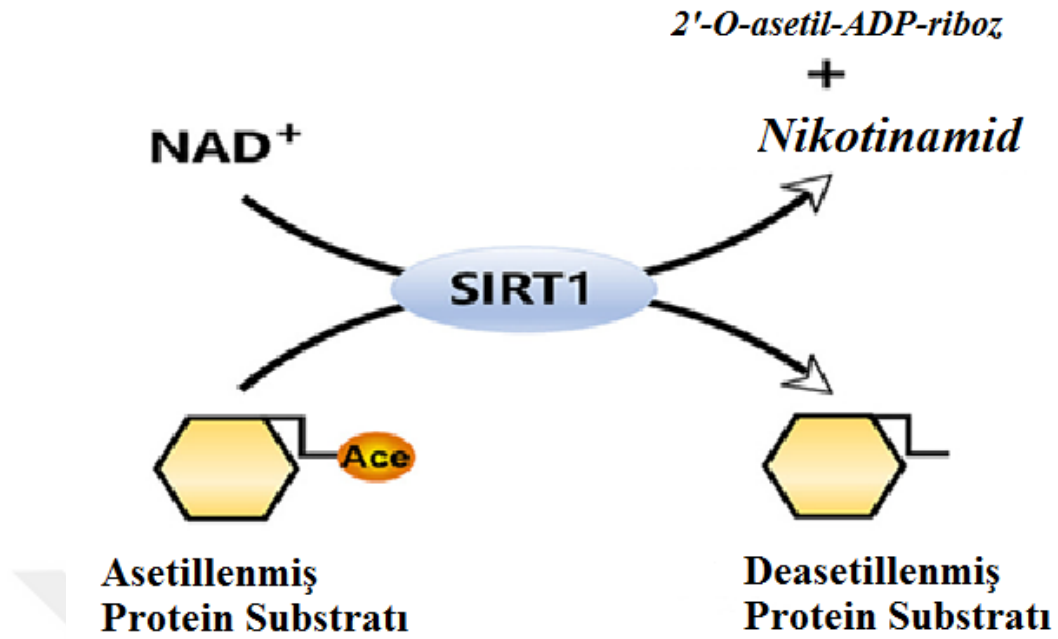
SIRT1 homolog rekombinasyon (61) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) DNA onarım yollarını düzenlemede görev alan Nijmegen kırılma sendromu 1 (NBS1)'i deasetilleyerek DNA çift zincir kırılmalarının onarımında görev alır. SIRT6 poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) gibi çeşitli onarım faktörlerini değiştirerek genom bütünlüğünün korunmasında ve DNA hasarı onarımında rol alır. SIRT7 ise p53 bağlayıcı

protein 1'in (53BP1) alımını kolaylaştıran histon H3 lizin 18 (H3K18) deasetilasyonu ile NHEJ'yi destekler (30).

SIRT1,6,7 çekirdekte histonların ve histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu/deasetilasyonu ile spesifik genlerin ekspresyonunu düzenler. SIRT1'in, H3, H4 ve H1 histonlarını deasetile ettiği ve aynı zamanda elliden fazla histon olmayan proteinleri değiştirdiği belirtilmiştir. SIRT1, p53, nükleer faktör-B (NF-B) ve FoxO'lar gibi transkripsiyon faktörlerini katalize eder. Ayrıca sirtüinler depropionilasyon, demalonilasyon, desüksinilasyon, dekrotonilasyon, delipoamidasyon, diğer uzun zincirli yağ asidi deasetilasyonları ve mono-ADP-ribozilasyon gibi diğer asil-lizin modifikasyonlarını da katalizleyebilir. Bunlar genellikle deasetilasyon reaksiyonları olarak bilinmektedirler (62).

2.2.1. Sirtüin 1 (SIRT 1)

SIRT1 geninin 10q22.1 kromozomu üzerinde bulunduğu, 9 ekson ve 8 intron içerdiği ve 747 amino asit oluşan bir proteini kodladığı bilinmektedir (5). SIRT1 birçok insan dokusunda ve hücrelerinde ekspresse edilir. SIRT1 hücre altı lokalizasyonu, doku veya hücre tipine, stres düzeyine ve diğer moleküller ile etkileşimine bağlı olarak değişkenlik gösterir. SIRT1 kataliz için NAD^+ 'ya bağımlı olduğu bilinir. SIRT1 NAD^+ 'ı hidrolize ederek aynı zamanda lizine bağlı asetil grubunu asetillenmiş proteinlerden ADP-ribozun 2'-OH'ına aktarır ve böylece hedef proteinleri deasetilleştirir. Reaksiyon sonunda deasetillenmiş protein, nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz meydana gelir (11) (Şekil 2.4.).

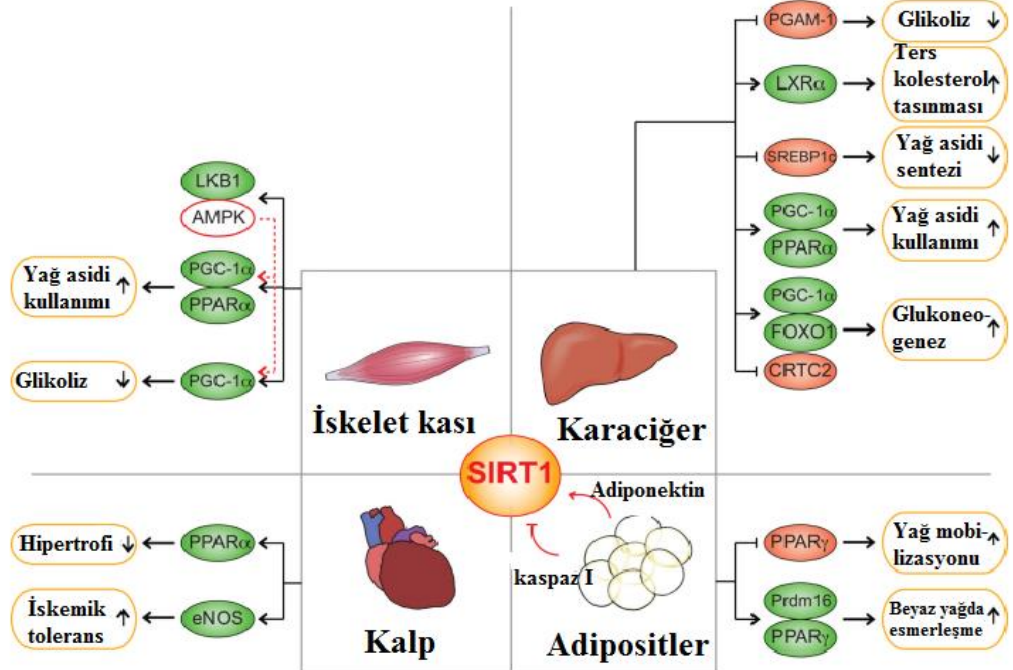


Şekil 2. 4. SIRT 1' in NAD⁺ aracılı protein deasetilasyon reaksiyonu (11) (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

SIRT1 en çok çalışılan ve ilk keşfedilen SIRT ailesi üyesidir. SIRT1'in pek çok nöronal süreçte yer alması ve Parkinson hastalığı (PD) ve Huntington hastalığı gibi birçok nörolojik bozukluklardaki rolünden dolayı daha fazla araştırma yapılmasına neden olmuştur (5). Ayrıca SIRT1'in, hücre sağ kalımında ve beyinden üretilen nörotrofin faktörün ekspresyonunda rol alması nedeni ile nöroprotektif etkileri olduğu belirtilmiştir (34). Tümör oluşumunda SIRT1'in hem tümör promotörü hem de tümör baskılayıcı olarak görev aldığı bildirilmiştir (56). SIRT1 pek çok tümör baskılayıcıyı ve DNA onarım genini düzenler (56). SIRT1 hücre döngüsünü düzenler ve enerji homeostazında rol alır. Beyinde, karaciğerde, pankreasta, yağ dokusunda, kasta ve kalpte SIRT1'in ifade edildiği açıklanmıştır. SIRT1 hücre döngüsü, sirkadiyen ritimler, apoptoz, mitokondriyal fonksiyon ve metabolizma için önemli bir dizi hedef proteini deasetiller (63). SIRT1 ekspresyonu ve aktivitesi çeşitli patofizyolojik stresler, transkripsiyon faktörleri translyasyon sonrası modifikasyonlar tarafından kontrol edilmektedir. SIRT1 memeli hücrelerinde ve insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücrelerinde (H1299 hücreleri) E2F1, FoxO1 ve FoxO3 tarafından düzenlenirken hipermetilasyon ile baskılanır (59). Sadece SIRT1 tarafından FoxO'lar, p53 ve poli-adenozin 5'-difosfat (ADP)-riboz polimeraz (PARP) 1 doğrudan deasetillenir ve fonksiyonel olarak

düzenlenir (59). SIRT1, nükleer proteinleri deasetilleyerek mitokondriyal fonksiyonu düzenler (59). SIRT1 normal hücrelerde genetik stabiliteyi korur. Ayrıca SIRT1 lösemi, tiroid ve kolorektal kanserler gibi pek çok kanser türünde hücre büyümesini ve proliferasyonunu destekler. SIRT1 inhibisyonunun, P53 aktivitesini yeniden kazandırarak hücre büyümesini engellediği bildirilmiştir (64). SIRT1 ekspresyonunun ve deasetilasyon aktivitelerinin kalori kısıtlamaları sırasında meydana geldiği belirtilmektedir (65).

SIRT1'in genetik olarak downregüle edilmesinin, yağ dokusunda makrofaj toplanmasına neden olduğu, aşırı ekspresyonunun ise kronik yüksek yağlı beslenmenin sebep olduğu yağ dokusu makrofaj birikimini önlediği bulunmuştur (66). Besin yoksunluğunda karaciğerde bulunan yüksek SIRT1 seviyeleri hepatik glikoz üretimini artırır ve oksidatif mekanizmanın ekspresyonunu uyarır. SIRT1'in yıkılmasının vücut insülin duyarlılığını artırdığı açıklanmıştır. SIRT1 yağ dokusunda adinopektin üretimini sağlayarak metabolik verimliliğin artmasını sağlar. SIRT1'in karaciğere spesifik delesyonunun, hepatik NF-κB yolu aktivitesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.5.) (66).



Şekil 2. 5. Çeşitli dokularda SIRT 1'in fayda sağladığı metabolik düzenlemeler (67) (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

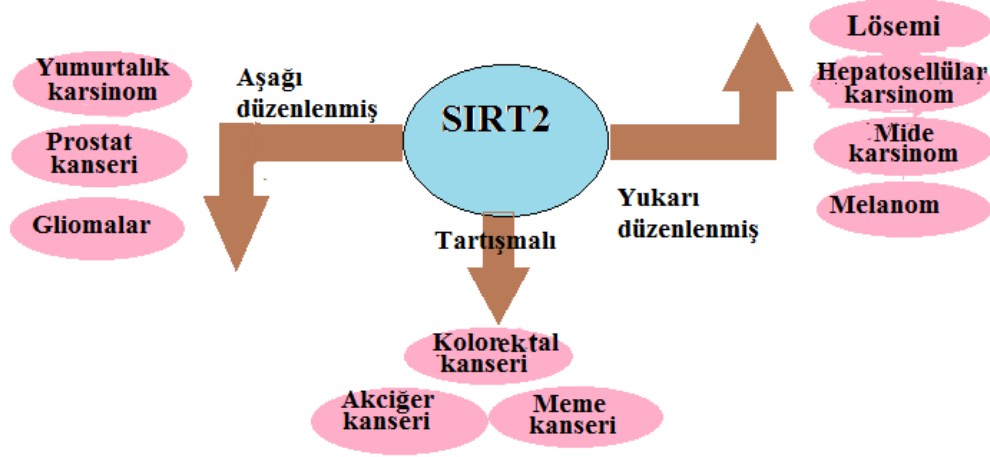
Beyinde kalori kısıtlaması tarafından SIRT1 regülasyonunun bölgeye özgü olduğu açıklanmıştır. Yapılan bir çalışmada doğrudan enzimle etkileşen SIRT1'in düzenlenmesini sağlayan endojen aktif bir düzenleyicinin (AROS) olduğu kanıtlanmıştır. SIRT1 amino asitlerinin SIRT1 ve AROS arasındaki iletişim için yeterlidir. SIRT1 fare akciğer karsinomlarında, lenfomalarda, yumuşak doku sarkomlarında, insan akciğer kanserinde, prostat kanserinde, lösemide, kanser hücre dizilerinde ve kolon karsinomlu hastalarda alınan doku örneklerinde yukarı doğru düzenlendiği açıklanmıştır. Tümör baskılayıcı protein p53'ü deasetilleyen SIRT1, p53 aracılı transkripsiyonel aktivasyonunun negatif regülasyonuna neden olur. SIRT1 aktivitesinin nükleer reseptör peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör- γ 'yi (PPAR- γ) baskıladığı ve mitokondriyal peroksizom proliferatör aktivatör reseptör γ koaktivatör 1'in (PGC-1 α) ana düzenleyicisini deasetillemediği açıklanmıştır (68). Glikoz ve piruvat açlık durumunda SIRT1 düzeylerini düzenler. Glukoz konsantrasyonu SIRT1 miktarını azaltırken piruvat konsantrasyonları SIRT1 miktarını artırır. SIRT1 seviyelerinde oluşan değişiklikler, mRNA sabit kalması nedeniyle SIRT1 transkripsiyon sonrasında düzenlenir (65). SIRT1 inflamatuvar aktivitesi gen ekspresyonunu ve lipaz (LPS) ile uyarılan makrofajlardan TNFa salınımını baskılar. Ayrıca farmakolojik SIRT1 aktivatörleri anti-inflamatuvar etkiler gösterir. LPS ile uyarılan inflamatuvar yolları SIRT1 aktivatörlerini inhibe ettiği açıklanmıştır. SIRT1 inflamatuvar gen ekspresyonunu modüle eder (69). SIRT1 histon ve histon olmayan proteinleri deasetilleyen bir epigenetik düzenleyici olduğu tanımlanmıştır. SIRT1 tümör oluşumunda ve kanser gelişiminde rol alır. SIRT1 aşırı ekspresyonu akciğer kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri mide kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerin ilerlemesine yol açar ve kötü prognoz göstergesidir. Ayrıca SIRT1 aşırı ekspresyonu DNA hasarı, oksidatif stres altında P53 tarafından düzenlenen hücre döngüsü durmasını engelleyebildiği rapor edilmiştir. SIRT1 nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve PGC-1 α gibi hedeflerin deasetilasyonu ile iskemi/hipoksida apoptotik, inflamatuvar ve oksidatif stresle ilişkili süreçleri düzenlendiği açıklanmıştır (70). Promiyelostik lösemi proteinin (PML) nükleer merkezlerine alınan SIRT1 p53'e bağlanarak burada deasetilasyona neden olur. P53'e bağlı olan SIRT1, p21 transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alır (71). Lizine özgü demetilaz 1 (LSD1), histon deasetilaz 2 (HDAC2) ve SIRT1'in kromatin sıkıştırılması yoluyla transkripsiyonu baskılar ve bu nedenle gen ekspresyonunu düzenleyen tek bir kompleks içerisinde birlikte rol alırlar (72).

2.2.2. Sirtüin 2 (SIRT 2)

SIRT2 sitoplazmikdir fakat çekirdekte de gözlemlenebilmektedir. SIRT2 mitoz esnasında hücre döngüsü ilerlemesinde rol alır (73). SIRT2'nin hiperfosforile formları hücre döngüsünün M fazı ile sınırlıdır ve M fazı boyunca korunur. SIRT2'nin mitoz sırasında bol miktarda arttığı ve fosforile olduğu açıklanmıştır (74). SIRT2 18 ekson içerir ve 19. insan kromozomunda bulunur. SIRT2 yüz yetmiş dokuz organizmada eksprese edilir. Omurgasızlar ile birlikte 97 tür SIRT2'nin homolog dizisini içerir. SIRT2 farklı eklemelerle çeşitli transkriptler ürettiği tespit edilmiştir. SIRT2 beyinde, yumurtalıkta yemek borusunda, kalpte, akciğerde, tiroide, dalakta ve karaciğer dahil olmak üzere birçok organda ifade edilir ama en yüksek ifade düzeyi beyinde görülür (75). SIRT2 α -tübülünü deasetilleyerek mikrotübül dinamiklerinin düzenlenmesinde rol alan NAD⁺'ya bağlı sirtüin ailesi üyesidir. SIRT2 p53, nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B), antijen sunucu hücreleri (APC), Kromozomların yapısal bakımı protein 1A (SMC1A)'yı ve bir dizi metabolik enzimi deasetiller. SIRT2 makrofajlardan uyarı ile mikro çevreye salgılanır. SIRT2, TLR4/TLR2 aktive edici ligandlar ile tedavi edilen makrofajlardan otofagozomların içinde yer aldığı bulunmuştur. Otofajiye bağlı 7 (ATG7) tükenmiş makrofajlarda SIRT2 salınımında önemli derecede azalma olduğu bu nedenle SIRT2 plazma zarı boyunca taşınması için kanal görevi gördüğü açıklanmıştır. SIRT2 hücre dışı proteinin deasetilasyonu yoluyla kanser hücresi metastazını teşvik ettiği bildirilmiştir (15). SIRT2 mikrotübüller ile konumlanmıştır ve α -tübülünü deasetilleştirdiği bilinmektedir. SIRT2 yaşlanma düzenleyicisidir ve kalori kısıtlaması ve oksidatif strese sonra uyarı alır. SIRT2 kanserde tümör baskılayıcı ve onkogenik fonksiyonlara sahiptir. SIRT2 bağışıklık sisteminde ise nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) p65 alt biriminin negatif regülasyonu yoluyla inflamasyonu baskıladığı rapor edilmiştir (58). SIRT2 aktivitesine lukoneojenez için fosfoenolpiruvat karboksikinazın (PEPCK1) doğrudan bağlanır. Protein-protein etkileşimi ve SIRT2'nin aşırı ekspresyonu, SIRT2'nin PEPCK1 deasetilazı olduğu sonucu açıklanmıştır (76). SIRT2 histon H4Lys16'yı deasetillemek için mitoz esnasında G2/M geçişindeki çekirdeklere geçici olarak geçiş yapar. G2/M fazında ekspresyon ve fosforilasyondaki artış ile SIRT2 G2/M geçişinin kontrolünde rol alır. SIRT2 aşırı eksprese eden hücrelerin bir mitotik fazı vardır ve ekspresyonun gliomalarda aşağı regüle edilmesi hücre çoğalmasının kontrolünde önemli bir rolü vardır. SIRT2 seviyesinin oksidatif stres tarafından yükseltile sonucunda reaktif oksijen türleri hücresel düzeyleri azaltmak için FOXO3a aracılı anti-oksidatif stres yanıtını aktive etmek

için FOXO3a'yı deasetilleştirir (77). Hücresel bağlama ve doku tipine bağlı SIRT2 hücre bölünmesini kontrol ettiğini, FOXO1 vasıtasıyla adiposit farklılaşmasını düzenlediği ve histon H4 deasetilasyonu ile gen ekspresyonunu değiştirdiği açıklanmıştır. SIRT2 miyelinasyonun önemli bir düzenleyicisidir bu nedenle SIRT2 ifadesi miyelinasyonda düzenleyici bir rol alır (78).

Memeli merkezi sinir sisteminde (CNS), yaygın olarak korteks, striatum, hipokampus ve omurilikte yüksek oranda SIRT2 eksprese edilir (79). Doğumdan yetişkinliğe kadar SIRT2 ekspresyonu kademeli olarak artmaktadır (80). İnsan embriyonik kök hücrelerinin (hESC'ler) orta beyin dopaminerjik nöronlarına farklılaşması esnasında düzenlenir (81). Glikojen sentaz 3 (GSK-3 β)/ β -katenin yolu vasıtasıyla SIRT2, protein kinaz B (AKT) etkileşime girer ve dopaminerjik nöronların farklılaşmasını modüle eder (82). Bir amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonat reseptörü (AMPA) deasetilaz görevi gören SIRT2, AMPAR ve proteostazi düzenler. SIRT2 sinaptik plastisiteye ve bilişsel işleve katkı sağlar (83). Memelilerde bulunan yedi sirtüinden biri olan SIRT2 dipositlerde RNA düzeylerinde en belirgin ifade edilen sirtüindir (84). SIRT2'nin deasetillenmiş bir substratı olan α -tübülin, mutasyon geçirmiş asetilasyona dirençli bir α -tübülinin ekspresyonu, adipogenezi inhibe eder (85). SIRT2'nin pluripotent farklılaşması ile ilişkisi olduğu açıklanmıştır ve glikolizle ilişkili proteinlerin deasetilasyonu yoluyla pluripotent kök hücrelerin uyarılmasında rol alır (86). Enerji kısıtlamasında SIRT2 glukoneojenezi artırarak mekanizmayı düzenler (2). Ayrıca SIRT2'nin nükleer faktör eritroid türevli 2 ile ilişkili faktör 2'yi (NRF2) deasetilleyerek hücresel demir düzeylerini koruduğu bildirilmiştir (87). SIRT2 otofaji ile ilişkili mikrotübülleri ve otofaji ile ilişkili proteinleri düzenler ve böylelikle otofajiyi etkiler. Glioma hücrelerinde bulunan SIRT2 regülasyon ilişkisinden dolayı histon deasetilasyonu gen susturulmasını sağlar. SIRT2 promotöründe korunmuş hipoksi tepki elemanı (HRE) etkileşimi ile SIRT2 gen transkripsiyonu inhibe edilir. SIRT2'nin ekspresyon seviyeleri ve mekanizmaları farklı kanser türlerinde farklı etkiler gösterir ve SIRT2 çeşitli mekanizmalar ile tümör oluşumunu baskılar (Şekil 2.6.) (88).



Şekil 2. 6. SIRT2 kanserde düzensizdir. SIRT2 lösemi, hepatosellüler karsinom, mide karsinomu ve melanomda yukarı regüle edilir. Gliomalar, prostat kanseri ve yumurtalık karsinomunda aşağı regüle edilir. Kolorektal kanser, akciğer kanseri ve meme kanseri konusunda hala tam olarak bilinmemektedir (88). (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

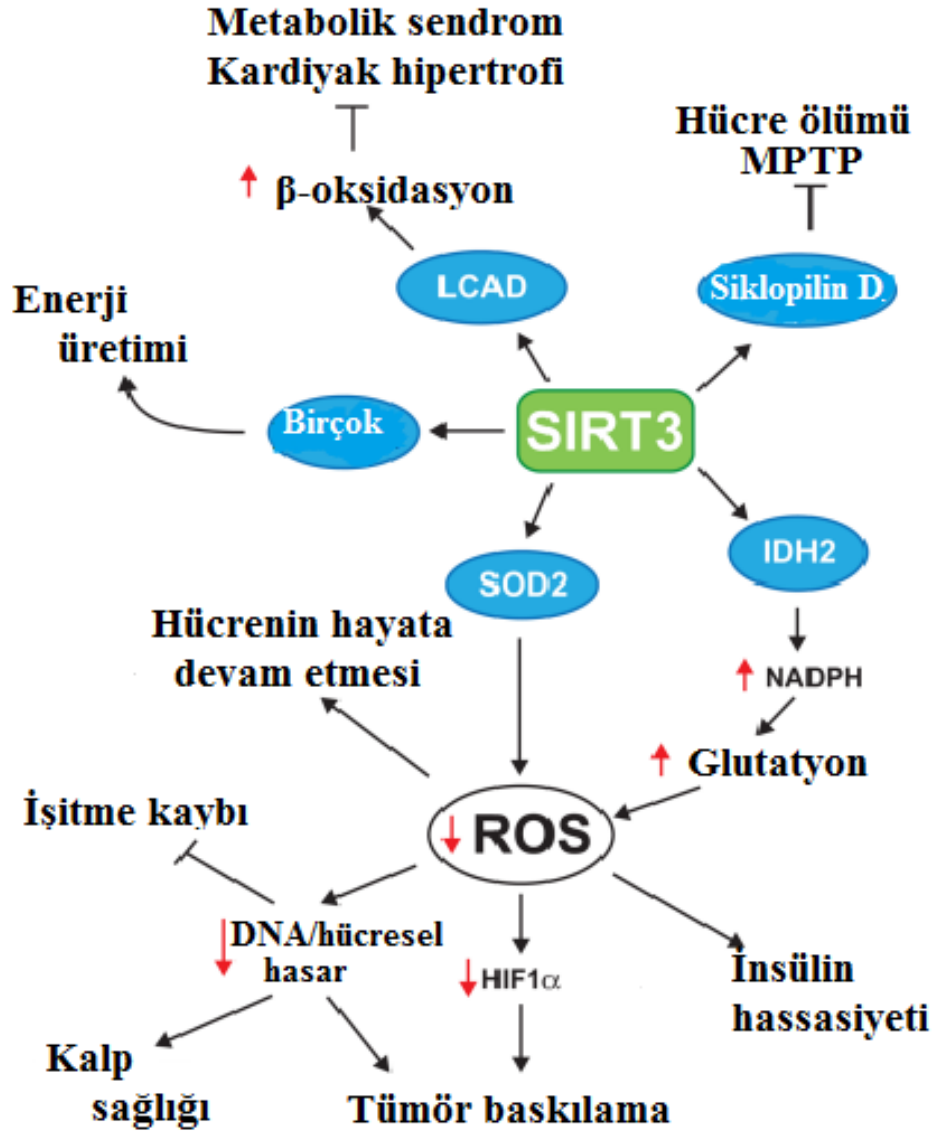
SIRT2 heksanoilasyon, dekanolasyon ve miristoilasyon gibi birçok lizin yağ asilasyonunun uzaklaştırılmasını katalize eder (89). SIRT2 transkripti alternatif birleştirme nedeniyle farklı hücresel ve doku dağılımlarına, farklı işlevleri olan üç izoform ürettiği bilinmektedir. İzoform 1 iskelet kasında bol miktarda bulunur ve izoform 2 beyinde birikir. İzoform 1 ve izoform 2 enzimatik olarak aktiftir. İzoform 5 tüm nükleer eksport sinyalini ve katalitik alanının kısa bir parçasını içermez bu nedenle katalitik aktivite kaybı görülür (6). SIRT2'nin en uzun izoformu 389 amino asit içerir ve bu amino asitlerin 65-340'ı NAD'a bağımlı katalitik bölgedir. Memelilerde önemli uzun ömür geni olan BUB1 SIRT2 aracılığıyla mitotik kontrol noktası serin/treonin kinaz B (BubR1)'yi deasetiller. SIRT2 hücre döngüsünün S fazı esnasında K95 bölgesinde ribonükleotid redüktaz düzenleyici alt birim M2'nin deasetilasyonuna neden olur ve bu deasetilasyon sonucunda hem dNTP havuz boyutunu artırır hem de ribonükleotid redüktaz aktivitesini artırarak DNA replikasyon çatalının hızlı ilerlemesini sağlar (60).

2.2.3. Sirtüin 3 (SIRT3)

SIRT3 hücre içindeki enerji metabolizması için gerekli organel olan mitokondride bulunur ve mitokondriyal sirtüindir. SIRT3 çekirdekte de gözlemlenmektedir ve

mezenkimal kök hücrelerinde (hMSC'ler) heterokromatini stabilize eder. Kardiyak hipertrofi modellerinde SIRT3 transkripsiyon faktörü çatal uçlu kutu alt ailesi O alt aile üyesi 3a'yı (FOXO3A) deasetilasyon ile düzenler ve FOXO3A'nın mitokondriden çekirdeğe yer değiştirmesini aynı zamanda da antioksidan enzimlerin ekspresyonunu uyarır. Mitokondriyal proteinin yanlış katlanmasına neden olan stres, SIRT3 düzeylerini artırır ve bunun sonucunda mitokondriyal matriks içerisinde aktivasyonu sağlayarak antioksidatif yanıtlar oluşturur (17). SIRT3 osteoporoz, osteoartrit, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşa bağlı çeşitli patolojilerde rol alır. SIRT3 deasetilasyon aktivitesiyle mitokondriyal metabolizmayı düzenler. SIRT3 nükleer zarf proteinleri ve heterokromatinle ilişkili proteinler ile etkileşime girer. SIRT3 kaybı anormal nükleer zarf morfolojisi, heterokromatin kaybı, genomik lamina ile ilişkili alanların nükleer laminadan ayrılması ve tekrarlayan dizi ekspresyon aktivitesi gibi çeşitli heterokromatinler ile ilişkili anormallikler oluşturur (18). SIRT3 kromozom 11'de bulunur ve mitokondriyal homeostaz, metabolik düzenleme, gen transkripsiyonu ve genom stabilitesinde rol alır (90). SIRT3 Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklarda rol alır. Ayrıca SIRT3 mitokondriyal NAD^+ seviyelerinin korunması ve SIRT3 ekspresyonu MSClerin yaşlanmasını engeller. SIRT3 NAD^+ ya bağlanan Rossman kat alanı ve çinko parmak yapısını bulunduran güçlü deasetilaz aktivitesi gösterir. SIRT3 enerji metabolizması, oksidatif stres gibi pek çok açıdan mitokondriyal fonksiyonları düzenler. SIRT3 mitokondriyal solunum zinciri kompleksinin alt birim proteinlerini deasetilleyerek enerji üretimine katkı sağlar ve SIRT3 ATP sentaz β deasetilleyerek hücre içi metabolik dengeyi korur (19).

SIRT3 enerji metabolizması ve oksidatif strese karşı koruma gibi pek çok mitokondriyal fonksiyonların kontrolünü sağlar. SIRT3 ekspresyonu yaşa bağlı hücrel fonksiyon bozukluklarına karşı koruma ile ilişkilidir. SIRT3 insan ömrünü etkileyen tek sirtüindir. SIRT3 beyin, kalp, böbrek ve kas gibi birçok yüksek metabolik gereksinime sahip mitokondrinin bol bulunduğu dokularda ekspresse edilir (26). SIRT3 üre döngüsünü ve mitokondrideki antioksidan tepkileri düzenler (Şekil 2.7.) (91).



Şekil 2. 7. SIRT3 hedeflerinin ve biyolojik fonksiyonlarının şematik gösterimi; SIRT3 deasetilaz aktivitesi ile temel hücrel ve fizyolojik süreçleri (siyah kutular) modülasyonunu sağlayarak birçok protein hedefini (mavi kutular) aktive eder. Şemada gösterilen süreçlere genel olarak deasetillenmiş SOD2 ve IDH2 aracılığıyla azalan reaktif oksijen türlerinin (23) üretimi aracılık eder (90). (88). (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

SIRT3 SOD (mitokondriyal süperoksit dismutaz) ve IDH₂ (izositrat dehidrojenaz 2) deasetilasyonu ve aktivasyonu ile zararlı reaktif oksijen türlerinin hücrel üretimini baskılar (23). SIRT3 hücrel ROS düzeylerini azaltır. Ayrıca SIRT3 nükleer ve mitokondriyal DNA'yı diğer hücrel makromolekülleri ROS ile ilişkili hasardan koruduğu açıklanmıştır. SIRT3 yokluğunda ROS artar ve bunun sonucunda kanser

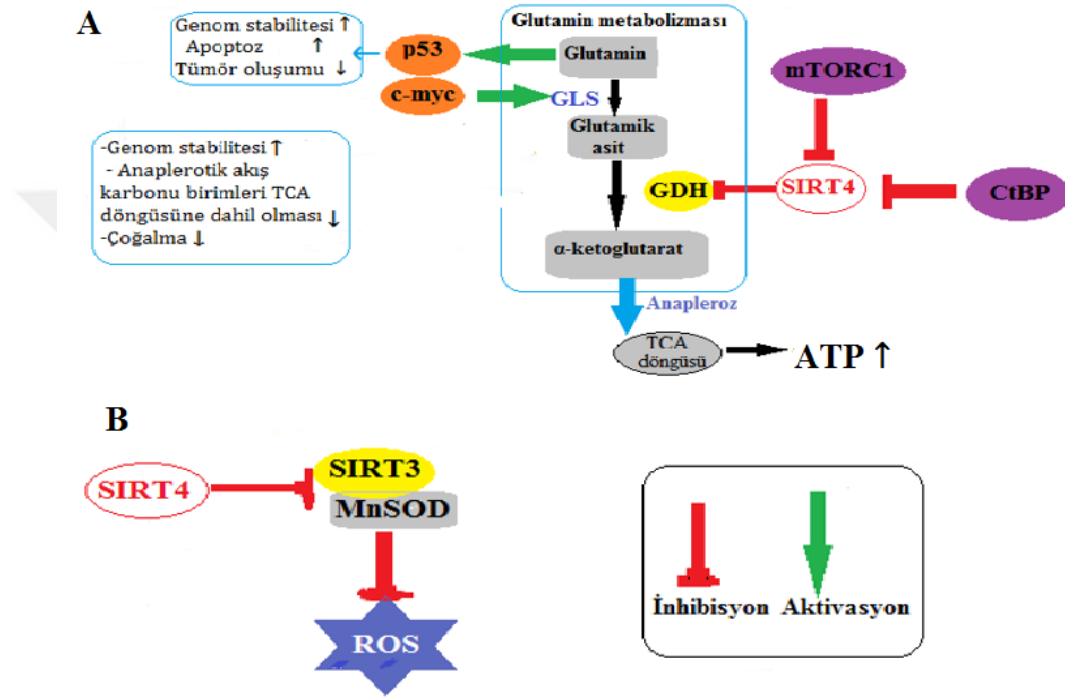
hücrelerinde metabolik yeniden programlamayı destekleyen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 α (HIF-1 α) aktivitesi sağlanır (90).

SIRT3 mitokondride gerçekleştirdiği görevler; MnSOD tarafından artan ROS inaktivasyonu ile birlikte azalmış ROS üretimi (92) ATP üretiminin kanser hücrelerinde baskılanması ve deasetilasyon aracılığıyla p53 aktivasyonudur (93). SIRT3 normal hücrelerde kanseri önleyici etkilere sahiptir. Kalori kısıtlaması ve artan hücrel NAD⁺ seviyesi SIRT3'ün ana aktivatörlerindendir (94). SIRT3 mitokondriyal homeostaz, gen transkripsiyon, metabolik modülasyon, stres tepkisi ve genomik stabilitede gibi birçok önemli görevlerde yer alır (90). Ayrıca SIRT3 osteoporoz, osteoartrit Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom ve nörodejeneratif hastalıklarda olmak üzere yaşa bağlı çeşitli patolojilerde rol alır(62, 19, 21). SIRT3 kemiğin yeniden şekillenmesinde rol alır. Mitokondride yer alan SIRT3 deasetilasyon aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal metabolizmayı düzenlediği bildirilmiştir. Anormal nükleer zarf morfolojisi, heterokromatin kaybı, genomik lamina ile ilişkili alanların (LAD'ler) nükleer laminadan ayrılması, artan kromatin erişilebilirliği ve tekrarlayan dizi ekspresyonunun aktivasyonu gibi birçok heterokromatin ile ilişkili anormallikler SIRT3 kaybindan kaynaklanır (18).

2.2.4. Sirtüin 4 (SIRT4)

SIRT4 hem ADP-ribosil transferaz hem de de-3-hidroksi-3-metil-glutarillenmiş (HMG) lizin kalıntılarına karşı güçlü bir deaçilaz aktivitesi gösterir ve mitokondride bulunan üç sirtüinden birisidir (22, 95). SIRT4'ün mitokondride lokalizasyonunu sağlayan N-terminal mitokondriyal sinyal dizisi bulunur (96). SIRT4'ün lipoamidaz, deaçilaz, enzimatik aktiviteleri vardır ayrıca substratları farklı doku ve hücrelerde farklı etkilere neden olur. Pankreas β hücrelerinde SIRT4 insülin sekresyonunu inhibe ettiği ve pankreasta bir deaçilaz olarak insülin duyarlılığını düzenlediği bildirilmiştir. Kas ve karaciğerde yağ asidi oksidasyonu (FAO) SIRT4 tarafından baskılanır (97). SIRT4 genomik stabiliteyi korur ve hücrel metabolizmayı düzenler. SIRT4 glutamin anaplerozunu baskılayarak hücre büyümesini, proliferasyonunu ve transformasyonunu inhibe ettiği bilinen anti-onkogen görevi yapar (98). SIRT4 pek çok besin maddesinin katabolizmasını düzenleyen ve metabolizmadaki düzenleyici fonksiyonlarına rağmen hücre döngüsü ilerlemesine ve MEK/ERK veya AMPK/mTOR sinyal yollarına aracılık eder (20). SIRT4 en çok kalp, karaciğer,

böbrek, dalak, prostat, testis ve yumurtalıkta ekspresse edilir (99). SIRT4 malonil CoA dekarboksilazı deasetilleyerek inhibe eder ve besin açısından zengin koşullarda aktif olur (21). SIRT4 lipid homeostazisini düzenler ve karaciğerde SIRT4 inhibisyonu mitokondriyal yağ asidi metabolizması ile bağlantılı enzimlerin gen ekspresyonunu artırır (100). SIRT4 glikozun trikarboksilik asit döngüsüne girişini etkileyen piruvat dehidrojenaz enziminin aktivitesini baskılar (Şekil 2.8.) (101).



Şekil 2. 8. SIRT4 ve mitokondriyal metabolik yollardaki substratları. SIRT4 çeşitli metabolik süreçlerde çeşitli hedeflerin (sarı yerler) aktivasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak modüle eder. Belirli bir aktivitenin etkinleştirilmesini (yeşil yerler), ve baskılanmasını (kırmızı yerler) göstermektedir. (A) SIRT4 ve kanser gösterimi (B) SIRT4 mitokondriyal oksidatif stres üzerindeki etkileri (22). (Atf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

SIRT4 ekspresyonunun alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olan bireylerin karaciğerinde arttığı gözlemlenmiştir (102). SIRT4 yüksek oranda korunmuş bir alana sahiptir ve yapılan çalışmalarda SIRT4 NAD⁺ ya bağımlı deasetilaz aktivitesi olmadığı fakat hedeflerini NAD⁺ a bağımlı ADP-ribosilasyonu ile etkilediği gözlemlenmiştir (103). SIRT4 lipoil ve biyotinil-lizin modifikasyonlarını asetilasyonlardan daha hızlı bir şekilde yok eder. SIRT4 piruvat dehidrojenaz kompleksinin (PDH) bileşenleri arasında

fiziksel ve fonksiyonel bir etkileşim halindedir (104). SIRT4 diyabet ve obezite gibi metabolik hastalarda önemli yolları düzenlediği açıklanmıştır. Glikoz ve amino asit ile uyarılan insülin sekresyonu SIRT4 yokluğunda arttığı gözlemlenmektedir. SIRT4 homolog bir sirtüin deaçilaz alanı bulundurur. Bu alanda korunmuş bir katalitik histidin (H161), bir Rossmann ve NAD⁺ bağlama bölgesi vardır (23). DNA hasarına maruz kalan SIRT4 daha sonra mitokondriyal konumunu korur. SIRT4'ün DNA hasarına benzer şekilde HepG2, HeLa veya HEK293T hücrelerinde aşırı ekspresyonu (SIRT4-OE) glutamin tüketimini baskılar (105). Ayrıca mitokondriyal ATP homeostazını düzenler ve eksikliğinde ANT2/AMPK/PGC-1 α (peroksizom proliferatörü ile aktifleştirilen reseptör- γ koaktivatör-1 α)'ı sinyaller aracılığıyla ATP seviyelerini düzenlemek için mitokondriden çekirdeğe retrograd sinyal yanıtını başlatır (106,107). SIRT4 besin algılama sinyali ve mitokondriyal metabolizma negatif düzenleyicisidir. ATP seviyesi ve lipid metabolizmasına etkileri nedeniyle tip 2 diyabet (T2D), alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, diyetle bağlı obezite, apoptoz, damar hastalığı, kanserin gelişimi ve inflamatuvar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (24). SIRT4 aktivitesinin baskılanması egzersiz toleransını artırır ve diyetle bağlı obeziteye karşı koruma sağlar. Proliferasyon artması ve genotoksik strese karşı duyarlılık artması SIRT4 kaybından kaynaklanmaktadır (108).

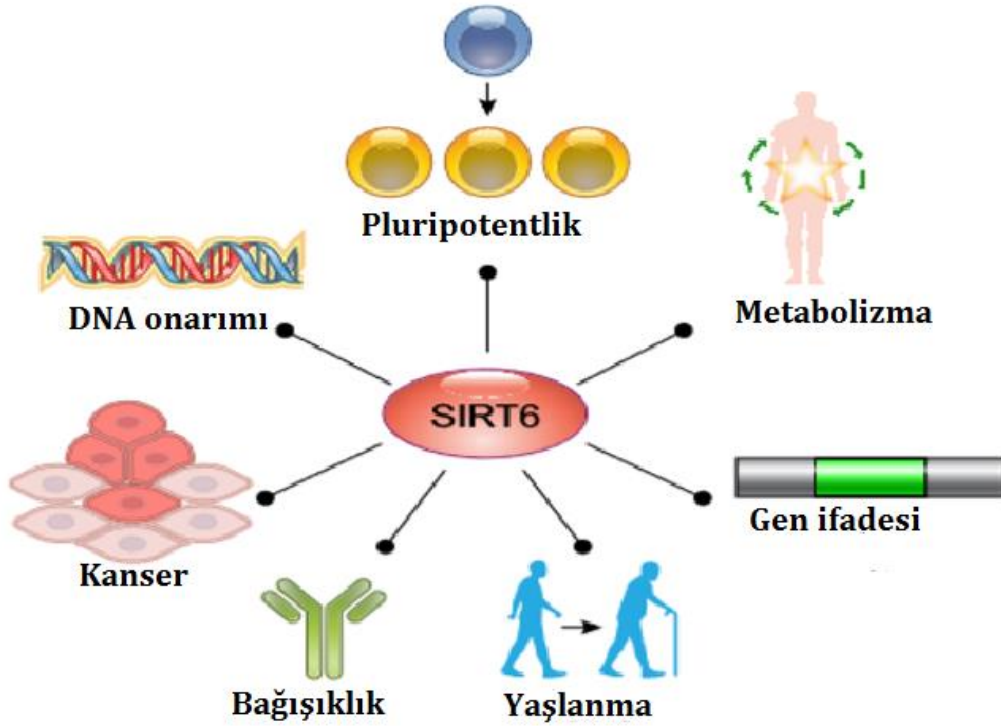
2.2.5. Sirtüin 5 (SIRT5)

SIRT5 mitokondriyal matrikste bulunur ve enzimleri hücrenin metabolik merkezi içerisinde. SIRT5'in konumunu belirleyen bir N-terminal mitokondriyal sinyal dizisi bulunur. İnsan hücre çizgileri ve fare deneyleri sonucunda karaciğerde üre döngüsündeki ilk ve hız sınırlayıcı enzim olan karbamoyl fosfat sentetaz 1 (CPS1) deasilasyonunu ve aktivasyonunu sağlayan SIRT5, amonyanın detoksifikasyonunu destekleyebileceği gözlemlenmiştir (96). Ayrıca kalp fonksiyonlarının düzenlenmesine rol alır ve in vitro histon H4 peptidi üzerinde NAD'a bağımlı deasetilaz aktivitesi vardır (109 ,110). SIRT5 güçlü bir demalonilasyon, desüksinilasyon ve deglutarilasyon aktivitesine sahiptir (9). Mitokondride SIRT5 lizin süksinilasyonun küresel bir düzenleyicisidir. SIRT5 lizin desüksinilasyon aracılığıyla çeşitli mitokondriyal metabolik yollarda bulunan enzimleri etkiler ve piruvat dehidrojenaz kompleksi, süksinat dehidrojenazın aktivitesini baskılayarak biyokimyasal aktiviteyi ve mitokondriyal solunumu inhibe eder. SIRT5'in

farklı translasyon sonrası modifikasyon aktiviteleri vardır. Ayrıca ekspresyonu durdurulan hücrelerde amonyak seviyelerinin arttığı ve aşırı ekspresse eden hücrelerde azaldığı gözlemlenmiştir (25). SIRT5'in en iyi substratlarından birisi bir histon H3K9 asetil peptididir (111). SIRT5'in farklı kanserlerde bir tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev yaptığı bilinmektedir (26). SIRT5'in katalitik reaksiyonu protein substratların lizin yan zincirinden bir süksinil grubunun çıkarılmasını içerir ve nikotinamid (NAM) ve 2'-O-süksinil-ADP-riboz üretirken ko-substrat olarak NAD^+ tükettiği bilinmektedir. SIRT5'in katalitik reaksiyonda bulunan iki amino asit (tirozin (Y102) ve arginin (R105)) desüksinilaz aktivitesi için gerekli olduğu bilinir. SIRT5 yağ asidi β -oksidasyonunu ve keton vücut sentezini düzenlemede rol alır (27). Yapılan çalışmada ACOX1 (asil-CoA oksidaz 1)'in SIRT5'in fizyolojik bir substratı olduğu açıklanmıştır. SIRT5'e bağlı desüksinilasyonun aktif dimer oluşumunu baskılayarak ACOX1 aktivitesini engeller ve ürat oksidaz yoluyla pürin metabolizmasını destekleyen ve lizin desüksinilasyonunu, demalonilasyonunu katalizleyen tek enzim olduğu açıklanmıştır (112, 113). SIRT5, SOD1 (süperoksit dismutaz)'a bağlanarak desüksinilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar. SIRT5 SOD'u (SOD1) aktive ederek hücrel ROS konsantrasyonunu azaltır (114).

2.2.6. Sirtüin 6 (SIRT6)

SIRT6 çeşitli enzimatik aktiviteleri olan çok işlevli bir proteindir ve deasetilasyon aktivitesi bulunan histon deasetilaz olarak bilinir (115). SIRT6 substratları histon H3 ve H4 lizin kalıntılarının asetil grupları ile sınırlı değildir ve lizin kalıntılarında asetil grupları bulunan diğer proteinleri de içerebileceği açıklanmıştır. Translasyon sonrası modifikasyonlar aracılığıyla SIRT6 gen ekspresyonunu veya protein aktivitesinin düzenlenmesini sağlar. SIRT6 tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi proteinlerin salgılanmasını, düzenlemesini sağlayan yağ açılma aktiviteleri vardır (116). SIRT 6'nın üç ana enzimatik aktivitesi vardır. Bunlar; deasetilasyon, yağdan arındırma ve mono-ADP-ribosilasyondur. Ayrıca poli (ADP-riboz) polimeraz-1'i (PARP-1) aktive edebilme özelliğinden dolayı DNA hasarının onarımı teşvik ettiği açıklanmıştır ve çeşitli fizyolojik, patolojik süreçleri düzenler (Şekil 2.9.) (117).



Şekil 2. 9. SIRT6'nın rol aldığı mekanizmalar (118). (Atıf yapılan şekil modifiye edilmiştir).

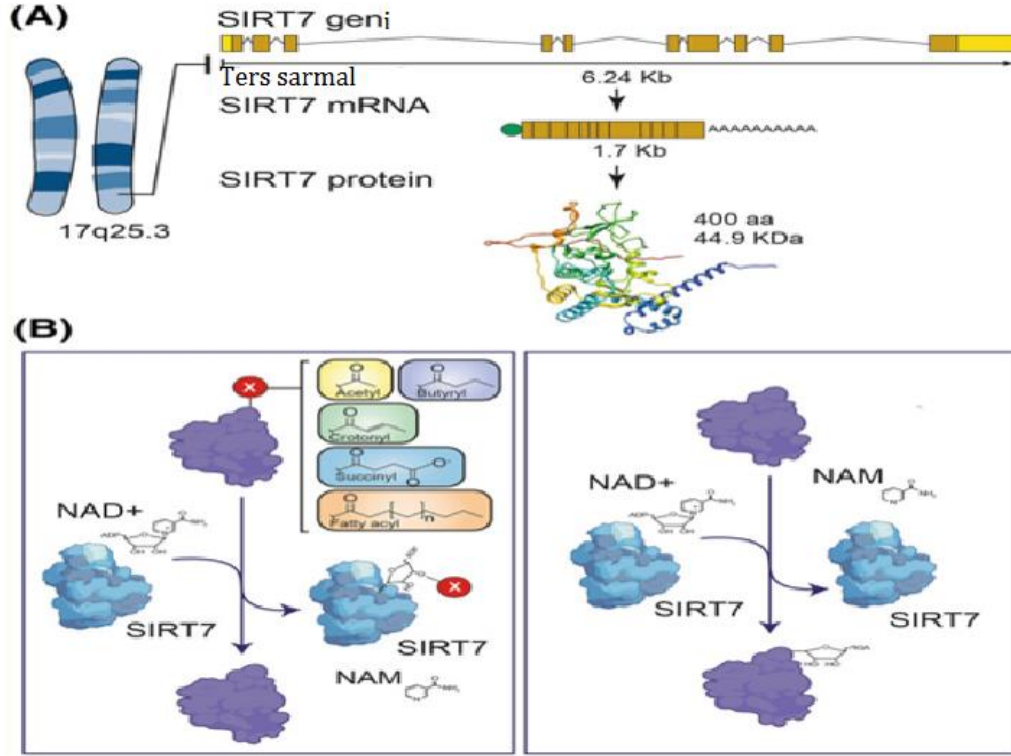
SIRT6 DNA hasarı onarımını teşvik eden, normal kromozom yapısını koruyan ve enerji metabolizmasını düzenlenmesini sağlayan hücrelerin, dokuların, organların ve vücudun yaşlanmasını engelleyebilen uzun ömürlü bir protein olduğu açıklanmıştır (119, 120, 121). SIRT6 tarafından inflamasyon gelişiminin düzenlendiği bilinmektedir (122). İnflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu ve bağışıklık hücrelerinin immün baskılayıcı bir fenotipe polarizasyonu özelliğiyle SIRT6 anti-inflamatuvar etkiler gösterir (123). Ayrıca kanserin farklı aşamalarında veya farklı tümör hücre hatlarında onkogen veya tümör baskılayıcı görevleri vardır (28). SIRT6 osteosarkomda ve papiller tiroid kanserinde yalnızca tümörijenik etkiler gösterirken mesane kanserinde ve glioma da antitümörijenik etkiler gösterir (16). Ayrıca çekirdekte bulunan NAD^{+} ya bağımlı bir deasetilazdır ve çekirdekteki proteinler üzerinde bulunan lizinlerin asetilasyonunu düzenler. SIRT6 deasetilasyon aktivitesi aktif yapısı nükleozomlara bağlı olduğu histon H3 ve H4 serbest histonlar yerine nükleozomlar olarak paketlenmesi nedeniyle substratlara bağlanarak deasetilasyonu katalizler (124). Ayrıca mitotik hataları ve hücre yaşlanmasını önlemek için perisentrik heterokromatin üzerindeki bazı histonları asetiller ve bazı histonları ise deasetilleştirir. SIRT6 yıkım hücrelerinde telomer fonksiyon bozukluğuna ve genomik dengesizliğe yol açar.

SIRT6 serbest yağ asitleri, fizyolojik konsantrasyonda deasetilasyon aktivitesini artırır (89). SIRT6'nın kristal yapısında uzun zincirli yağlı asil gruplarını bulunduran bir hidrofobik kısım olduğu tanımlanmıştır (125). SIRT6 yaşlanmayı; DNA hasar onarımının teşvik edilmesini, kromozomların normal telomer yapısının korunmasını, glikoz ve NAD⁺ metabolik dengesinin düzenlenmesini yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) aracılığıyla düzenler. SIRT6 hücre yaşlanması inhibisyonunu ve kalp hipertrofisini, kardiyomiyosit yaşlanmayı azaltır (28). SIRT6 kromozom yapısını korur ve eksikliğinde erken yaşlanma bozukluğu görülen hücre kusurlarına benzer özellikte kromozomal parçalanma, ayrılmış sentromerler ve kromozomal boşluklar gibi anormal telomer yapılar gözlemlenir. SIRT6 perisentrik transkriptlerin anormal birikimini önler (126). SIRT6 nükleer faktör-κB (NF-κB) RELA alt birimi ile etkileşime girerek hücre yaşlanmasını baskılamak için NF-κB hedef genin pro-motorunda H3K9ac'yi deasetilleştirir. SIRT6 glukoz homeostazını ve NAD⁺ metabolik dengesini düzenleyerek yaşlanma sürecini yavaşlatır.

2.2.7. Sirtüin 7 (SIRT 7)

SIRT7 p53 bağlayıcı protein 1'in (53BP1) alımını kolaylaştıran histon H3 lizin 18 (H3K18) deasetilasyonu aracılığıyla homolog olmayan uç birleştirmeyi (NHEJ) destekler. SIRT7 tükenmesi kalıcı ataksi-telanjektazi'nin (ATM) asetilasyonunu ve aktivasyonunu etkiler. SIRT7 eksikliği DNA hasarında ATM inaktivasyonunu geciktirir bu nedenle DNA onarımı azalır ve hücre ölümü artar (30). Ayrıca 17q25.3 kromozomal bölgesinde bulunur ve tek sarmalın belli bir bölgesinin transkriptini sağlar (127). SIRT7 merkezi katalitik bölgeyi korurken yan C ve N terminal bölgelerini bulundurur (128). SIRT7'nin diğer proteinler (RNA ve DNA) ile N- ve C-terminal bölgeleri aracılığıyla etkileşime girdiği açıklanmıştır. SIRT7, N- ve C-terminal bölgelerinde nükleer lokalizasyon sekanslarının (NLS) ve nükleolar lokalizasyon sekanslarının (NoLS) varlığından dolayı çekirdeğe lokalize olur. SIRT7 nükleolar bölgelerde çok fazla bulunur (129). SIRT7 deasetilaz, mono-ADP-ribosilaz, desüksinilaz, buttirilaz, yağ-açılaz ve dekrotonilaz aktiviteleri vardır ve bu özellikler çift sarmallı asitler (dsDNA/dsRNA) ile ya da transfer RNA'lar ((tRNA'lar) ile güçlendirilmektedir aynı zamanda rRNA transkripsiyonunu düzenler, DNA onarımına ve genomik stabilitenin korunmasına katılır ayrıca bazı hücrelerin hücre farklılaşmasında rol alır (29).

SIRT7 nükleoller de konumlanan tek sirtüindir ve yaşlanma karşıtı etkisini p5376 deasetilasyonu ile miyokardiyal apoptozu azaltarak gösterir (130).



Şekil 2. 10. SIRT7'nin özelliklerinin gösterimi. **A)** İnsan SIRT7 17q25.3 kromozomal bölgesinde bulunan ters sarmalın 6238 bp'lık bir bölgesini kapsayan ve 44,9 KDa moleküler ağırlığa sahip 400 amino asitlik bir proteini kodlayan 1725 bp'lık bir transkript üretir. **B)** SIRT7 lizin kalıntıları üzerinde meydana gelen reaksiyonlar verilmiştir (127).

SIRT7 ribozomal DNA (rDNA) transkripsiyonunu düzenlemek amacıyla histonlara bağlandığı nükleollerde ekspresse edilir ve mRNA'nın tüm dokularda farklı olarak ekspresse edilmesini sağlar. SIRT7 replikatif yaşlanma esnasında nükleollerden kromatine ve sitoplazmaya geçiş yaparak burada rDNA transkripsiyonunu azaltır. SIRT7 aşırı ekspresyonu RNA polimeraz I (RNA Pol I) aracılı transkripsiyonu artırırken inhibisyonu azaltır (31). SIRT7 fizyolojik düzeyde hepatik lipid metabolizmasında, kardiyovasküler sistem homeostazisinde ve adipogenezde rol alır. SIRT7 moleküler düzeyde genom bütünlüğünü korur. SIRT7 mitokondriyal ve sitozolik protein homeostazisini düzenleyen transkripsiyonel bir baskılayıcıdır (131).

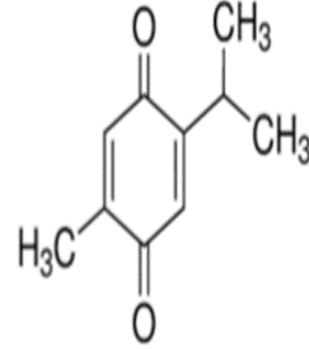
SIRT7 güçlü bir mitokondriyal fonksiyon düzenleyicisidir bundan dolayı SIRT7 baskılanması nükleer olarak kodlanmış mitokondriyal genlerin ekspresyonunun azalmasına yol açarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olur (13). SIRT7 histon desüksinilasyonuna aracılık eder (9).

2.3. Timokinon (TQ)

Timokinon (TQ), *Nigella sativa* bitkisinin (% 54) uçucu yağının biyoaktif bir bileşenidir. Hem laboratuvar koşullarında (in vitro) hem de canlı organizmalarda (in vivo) yapılan çalışmalar, TQ'nun anti-enflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser etkilerini ortaya koymuştur. Birçok araştırmacı, TQ'nun kanser hücrelerinin büyümesini engelleme yeteneğinin, özellikle kanser hücrelerine özgü olduğunu göstermiştir (132). N. *Sativa* tohumları sundukları besin değerleri nedeni ile Orta Doğu halkı arasında çok popülerdir ve biyolojik etkilerinin çoğunluğu tohumlarının %30-48ini oluşturan yağ bileşeninden kaynaklanmaktadır (133). N.*Sativa* Orta Doğu, Akdeniz bölgeleri, Güney Avrupa, Hindistan, Pakistan, Suriye, Suudi Arabistan ve Türkiye olmak üzere dünyanın birçok yerinde yetiştirilen bir bitkidir (134). N. *Sativa* iki bin yıla aşkın bazı Asya ülkelerinde birçok hastalığa karşı iyileştirici ve önleyici bir madde olarak kullanılmaktadır. N. *Sativa* ağrı kesici, iştah açıcı, gaz giderici, terletici, sindirim, idrar söktürücü, diyabet, öksürük, ateş, egzama, bronşit ve grip gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır. N. *Sativa* anti-enflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, nöro-koruyucu ve reno-koruyucu özellikleri vardır (135, 136). Aynı zamanda N. *Sativa* asteni ve depresyonu azalttığı, vücut direncini arttırdığı açıklanmıştır. N. *Sativanın* aktif maddelerinin antibakteriyel, antifungal, antidiyabetik, immünomodülatör, anti-inflamatuar, analjezik, antiviral, antioksidan, antikonvülsan, antihipertansif, antikanser ve antihiperlipidemik etkilere sahiptir (137). N.*Sativanın* sahip olduğu bu etkilerden dolayı tohumu ve yağı, astım, ishal, dizanteri, hazımsızlık, ateş, sarılık, apopleksi, hemoroid ve kardiyovasküler, sindirim, bağışıklık sistemi, böbrek hastalıkları, karaciğer ve solunum gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (138, 139). Ayrıca kullanılan N.*Sativanın* herhangi bir yan etkisi olmadığı belirtilmektedir (35)

N. *Sativa* yaklaşık olarak 20-30 cm boyunda oldukça tüylü tek yıllık otsu bir bitkidir ve çiçeği beş yapraklı açık veya koyu mavi rengindedir. N. *Sativanın* beslenme için kullanılan kısmı kapsül içinde özel bir aromaya sahip beyaz, üçgen ve acı tanelerden

oluşan çok sayıda tohumlarıdır. N. Sativa en önemli biyoaktif bileşenlerinden biri olan ve birçok biyolojik etkilerinden sorumlu olan timokinon (TQ) ilk olarak 1959 yılında sentezlenmiş ve %18.4-%24.0 oranlarında uçucu bir yağ halinde olduğu bulunmuştur. Timokinon N.Sativa bileşenleri arasında en fazla çalışılan ve araştırılan bileşendir (140, 141).



Şekil 2. 11. Nigella Sativa bitkisi, tohumu (142) ve timokinonun kimyasal formülü (143).

Timokinon (TQ) (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) uçucu yağının ana biyoaktif bileşeni olarak bilinir (144, 145). TQ anti-enflamatuar, antioksidan ve lipid metabolik fonksiyonları olan bir flavonoiddir (146). TQ'nun kolesterolle beslenen tavşanlarda ateroskleroz gelişimini azalttığı ve bundan dolayı triasilgliserol seviyeleri ile ilişkin olduğu bildirilmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyelerinde ve glutatyon içeriğinde bir artış olduğu gözlemlenmiştir (138). TQ'nun anti-konvülsan, anti-mikrobiyal, anti-kanser anti-histaminik, anti-diyabetik, anti-enflamatuar, kardiyoprotektif ve antioksidan etkinliği gibi farklı özellikleri vardır (35, 147) Adjuvanla uyarılan artritte TQ'nun koruyucu etkilerinin, interlökin (IL-1 β) ve TNF- α düzeylerinin zayıflamasına aracılık ettiği ve TQ romatoid artritte etkinlik gösterdiği açıklanmıştır (133). TQ'nun hücrel proliferasyonu, apoptozu ve metastazı düzenleyen çoklu moleküler yolları etkileyen dikkate değer bir terapötik ajandır (32). Yapılan birçok araştırmada TQ'nun anti-tümör anti-oksitatif, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkiler sergilediği gösterilmiştir (35, 148, 149). Antioksidan özelliği TQ'nun hayati özelliklerinden biri olarak kabul edilir. Literatürler ve araştırmalar TQ'nun oksidatif stresle mücadelede umut verici antioksidan özelliği olduğunu göstermiştir. TQ'yu antioksidan aktivitesi çok düşük olan oksitlenmiş formdan indirgenmiş forma dönüştürür.

Timokinon, sitoprotektif enzimlerin indüksiyonu yoluyla etki göstererek hücrelerin oksidatif stresin neden olduğu hücrel hasara karşı korunmasını sağlar (33).

Bir p-kinon olan TQ, sitoprotektif enzimlerin aktivitesini indükleyerek koruyucu etkiler gösterir ve oksidatif stresin neden olduğu hücrel hasara karşı koruma sağlar. Özellikle, TQ'nun, mRNA ifadesinin indüksiyonu ve enzim aktivitesinin aktivasyonu yoluyla birden fazla antioksidan sitoprotektif enzimi yukarı regüle ettiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, antioksidan aktivitesine ek olarak TQ'nun ayrıca bir pro-oksidan etki gösterdiği de gözlemlenmiştir(150).

TQ hücre proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozu indükler. Ayrıca TQ çeşitli insan kanser hücrelerinin ksenograft tümörlerinin in vivo büyümesini engellediği bildirilmiştir (151). TQ'nun birçok patolojik bozukluğun kontrolünde kullanılabileceği ve bu patolojik hastalıklara örnek olarak kalp hastalıkları, diabetes mellitus, ateroskleroz, astım, artrit, nörodejeneratif bozukluklar ve kanser verilebilir. TQ'nun faydaları yapısında bulunan lipofilik kinin bileşeninden kaynaklanmaktadır. TQ'da bulunan lipofilik yapı molekülün hücrel yapılara etkin ve kolay erişimini sağlar. Ayrıca tümörjenezde yer alan hücre içi transkripsiyon faktörlerini ve kinazları ele alır. Yapılan çalışmalarda TQ meme kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, kolon kanseri ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerine karşı antineoplastik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. (152) Yapılan in vivo ve in vitro araştırmalarda TQ'nun antikanser aktivitesine farklı etkiler ile aracılık ettiği gösterilmiştir (153). TQ'nun proliferasyon, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, anjiyogenez, karsinogenez ve kanser metastazı gibi çeşitli biyolojik yolları etkilediği bildirilmiştir (34, 154).

TQ hücrelerin oksidatif stres kaynaklı hücrel hasara karşı korunması ile sonuçlanan sitoprotektif enzimlerin indüklenmesiyle etkilediği gösterilmiştir. TQ süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), mRNA ekspresyonu, glutatyon redüktaz ve glutatyon gibi çeşitli antioksidan sitoprotektif enzimlerin aktivasyonunu artırır (25, 33).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Yaptığımız Deneylerin Kronolojik Olarak Sıralaması

- Hücrelerin kültüre edilmesi
- Kimyasalların ve ilaçların stok çözeltilerinin hesaplanması ve hazırlanması
- Deney gruplarında ilaç dozlarının belirlenmesi için MTT deneyinin yapılması
- Hücrelerin kültür ortamında ilaç uygulamaları için gruplara ayrılması
- Tüm deney gruplarına ait hücrelerden total RNA izolasyonu
- Reverse Transkripsiyon (mRNA'dan cDNA eldesi)
- Real-Time PCR (qPCR)- mRNA ekspresyonu
- Verilerin değerlendirilmesi: İstatistiksel Analiz

Çalışmada Kullanılan Cihazlar:

- Sınıf II biyogüvenlik kabini (Telstar)
- CO₂'li 37 °C inkübatör (Thermo Scientific Forma)
- İnverted ışık mikroskobu (LEICA DFC450, USA)
- Santrifüj Masaüstü (Thermo Scientific)
- Su banyosu (Memmert, Bavyera, Güney Almanya)
- Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
- Etüv (Memmert, Bavyera, Güney Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (eppendorf Centrifuge 5417 R)
- PCR (Applied Biosystems, California, USA)
- Real time PCR cihazı (Rotor Gene Q, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya)
- Vorteks ve Mini santrifüj (Biosan FVL-2400N)
- NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, California, USA)
- -80 Buzdolabı (Nüve)
- -20 Buzdolabı (Arçelik)
- Otoklav (HIRAYAMA HV-50L)
- Absorbans mikropilaka okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan GO, USA)

- **Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar**
- DMEM -Dulbecco's Modified Eagle Medium- (GibcoTM)
- FBS -Fetal Bovine Serum- (Capricorn, Almanya)
- Penicilin/Streptomycin (Diagnovum)
- HBSS -Hanks' Balanced Salt solution- (Capricorn, Almanya)
- Trypsin/EDTA (1X) (GibcoTM)
- Timokinon (%99 BLDHARM)
- MTT (AppliChem)

3.1. Hücre Kültürü ve Hazırlık

3.1.1. Sterilizasyon

Çalışmanın yapılması için laminar kabinin sterile olması gerekmektedir. Laminar kabin sterile etmek için 30 dakika UV ışığı açıldı ve sonrasında %70'lik etil alkol (Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak temizlendi. Sterilizasyonu sağlanan laminar kabin içerisine kullanılacak malzemeler %70'lik etil alkolle silinerek laminar kabin içerisine alındı. Laminar kabin içerisine alınan ekipmanlar laminar kabin içerisinde açıldı ve deneyler için hazırlandı. Hücre kültürü deneylerin çalışmaları için kullanacağımız sarf malzemeler (DMEM, FBS, pipet ucu, plastik v.b) steril ve filtreli bir halde temini sağlandı.

3.1.3. Besiyerinin Hazırlanması

Besiyeri hazırlamak için ihtiyacımız olan kimyasallar 37°C'de ki su banyosunda ısıtıldı. Hücrelerin kültür kaplarında büyümesi için DMEM'den 445 ml FBS'den 50ml (%10) ve Penicilin/Streptomycin (Antibiyotik) 'den 5ml (%1)'lik miktarlarda alınarak hücre kültürü için hazır hale getirildi ve 50 ml'lik falkonlara bölünerek daha sonra kullanmak için uygun saklama koşullarında saklandı.

3.1.4. Hücre Hatlarının Kültürü

Çalışmada kullanılacak olan BEAS-2B, A549 ve CALU-1 hücre soyları ATCC (American Type Culture Collection)'a aittir ve sıvı azotta daha önce stokladığımız biri

normal diğerk ikisi kanser hücre soyları kullanıldı. Kullanılan hücrelerin özellikleri aşğıdaki Tablo 3.1'de verilmiştir. Kullanıcak hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak hızlı bir şekilde çözdürüldü ve %70 ' lik alkolle dezenfekte edildi. Dezenfekte edilen hücreler laminar kabin içersine alınarak hücrelerin büyümesini sağlayan daha önceden hazırlanan besiyerinden yaklaşık olarak 10-12 ml besiyeri alınarak 75 cm²'lik flasklara eklenildi. Çözdürdüğümüz hücreler besiyeri eklenilen flasklara aktarıldı ve hafifçe sallanılarak hücrelerin eşit bir şekilde besiyeri içersinde dağılımı sağlandı. Hücreler 37 °C 'de, %5 CO₂ ve % 95 nemli ortam bulunduran inkübatöre kaldırıldı.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullandığımız akciğerkanseri hücre soylarının özellikleri (ATCC)

Hücre Soyu	ATCC Adı	Kanser	Histopatolojisi
CRM-CCL-185	A549	Akciğerkanseri	Karsinom
HTB-54	CALU-1	Akciğerkanseri	Epidermoid Karsinom
CRL-3588	BEAS-2B	Akciğerk Normal	Bronş Epitelyal

3.1.5. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücreler 75 cm² 'lik flaskın yüzeyini kapladıktan sonra (%90 yoğunluk) besiyeri aspire edildi. Hücrelerin bulunduğu flasklara 4-5 ml 1X'lik tripsin-EDTA aktarıldı ve enzim aktivitesi sağlanması için flasklar 2-3 dk inkübatörde bekletildi. Flask yüzeyinden hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra nötrale olması için hücreler üzerine 5 ml besiyeri eklenildi. Falkon tüplerine cam pipet yardımı ile aktararak 700 xg'de 25 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet kısmının üzerine bir miktar medium alındı. Yavaşça pipetaj yapılarak hücreler üzerine taze besiyeri eklendi ve flasklara eşit dağıtılarak inkübatöre kaldırıldı.

3.1.6. Hücre Hatlarının Dondurulması

Hücreleri dondurmak için stok solüsyonu hazırlandı ve stok solüsyonu hazırlığında 50 ml falkon tüpe %70 DMEM, %20 FBS ve %10 DMSO alınarak stok solüsyonu karışımı

yapıldı. Hücre pelletinin yer aldığı tüplere hazırlanan karışımdan 1 ml eklenerek pipetaj yapıldı ve kriyo tüplere alındı. Kriyo tüplere alınan hücreler 1 saat -20 C'de bekletildi ve sonra bir gece boyunca -80 C'de kaldırıldı. Sonraki gün hücreler sıvı azot tankına alınarak daha sonra kullanılmak için dondurulup stok oluşturuldu.

3.2. Timokinon Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan 1000 mg timokinon (RB Kimya, BLDHARM,) hassas terazi yardımıyla 50 mg tartıldı, 1 ml'lik DMSO içerisinde çözündürülerek 0,2µm'lik filtreden geçirildi. 300 mM konsantrasyonda hazırlanan stok çözelti -80 °C'ye kaldırıldı. Bu stok çözeltiden 0, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda bulunan çalışmada kullanılacak çözeltiler % 5'lik FBS'li DMEM ile hazırlandı.

3.3. MTT ile Hücre Canlılık Deneyleri

MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) tetrazolyum tuzu, hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan kolorimetrik bir analiz yöntemi olarak bilinmektedir. MTT, hücreler tarafından emilen bir maddedir ve canlı hücre miktarı hakkında bilgi edinmemizi sağlayan yüksek hassasiyetli yöntemdir. MTT indirgeme özelliği aracılığıyla her hücrenin hücre canlılığı analizi yapılır. Ayrıca MTT hassas bir yöntemdir. Deney sonucunda gözlemlenen boya yoğunluğu canlı hücre sayısını belirtir.

3.3.1. Timokinon'un Farklı Dozları ile MTT Deneyi

1. Hücrelerin (BEAS-2B, A549 ve CALU-1) 96 kuyucuklu petri kabına her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
2. Hücreler % 65-70 doluluk oranına ulaştığında besiyerleri alındı.
3. Hücreler % 2 FBS'li DMEM içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlar da ekilen TQ (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
4. Sonrasında hücreler HBSS ile yıkandı.
5. HBSS için falkon tüp içerisine 7,5ml'lik HBSS alındı ve içerisinden 750 µl atıldı.
6. Falkon tüp üzerine 750 µl MTT stok solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.

7. 96'lık well'e her kuyucukta 150 µl eklenildi. 4 saat 37°C inkübatörde inkübe edildi.
8. 4 saat sonra inkübatörden alınan hücrelerden MTT solüsyonu aspire edildi.
9. Her kuyuya 180 µl HCl içeren izopropanol (0.04 M asidik izopropanol) eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.
10. Kuyucuklarda bulunan örnekler okuma kuyucuklarına alındı.
11. Absorbans değerleri 570nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda okutularak kaydedildi.

3.4. İlaç Uygulamasının Gen İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi

1. Uygun koşulun oluşturulması için uygun timokinon konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin tespiti için sirtüin gen ifade düzeyleri belirlendi.
2. Bu amaçtan dolayı BEAS-2B, A549 ve CALU-1 hücre hatları 6 kuyucuklu petrilere her kuyucukta yaklaşık 3×10^5 hücre olacak şekilde kültüre edildi.
3. Hücreler yaklaşık olarak % 65-70 doluluk oranına geldiğinde besiyerleri alındı.
4. %2 FBS bulunan besiyeri içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki timokinon (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) ile 24 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı.

3.4.1. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu için ticari olarak satın alınan kit (BIO BASIC EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit, Canada) protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulandı:

1. İnkübasyon süresi dolan hücrelerin besiyerleri alındı ve hücrelerin üzerine her bir kuyucuğa 1X tripsin eklenerek 2-3 dakika inkübatörde bekletildi.
2. Nötralize için her kuyucuğa 1mL medium eklenildi.
3. Hücreler tek tek 15'lik farklı falkon tüplere alındı.
4. 10 dakika 700 cpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernatant tamamen atıldı ve pellet üzerine 2 ml HBSS eklenildi. Tekrar santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım atıldı.
6. Her tüpe 350 µl Buffer RLT solüsyonu eklenilerek hücre lizati toplandı ve vortekslenerek homojenize edildi.

7. Hücreler 1.5 mL'lik RNaz içermeyen bir mikrotüpe alındı ve 5 dakika 12.000rpm'de (11000xg) santrifüj edildi.
8. Homojenize edilen karışıma eşit hacimde %70 etanol eklenilerek pipetleme yardımı ile iyice karıştırıldı.
9. EZ-10 Spin kolona 2,0 mL toplama tüpüne yerleştirilerek 6000 xg 'de 1 dakika santrifüjlendi.
10. Kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
11. EZ-10 Spin kolona 500 µl RW Solüsyonu eklenilerek oda sıcaklığında 8000 rpm 'de 1 dakika santrifüjlendi.
12. Spin kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
13. EZ-10 spin kolonu tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
14. EZ-10 Spin kolona 500 µl RPE solüsyonu eklenilerek oda sıcaklığında 60 saniye boyunca 8000 rpm (6000 x g) 'de 1 dk santrifüjlendi.
15. Kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı atılarak RPE kalıntısı çıkarmak için 1 kere daha santrifüj yapıldı.
16. EZ-10 Spin kolonu RNaz içermeyen 1,5 ml'lik bir mikro tüpe aktararak kolonun orta kısmına 30-50 µl RNaz içermeyen su eklenildi.
17. RNaz içermeyen su eklenilen kolonlar 5 °C' de 2 dakika inkübe edildi ve 10 000 rpm' de (8000 xg) 1 dk santrifüj yapıldı.
18. Toplama tüpünde oluşan birikinti total RNA'yı içermektedir.
19. Elüsyon yapılmış RNA solüsyonu çalışma zamanına kadar -80 ° C'de saklandı.

3.4.2. Elde Edilen RNA'nın Kalite ve Miktar Tayini

cDNA sentezinde kullanılacak RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, California, USA) kullanılarak ölçüldü. Bu işlemde dilüe edilen 10 µl örnek alınarak OD 260/280 absorbans değerleri ölçüldü ve OD 260/280 absorbans değerleri 1.9-2.1 aralığında olan örnekler çalışmada kullanıldı.

3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen total RNA'dan cDNA sentezi için Applied Biosystems™ cDNA Reverse Transcription Kit kullanılmıştır. Kitin içeriği aşağıdaki tabloda bulunup, reaksiyon başına düşen hacim ve konsantrasyonlar da kullanılmıştır.

Deney Protokolü:

1. RNA örnekleri ve diğer tüm bileşenler buz üzerinde çözündürülerek her çözelti hafifçe vortekslendi ve vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonu reaksiyondan önce eşitlenmiştir.
2. Aşağıdaki tabloda verilen (Tablo 3.2) verilen tüm reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır.

Tablo 3. 2. 2X RT-master mix içeriği

Bileşenler	Hacim/Reaksiyon (µl)
10X RT Buffer	2.0
25dNTP Mix (100mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Ters Transkriptaz	1.0
Rnaz İnhibitör	-
Nükleaz içermeyen su	4.2
Reaksiyon başına toplam	10.0

3. 2X RT ana karışımını buza yerleştirildi ve yavaşça karıştırıldı.
4. cDNA RT reaksiyonlarını hazırlamak için;
 - a. Ayrı bir tüpün her kuyusuna 10 µl 2X RT master mix pipet yardımıyla alındı
 - b. Her kuyuya 10 µl RNA örneğinden pipetle alınarak eklendi. Karıştırmak için 2 kez yukarı aşağı pipetleme yapıldı. Tüpler kapatıldı.
5. Son hacim 20 µl olacak şekilde karışımlar alınıp iyice karıştırılıp, kısa bir santrifüjleme ile toplandı.

6. Tüpler Tablo 3.3'deki gibi ayarlanan Termal cycler Sensquest PCR cihazına (Sensquest, Göttingen, Almanya) yerleştirildi.

Tablo 3. 3. PCR zaman ve sıcaklık ayarları

	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dakika)	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Tepkime tamamlanma işlemi bittikten sonra elde edilen cDNA örnekleri çalışma zamanına kadar -80°C'ne kaldırıldı.

3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

PCR ışıma özelliğine sahip moleküler kullanılarak reaksiyon oluşurken izleme ve miktar belirleme yöntemine denir. qRT-PCR için qPCR syber green master mix kiti (Abmgood) kullanılmıştır.

1. Liyofilize halde olan primerlere 250 μ l steril distile su eklendi ve vortekslenerek 100 μ M ana stok çözeltiler hazırlandı. Ana stok -20°C'ye kaldırıldı. 10 μ M ara stok oluşturmak için ana stoktan 2 μ l alındı ve üzerine 18 μ l steril distile su eklendi. Çalışmada kullanılan gen primer dizileri Tablo 3.7'de belirtilmiştir.
2. Aşağıdaki tabloda yer alan tüm bileşenler buz üzerinde çözdürüldü. Her çözelti ayrı ayrı karıştırıldı.
3. Tablo 3.4'daki reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 3. 4. Gerçek zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşen	Hacim
Blastaq™ 2X qPCRMM ¹	10 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl
Template DNA	Variable (100ng genomik DNA)
Nülease free water	Up to 20 µl

4. Reaksiyon karışımları hafifçe karıştırıldı ve kısa süre santrifüj yapıldı.
5. Aşağıda yer alan Termocycle programı kullanılarak qPCR reaksiyonları Real Time PCR cihazı (Rotor Gene Q, Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Tablo 3. 3. RT-PCR sıcaklık ve zaman ayarı

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	6 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Bağlanma / Uzama	60°C	60 saniye	
Erime eğrisi	65°C	60 saniye	
	4°C	∞	

Tablo 3.7. Gen primer dizileri

GEN ADI	FORWARD	REVERSE
SIRT 1	TAGACACGCTGGAACAGG TTGC	CTCCTCGTACAGCTTCACAG TC
SIRT 2	CTGCGGAACTTATTCTCCC AGAC	CCACCAAACAGATGACTCTG AC
SIRT 3	CCCTGGAAACTACAAGCC CAAC	GCAGAGGCAAAGGTTCCAT GAG
SIRT 4	GTGGATGCTTTGCACACC AAGG	GGTTCAGGACTTGGAAACGC TC
SIRT 5	GTCCACACGAAACCAGAT TTGCC	TCCTCTGAAGGTCGGAACAC CA
SIRT 6	TGGCAGTCTTCCAGTGTG GGTGT	CGCTCTCAAAGGTGGTGTGCG AA
SIRT 7	TGGAGTGTGGACACTGCT TCAG	CCGTCACAGTTCTGAGACAC CA
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACA GCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC AA

qRT-PCR yönteminde elde edilen Ct (cycle threshold-eşik döngüsü) değerleri PCR sonucundaki ürünlerin miktarındaki değişiklikleri ifade eder. Her bir genin her örneğine ait Ct değerleri housekeeping gen Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri hesaplanır. (ΔCt) değeri ölçülen genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değişim gösterdiği bulunur. ΔCt değeri $\Delta Ct = \text{Gen Ct} - \text{Referans Gen Ct}$ şeklinde formüle edilir. Yapılan qRT-PCR deneyi sonucunda her bir deney grubunun ΔCt değeri her bir örneğin ΔCt değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği ($\Delta \Delta Ct$) değerleri hesaplandı. $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (değişim katsayısı) formüle $(2^{-\Delta \Delta Ct} = 2^{-(\text{Deney} \Delta Ct - (\text{Gen Ct} - \text{Referans Gen Ct}) - \text{Kontrol} \Delta Ct (\text{Gen Ct} - \text{Referans Gen Ct}))})$ göre ölçülen genin son değerinin başlangıç değerine göre oranı belirlendi. Belirlenen bu değer deney grubunda ifade düzeylerinin kontrol grubundaki gen baz alınarak birbirine göre karşılaştırılır.

3.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism 5 programı (GraphPad Software, La Jolla California USA) kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics ile tüm parametrelere ait ortalama ve/veya standart sapma (SD)/standart hata (SE) değerleri 2 kez tekrarlanan üçlü verilerden elde edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SE olarak ifade edilmiştir. Shapiro-Wilk Normality testinin sonunda, grupların karşılaştırılmasında bağımsız non-parametrik testler için Kruskal-Wallis testi, bağımsız parametrik testler için one-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. IC50 değerlerinin tespiti için GraphPad Prism 5 programında (GraphPad Software, La Jolla California USA) nonlinear regresyon analizi yapılmış ve zamana göre belirlenmiş olan timokinona ait IC50 değerleri logaritmik olarak ifade edilen dozlarda grafiğe aktararak R^2 değerleri ile birlikte elde edilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

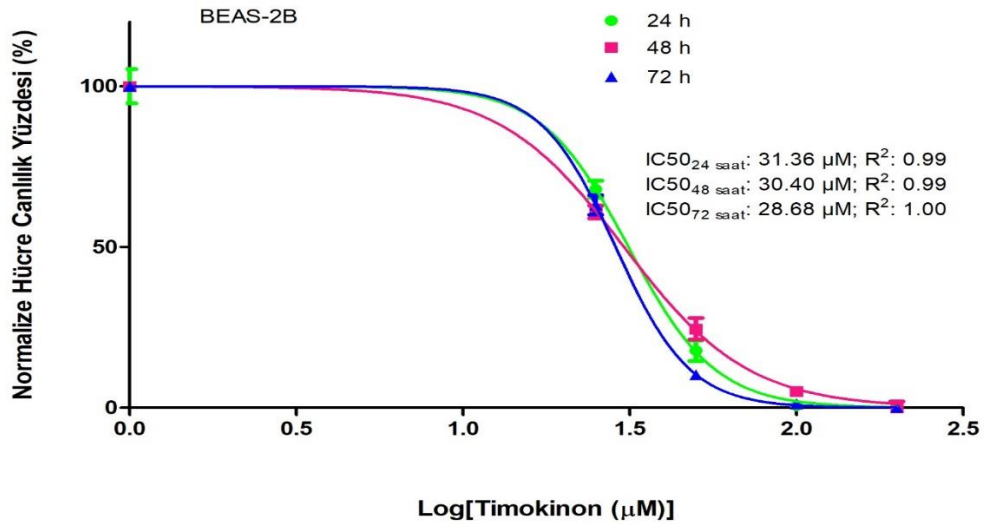
4. BULGULAR

4.1. Hücre proliferasyonu

Timokinon etkin maddenin akciğer normal ve kanserli hücre hatları BEAS-2B, A549 ve CALU-1 hücre hattı üzerindeki doza bağlı olarak hücre proliferasyon etkileri değerlendirilmek için MTT deneyi yapıldı ve Spektrofotometre (Thermo Scientific Multikan GO, USA) ölçüm cihazında absorbans değerlerine bakıldı.

4.1.1. Timokinon'un Farklı Konsantrasyonlarının Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

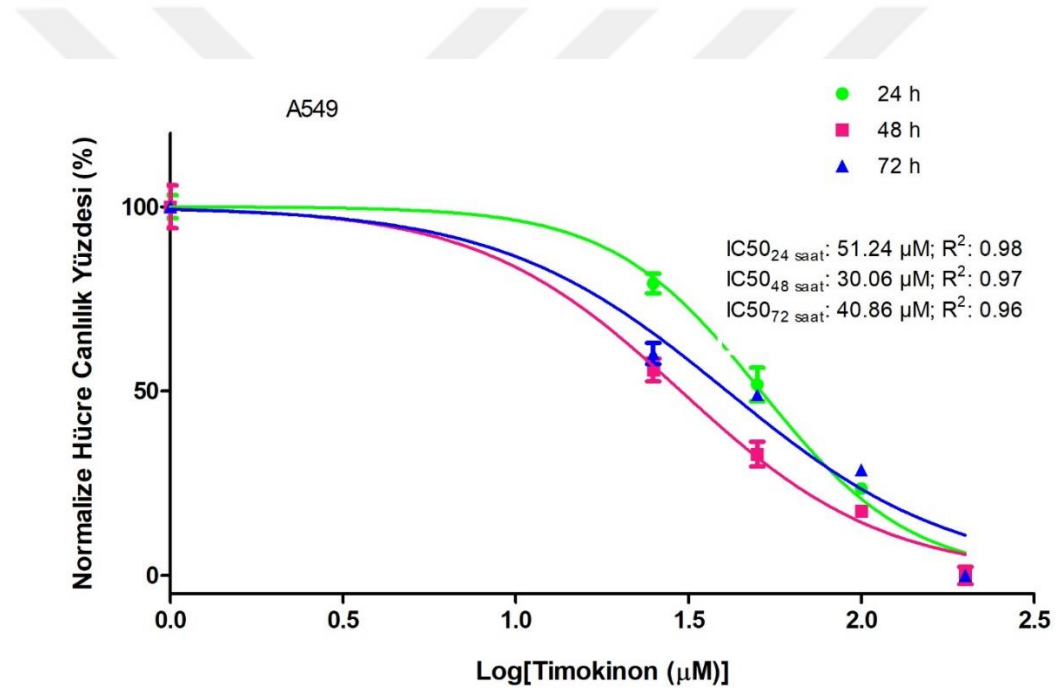
BEAS-2B hücrelerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Timokinon'un hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için MTT deneyi yapıldı. Bu deneyden sonra absorbans ölçümlerinden elde edilen hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Timokinon'un BEAS-2B hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucu BEAS-2B hattı timokininin etken maddesi ile 0,25,50,100 ve 200 μM konsantrasyonunda 24 saat muamele edildikten sonra BEAS-2B hücre hattının IC_{50} 31.36 μM , 48 saat muamele edildikten sonra BEAS-2B hücre hattının IC_{50} 30.40 μM ve 72 saat muamele edildikten sonra BEAS-2B hücre hattının IC_{50} 28.68 μM olarak saptanmıştır. (Şekil 4.1) MTT deneyi sonucunda doz miktarlarının en etkin saat 24 saatten sonra etki gösterildiği tespit edilmiştir.

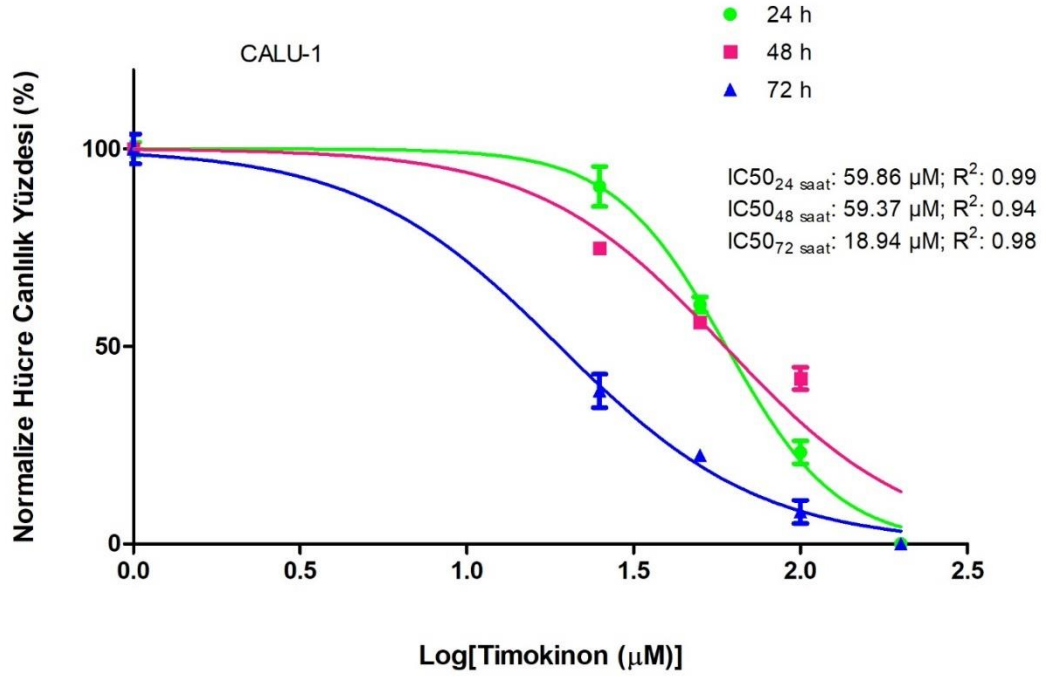
A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan timokininin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için MTT deneyi yapılmıştır. Bu deneyden sonra absorbans ölçümlerden elde edilen hücre proliferasyon grafiği şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4. 2. Timokininin A549 hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışma sonucu A549 hattı timokininin etken maddesi ile 0,25,50,100 ve 200 μM konsantrasyonunda 24 saat muamele edildikten sonra A549 hücre hattının IC_{50} 51.24 μM , 48 saat muamele edildikten sonra A549 hücre hattının IC_{50} 30.06 μM ve 72 saat muamele edildikten sonra A549 hücre hattının IC_{50} 40.86 μM olarak saptanmıştır. (Şekil 4.2) MTT deneyi sonucunda doz miktarlarının en etkin saat 24 saatten sonra etki gösterildiği tespit edilmiştir.

CALU-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan timokinin'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için MTT deneyi yapılmıştır. Bu deneyden sonra absorbans ölçümlerden elde edilen hücre proliferasyon grafiği şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Timokinin'in CALU-1 hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik doz etki eğrileri. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak hesaplanmıştır.

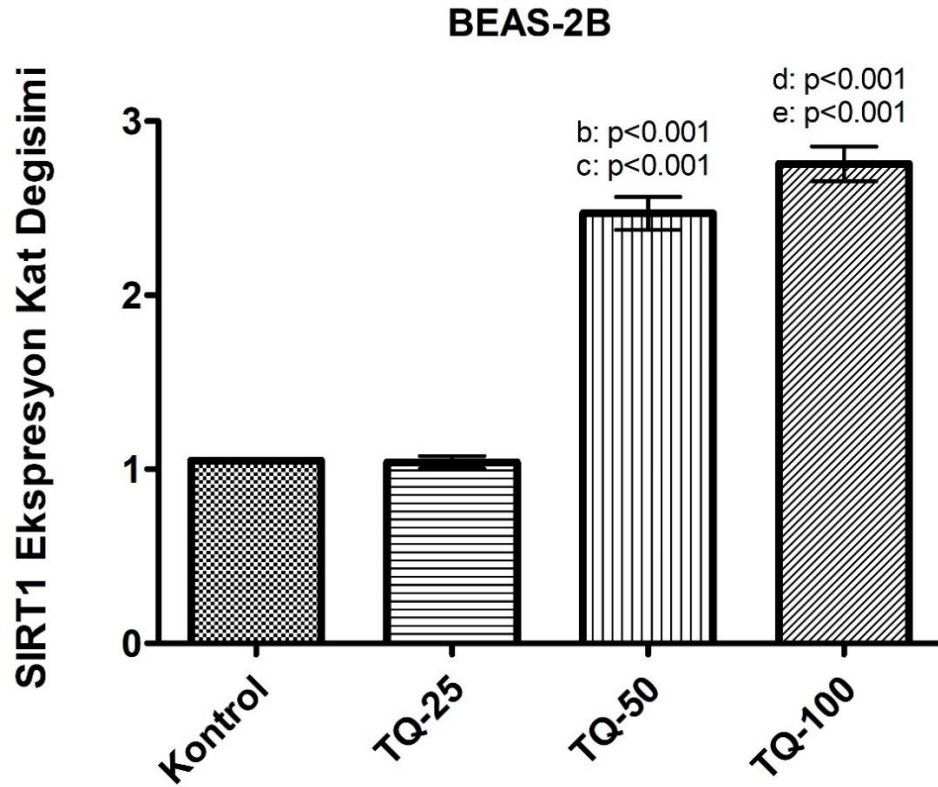
Yapılan bu çalışma sonucu CALU-1 hattı timokinin'in etken maddesi ile 0,25,50,100 ve 200 μ M konsantrasyonda 24 saat muamele edildikten sonra CALU-1 hücre hattının IC₅₀ 59.86 μ M, 48 saat muamele edildikten sonra CALU-1 hücre hattının IC₅₀ 59.37 μ M ve 72 saat muamele edildikten sonra CALU-1 hücre hattının IC₅₀ 18.94 μ M olarak saptanmıştır. (Şekil 4.3) MTT deneyi sonucunda doz miktarlarının en etkin saat 24 saatten sonra etki gösterildiği tespit edilmiştir.

4.2. Timokinin'un BEAS-2B Hücre Hattındaki Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinin sirtüin (1-7) genlerin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. MTT yöntemi ile IC50 dozları belirlenen maddelerin ortalama bir değeri alınarak ilaç konsantrasyonları hazırlandı.

4.2.1. Sirtüin 1 (SIRT 1)

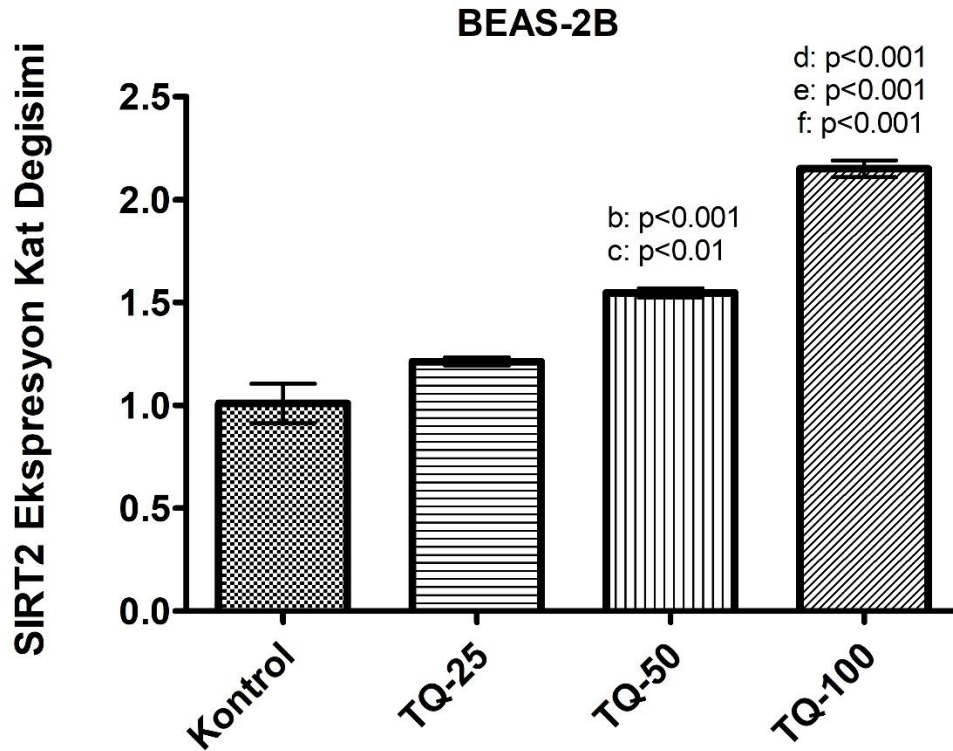
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinin'un sirtüin 1 ifade düzeyi Şekil 4.4'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinin uygulanan sirtüin 1 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 4. Sirtüin 1'in BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-25 ve TQ-50 grubunun; **c:** Kontrol ve TQ-50 grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.2 Sirtüin 2 (SIRT 2)

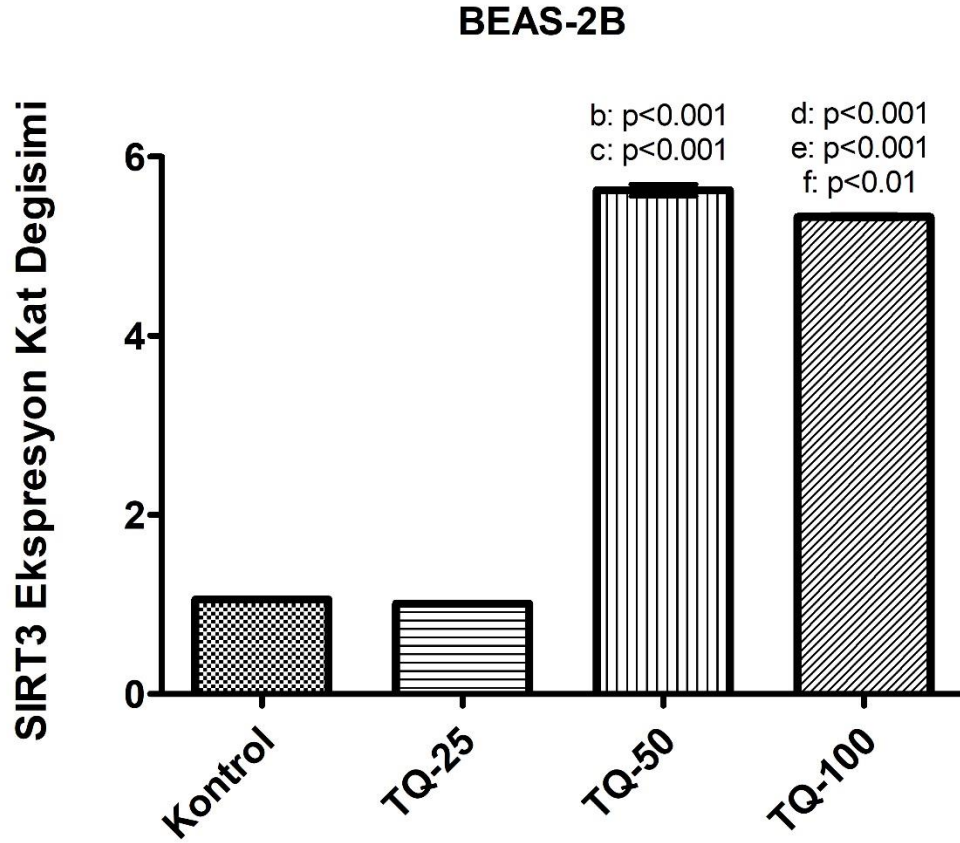
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 2 ifade düzeyi Şekil 4.5'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 2 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5. Sirtüin 2'nin BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.3 Sirtüin 3 (SIRT3)

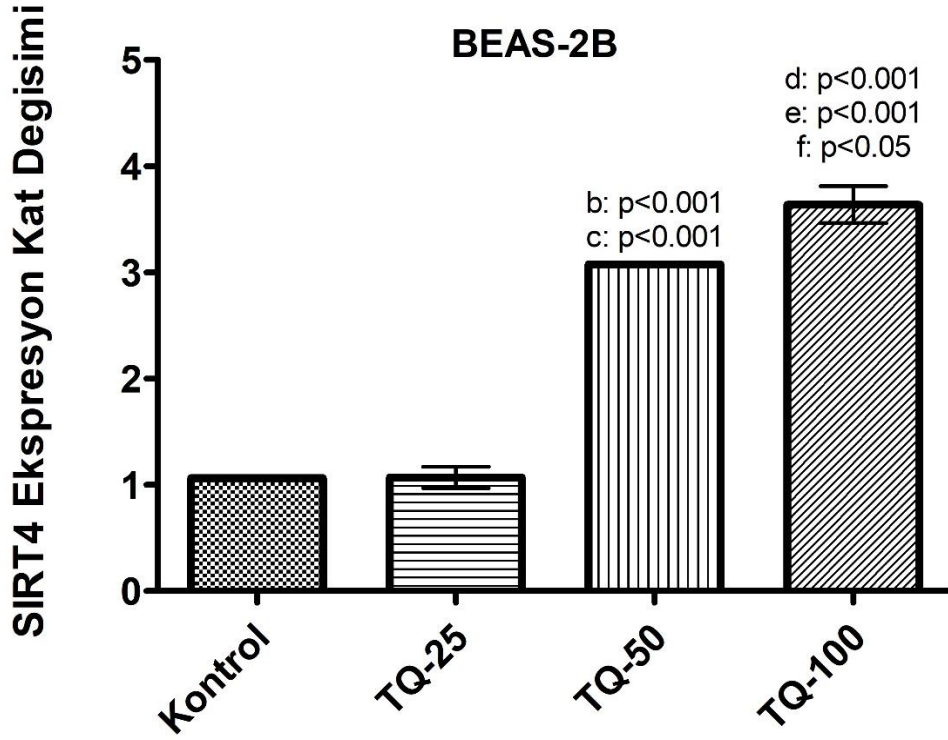
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 3 ifade düzeyi Şekil 4.6'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 3 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 6. Sirtüin 3'ün BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.4. Sirtüin 4 (SIRT4)

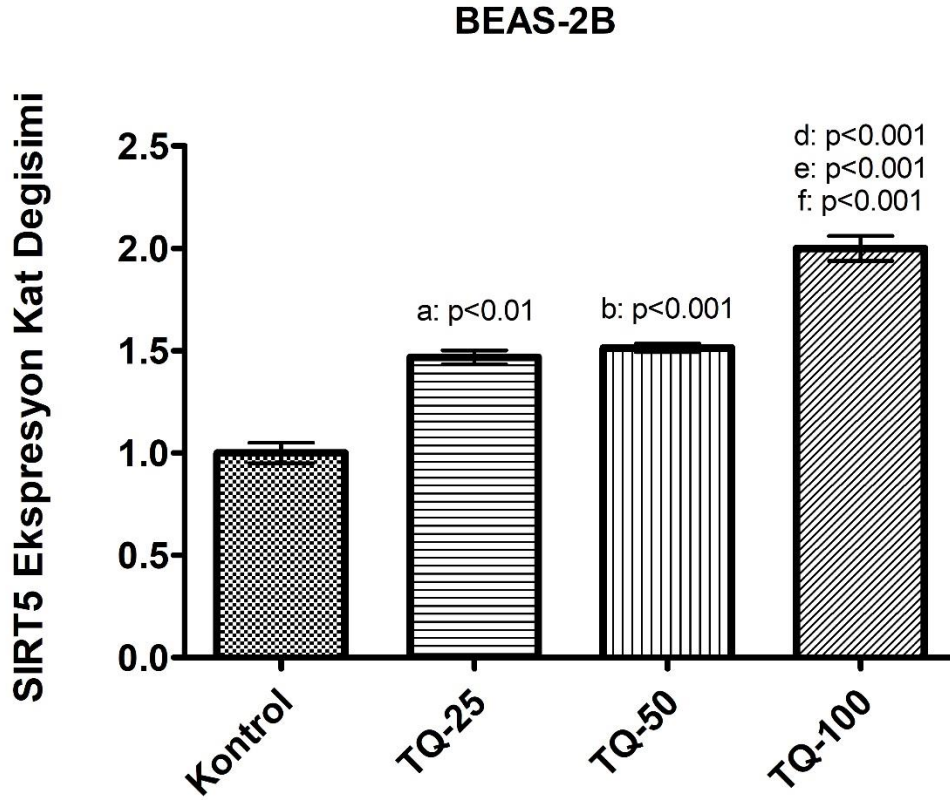
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 4 ifade düzeyi Şekil 4.7'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre: Timokinon uygulanan sirtüin 4 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 7. Sirtüin 4'ün BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.5. Sirtüin 5 (SIRT5)

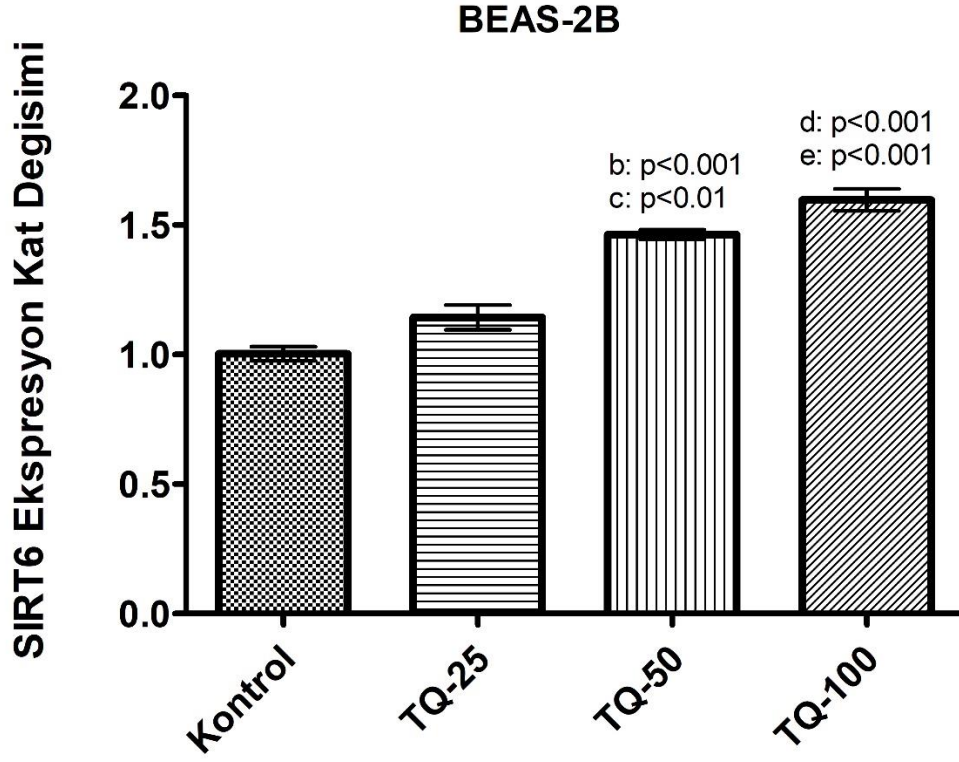
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 5 ifade düzeyi Şekil 4.8'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 5 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 8. Sirtüin 5'in BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; **f:** TQ-100 ve Kontrol grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.6. Sirtüin 6 (SIRT6)

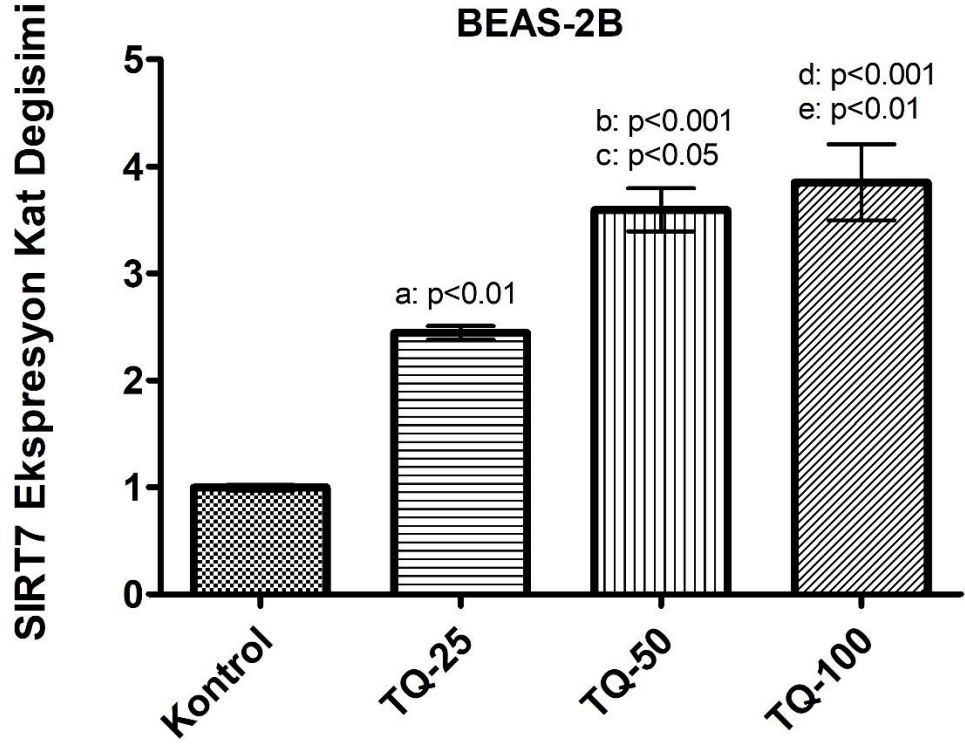
BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 6 ifade düzeyi Şekil 4.9'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 6 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 9. Sirtüin 6'nın BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; istatistiksel karşılaştırılması.

4.2.7. Sirtüin 7 (SIRT7)

BEAS-2B hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 7 ifade düzeyi Şekil 4.10'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 7 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

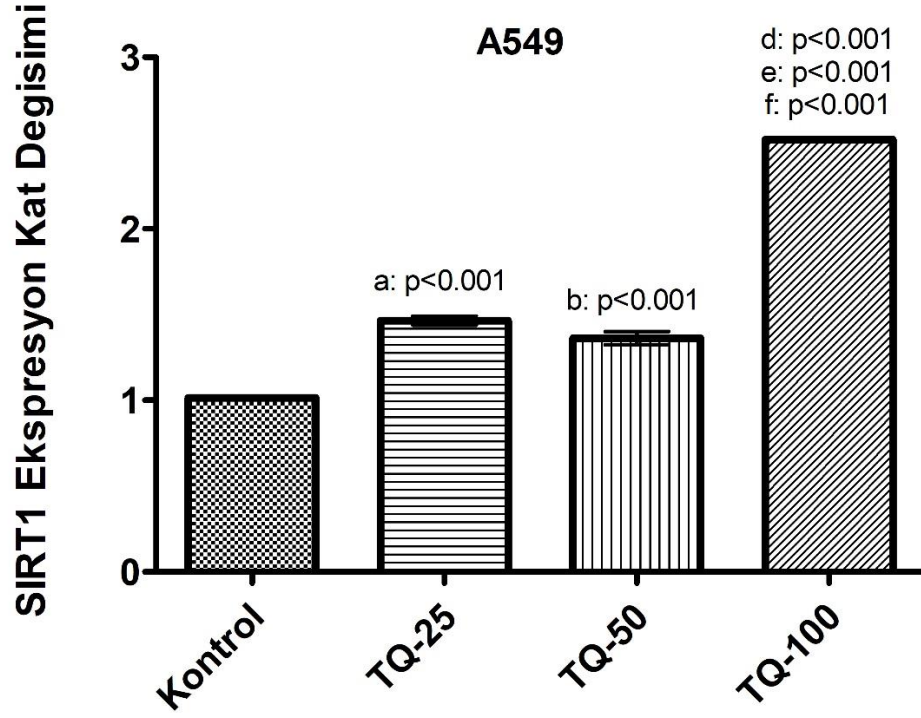


Şekil 4. 10. Sirtüin 7'nin BEAS-2B hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3. Timokinon'un A549 Hücre Hattındaki Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.3.1 Sirtüin 1 (SIRT1)

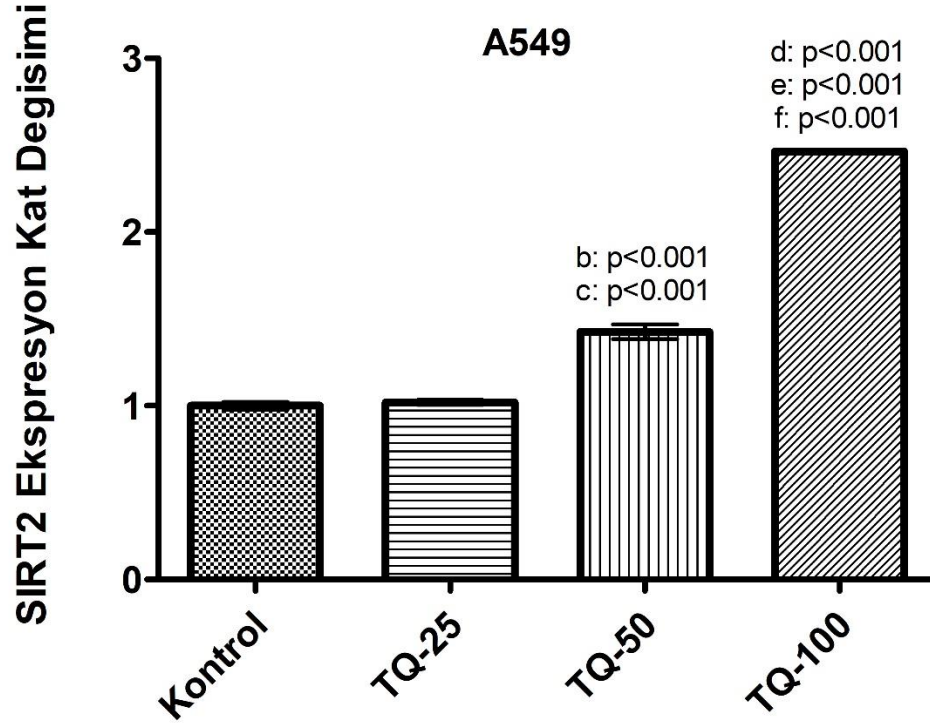
A549 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 1 ifade düzeyi Şekil 4.11'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 1 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 11. Sirtüin 1 A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-25 ve TQ-50 grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.2 Sirtüin 2 (SIRT2)

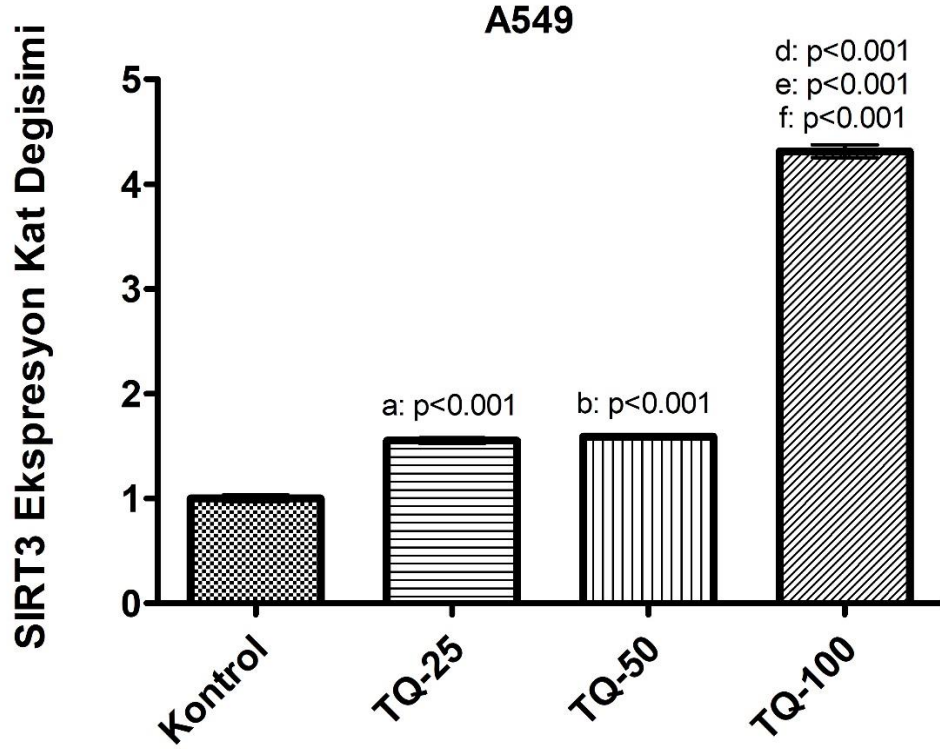
A549 hücre hattına uygulanan timokino'un sirtüin 2 ifade düzeyi Şekil 4.12'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 2 ifade düzeyi doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 12. Sirtüin 2'nin A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.3 Sirtüin 3 (SIRT3)

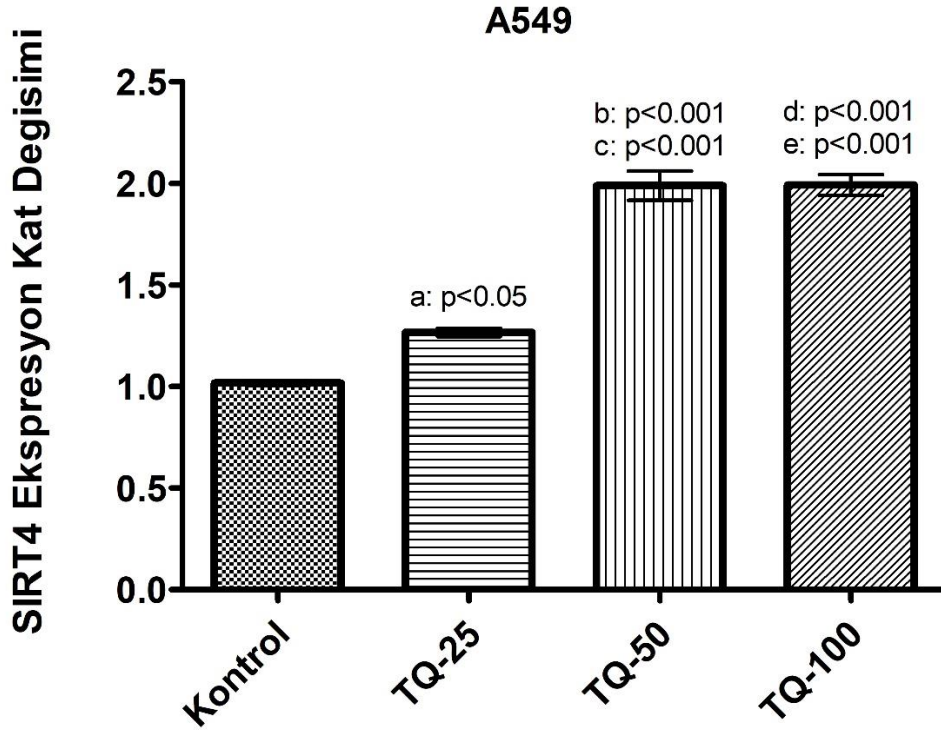
A549 hücre hattına uygulanan timokinin'in sirtüin 3 ifade düzeyi Şekil 4.13'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinin uygulanan sirtüin 3 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 13. Sirtüin 3'ün A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.4 Sirtüin 4 (SIRT4)

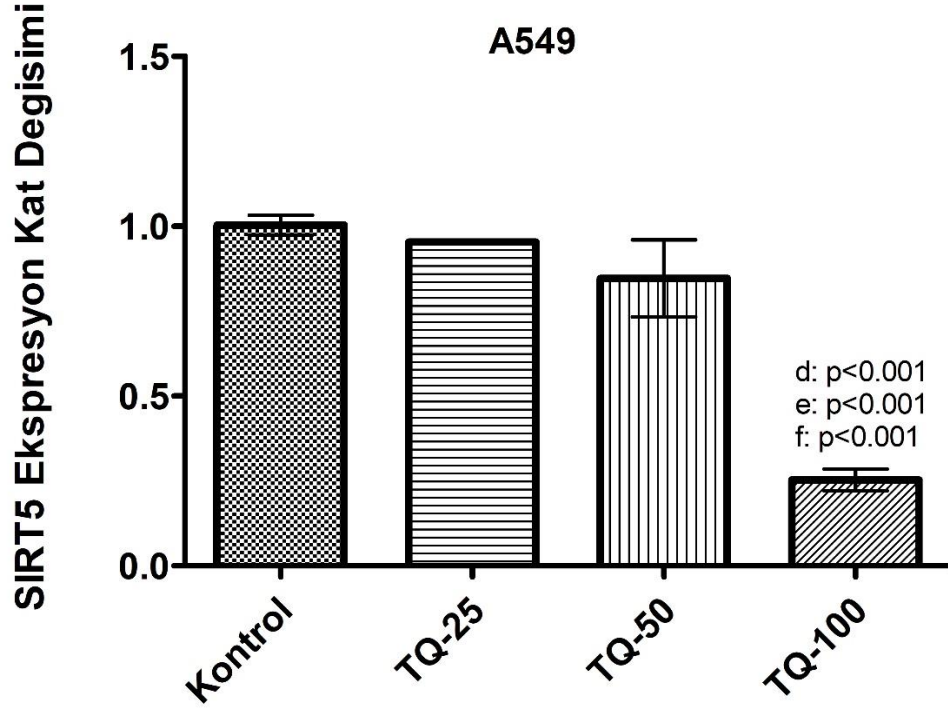
A549 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 4 ifade düzeyi Şekil 4.14'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 4 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 14. Sirtüin 4'ün A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.5. Sirtüin 5 (SIRT5)

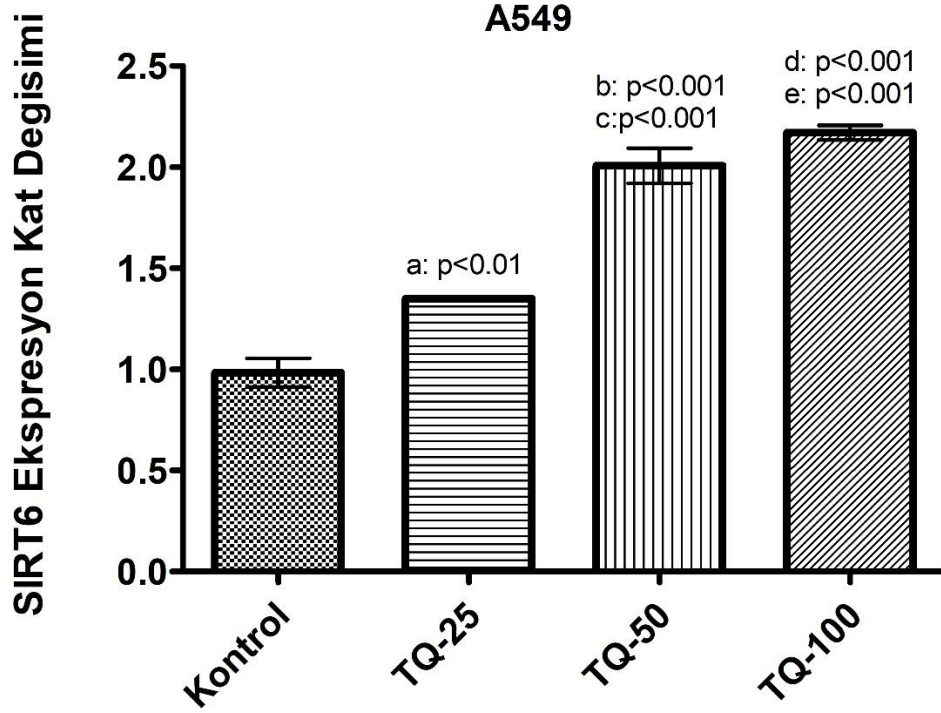
A549 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 5 ifade düzeyi Şekil 4.15'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 5 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak istatistiksel bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 15. Sirtüin 5'in A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; **f:** TQ-100 ve Kontrol grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.6. Sirtüin 6 (SIRT6)

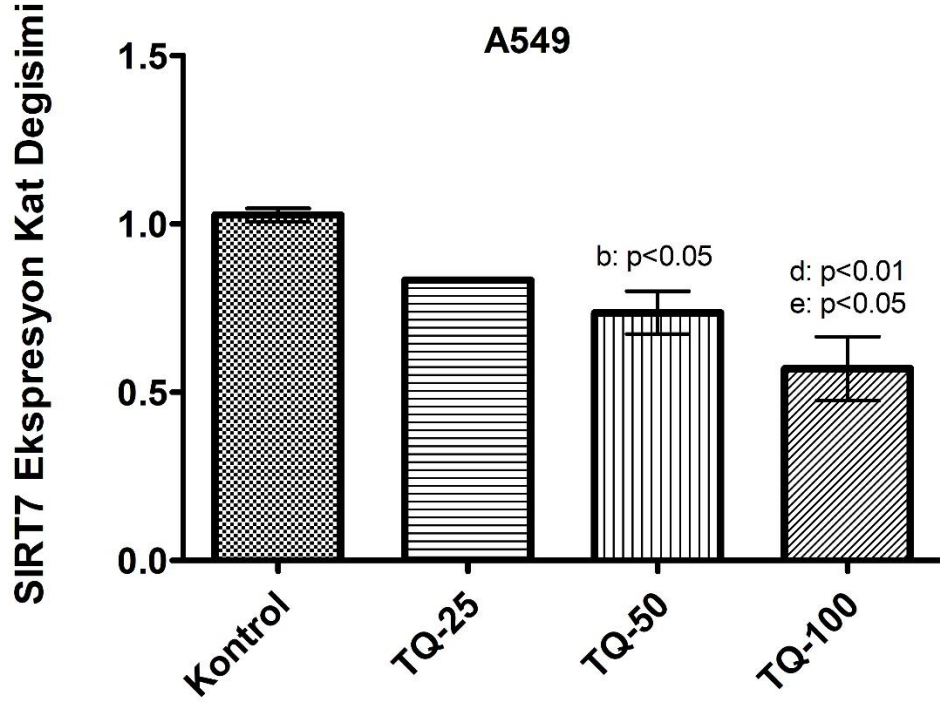
A549 hücre hattına uygulanan timokinin'in sirtüin 6 ifade düzeyi Şekil 4.16'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; ; Timokinin uygulanan sirtüin 6 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 16. Sirtüin 6'nın A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve kontrol grubunun **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.7. Sirtüin 7 (SIRT7)

A549 hücre hattına uygulanan timokinin'in sirtüin 7 ifade düzeyi Şekil 4.17'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; ; Timokinin uygulanan sirtüin 7 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak istatistiksel bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

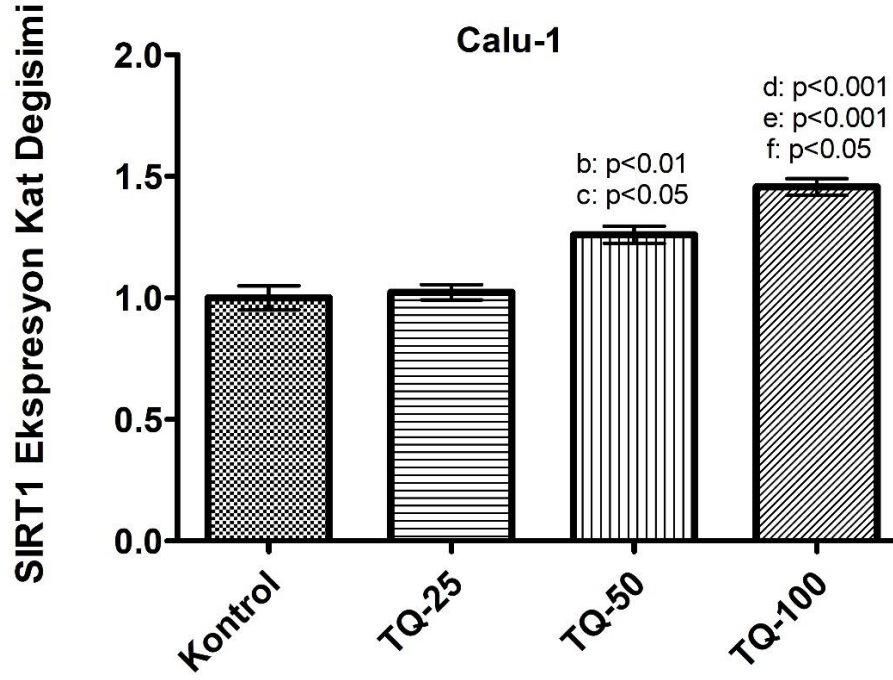


Şekil 4. 17. Sirtüin 7'nin A549 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25; **d:** TQ-100 ve TQ-50; **e:** TQ-100 ve TQ-25; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4. Timokininon'un CALU-1 Hücre Hattındaki Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.4.1 Sirtüin 1 (SIRT1)

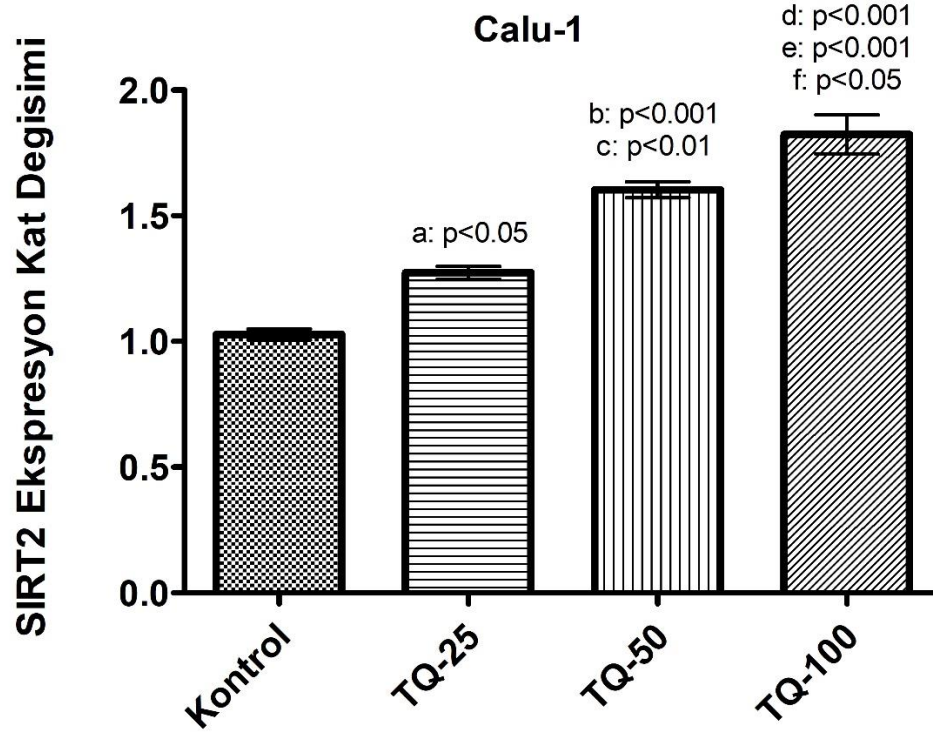
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokininon'un sirtüin 1 ifade düzeyi Şekil 4.18'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokininon uygulanan sirtüin 1 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 18. Sirtüin 1'in CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-25 ve TQ-50 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.2 Sirtüin 2 (SIRT2)

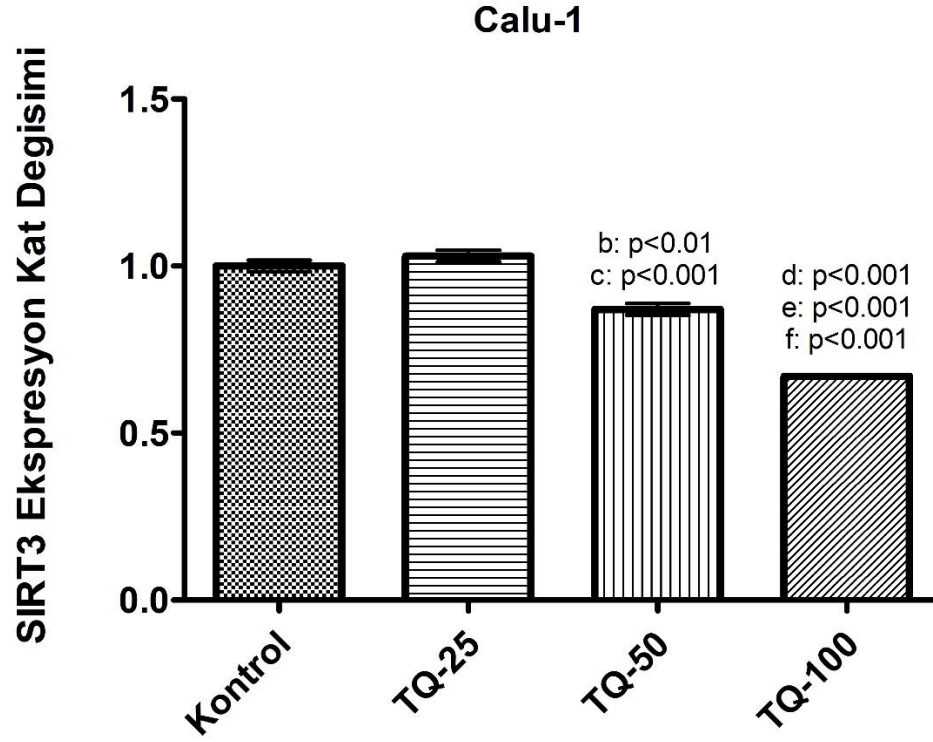
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinin'in sirtüin 2'nin ifade düzeyi Şekil 4.19'da verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinin uygulanan sirtüin 2 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 19. Sirtüin 2'nin CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.3 Sirtüin 3 (SIRT3)

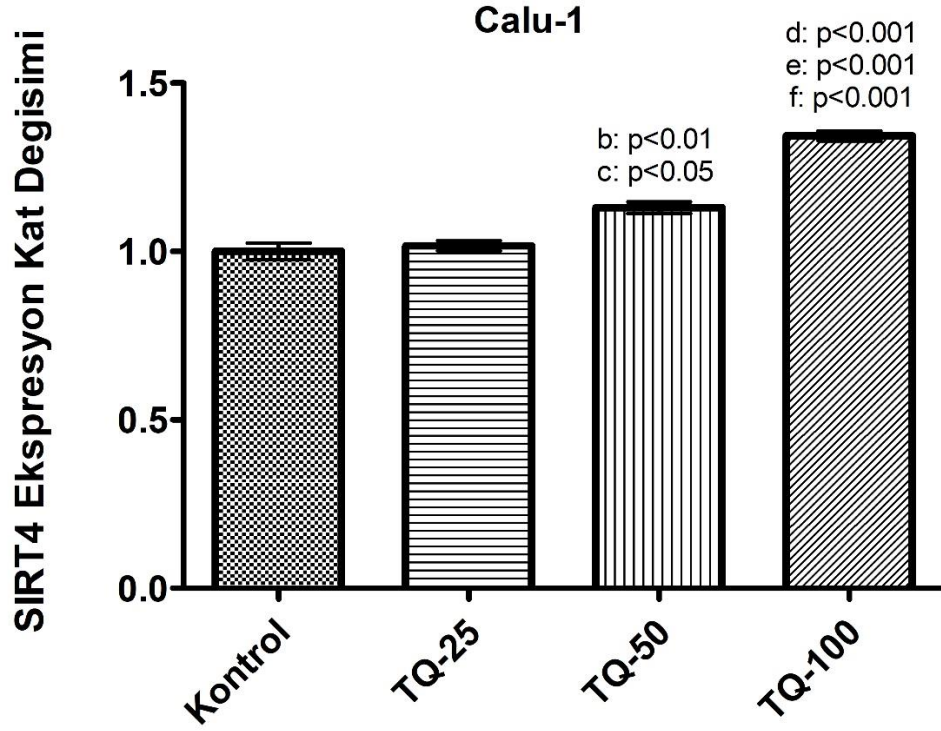
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinin'in sirtüin 3 ifade düzeyi Şekil 4.20'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinin uygulanan sirtüin 3 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak istatistiksel bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 20. Sirtüin 3'ün CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-25 ve TQ-100 grubunun; **f:** Kontrol ve TQ-100 grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.4. Sirtüin 4 (SIRT4)

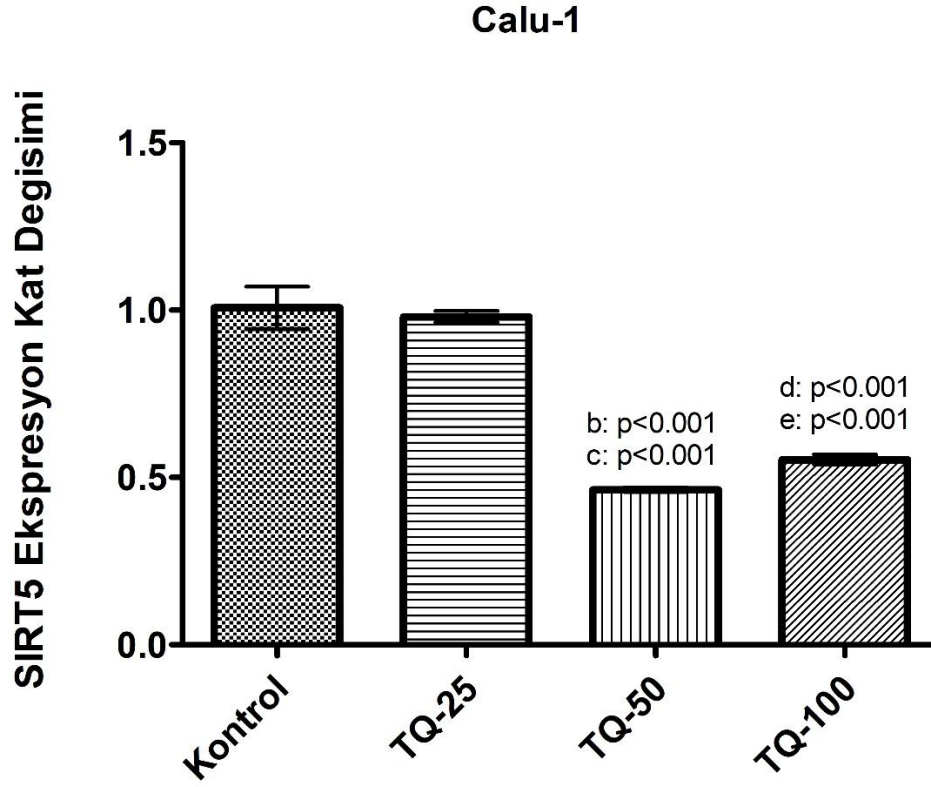
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 4 ifade düzeyi Şekil 4.21'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 4 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 21. Sirtüin 4'ün CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve Kontrol grubunun; **f:** TQ-100 ve kontrol grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.5. Sirtüin 5 (SIRT5)

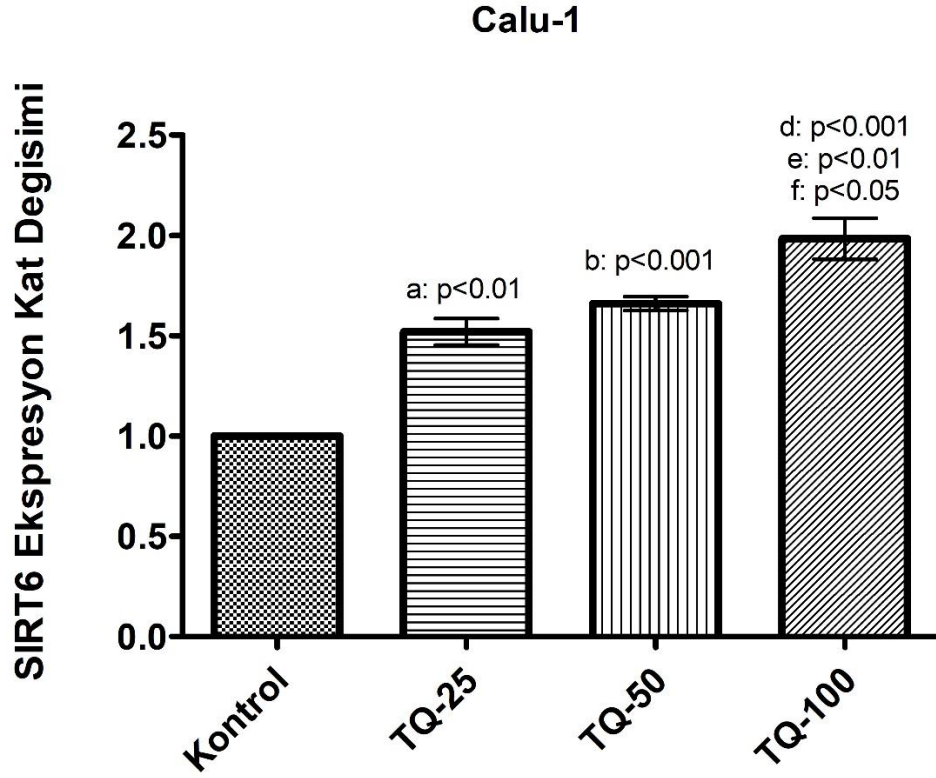
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 5 ifade düzeyi Şekil 4.22'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; ; Timokinon uygulanan sirtüin 5 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak istatistiksel bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Fakat timokinon 25 μ M uygulanan grup kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4. 22. Sirtüin 5'in CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **b:** TQ-50 ve TQ-25; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.6. Sirtüin 6 (SIRT6)

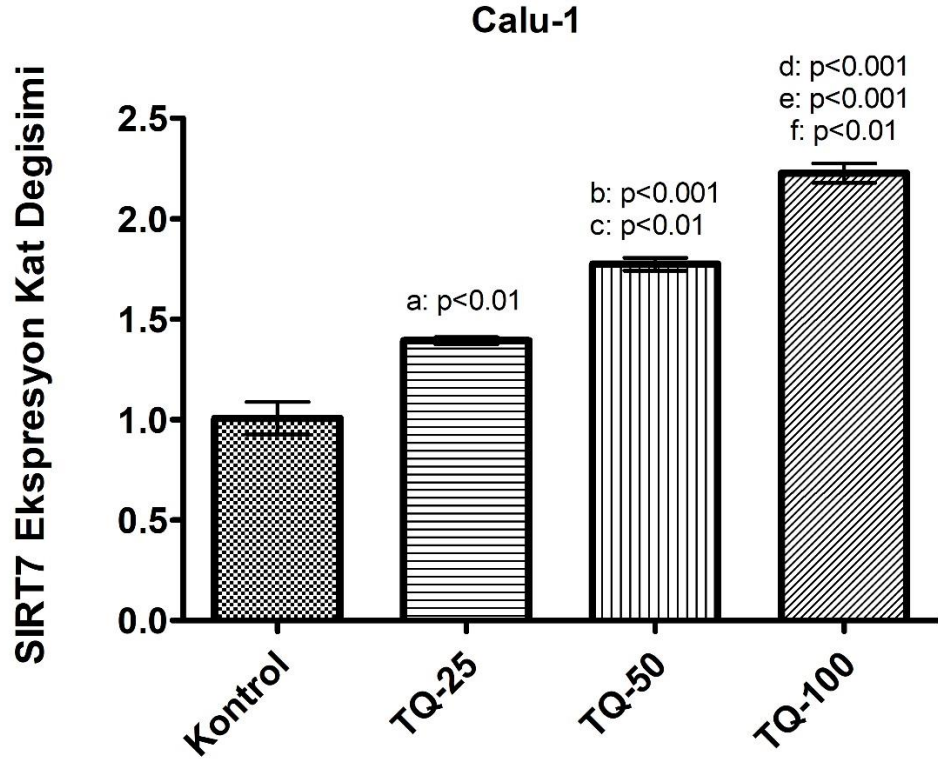
CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 6 ifade düzeyi Şekil 4.23'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 6 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 23. Sirtüin 6'nın CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25; **f:** TQ-100 ve kontrol grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

4.4.7. Sirtüin 7 (SIRT7)

CALU-1 hücre hattına uygulanan timokinon'un sirtüin 7 ifade düzeyi Şekil 4.24'de verilmiştir. Real Time PCR sonuçlarına göre; Timokinon uygulanan sirtüin 7 ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 24. Sirtüin 7'nin CALU-1 hücre hattındaki ifade düzeyi. Veriler $\pm$ SE olarak verilmiştir. **a:** TQ-25 ve Kontrol grubunun; **b:** TQ-50 ve TQ-25 grubunun; **c:** TQ-50 ve Kontrol grubunun; **d:** TQ-100 ve TQ-50 grubunun; **e:** TQ-100 ve TQ-25 grubunun; **f:** TQ-100 ve Kontrol grubunun; istatistiksel karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akciğer kanseri yüksek morbiditeye sahip ve mortalite oranı ile dünyada en çok görülen kanser türlerindendir. Akciğer kanseri dört evreden oluşmaktadır. Evre I veya evre II KHK'nin tedavisi, tümörün cerrahi rezeksiyonudur ve hastalık evre III veya evre IV'e ilerlediğinde tedavi kemoterapi veya radyoterapi ile olur (155). Akciğer kanseri diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür. Dünya genelinde tüm kanser vakalarının yaklaşık %11,4'ünden ve kansere bağlı ölümlerin %18,0'ından sorumlu olduğu açıklanmıştır. Yeterli karar verme kanıtını sağlamak ve prognozu değerlendirmek için geleneksel tanı yöntemlerin yanı sıra genomik ve mikrobiyom gibi yeni ortaya çıkan yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (156). Akciğer kanseri genellikle ileri evreye gelene kadar teşhis edilememektedir. Erken teşhis ve uygun ilaçlar akciğer kanserinin tedavisine yardımcı olabilecektir. Akciğer kanseri hastalarının bireysel olarak en uygun tedavisi için doğru tanı çok önemlidir. Bu nedenle erken tanı için hassas ve spesifik biyobelirteçlerin belirlenmesi gerekmektedir (46).

Doğal bitki türevleri olarak elde edilen kimyasal bileşikler ve bu kimsayal bileşiklerin yapısal analogları kansere, metabolik bozukluklara ve çeşitli hastalıklara karşı güçlü inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Çeşitli doğal bileşikler kanser üzerinde önleyici etkileri olması sebebiyle ilaç keşfi araştırılmalarında ön plana çıkmıştır. Doğal bitki türevlerinin kanser gelişim sürecini değiştirerek ve farklılaşmayı, proliferasyonu ve metastazı modüle ederek kanser üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir (32). Genel olarak çörek otu ve çörek otu tohumu olarak isimlendirilen *Nigella sativa* kullanımının çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmedeki etkisi binlerce yıl öncesine dayanmaktadır ve bu nedenle en çok çalışılan doğal kimyasallardan birisidir. Çalışmalar tohumun ve yağının çok düşük toksisite gösterdiğini, protein, karbohidrat, yağ asitleri ve temel minareller açısından zengin içeriğe sahip olduğunu göstermiştir. Timokinon (TQ) çörek otu yağında en çok bulunan biyoaktif bileşiktir ve kansere karşı çeşitli biyoaktif özellikler gösterdiği açıklanmıştır (157). Timokinonun, yumurtalık, fibrosarkom, prostat, pankreas kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu normal ve sağlıklı hücreler üzerinde hiçbir yan etki göstermeden inhibe ettiği ve aynı zamanda kanser hücreleri üzerindeki biyolojik aktivitesinin çeşitli mekanizmaları açıklanmıştır (158). In vivo çalışmalarda da TQ tedavisinin antitümör aktivitesi ve kanser hücrelerinde oksidatif hasarla ilişkili ve diğer etkileri araştırılmıştır (1).

Çalışmamıza yönelik yaptığımız literatür taramaları sonucunda timokinonun akciğer kanserinde sirtüin gen ifadeleri ve sirtüin tarafından kontrol edilen diğer yollar üzerindeki olası etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda akciğer kanseri hücrelerinde timokinonun 7 farklı sirtüin gen ifadeleri üzerine etkileri araştırılmış ve normal akciğer epitel hücrelerindeki gen ifadeleriyle kanser hücreleri arasındaki farklılıklar incelenmiştir.

Samarghandian ve ark. yaptığı çalışmada farklı TQ dozlarının (100, 50 ve 25 μM) etkileri A549 akciğer kanseri ve MRC-5 hücreleri üzerinde 24, 48 veya 72 saat olarak değerlendirmişlerdir. Hücre canlılığını değerlendirmek için MTT testi kullanmışlardır. TQ'nun A549 kanser hücrelerini zamana ve doza bağlı olarak inhibe ettiğini açıklamışlardır. 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 24 saat süre ile TQ uygulanması A549 kanser hücrelerinde, $> \%60$ 'lık bir hücre canlılık oranını sağladığı açıklanmıştır. Fakat A549 hücrelerinin 25 μM TQ konsantrasyonunda $\%10$ 'a düştüğünü görülmüştür. MRC-5 hücrelerinde TQ'un A549 hücrelerindeki herhangi bir etki gözlenmemiştir (134). Alexander ve ark. TQ'nun fare embriyonik fibroblast (NIH/3T3) ve fare fibroblast diyabetik hücre modeli ve 3T3-L1 hücrelerinde canlılığı üzerine etkisine bakmak için doza ve zamana bağlı olarak MTT testi yapmıştır. TQ ile muamele edilen 3T3 ve 3T3-L1 hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatten sonra IC₅₀ değerleri sırasıyla $3,9 \pm 2,05$, $5,9 \pm 1,88$ ve $4,5 \pm 1,44$ μM olarak bulunmuştur. 3T3-L1 ile kıyaslandığında daha yüksek konsantrasyonda 3T3 üzerinde daha fazla proliferatif etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (159).

Çalışmalarımızda hücre proliferasyon üzerine olan etkileri değerlendirmek ve etkin dozu belirlemek için MTT testi yapıldı. MTT testinde 24, 48 ve 72 saatlik doza bağlı timokinon (TQ) konsantrasyonlarının (0, 25, 50, 100 ve 200 μM) hücre proliferasyonu üzerine etkisine bakıldı. Deney sonucunda BEAS-2B hücre hattında 24. saatte IC₅₀ 31.36 μM , 48. saatte IC₅₀ 30.40 μM ve 72. saatte IC₅₀ 28.68 μM olarak saptandı. A549 hücre hattında 24. saatte IC₅₀ 51.24 μM , 48. saatte IC₅₀ 30.06 μM ve 72. saatte IC₅₀ 40.86 μM olarak saptandı. CALU-1 hücre hattında 24. saatte IC₅₀ 59.86 μM , 48. saatte IC₅₀ 59.35 μM ve 72. saatte IC₅₀ 18.94 μM olarak bulundu. Çalışmamızda MTT deneyleri sonucunda elde edilen IC₅₀ değerlerindeki farklılıklar nedeni ile düşük ve yüksek dozlarını da içerecek şekilde, timokinonun akciğer normal ve kanser hücrelerinde sirtüin

gen ifade düzeylerine etkilerinin incelenmesi amacı ile timokinonun 24 saatlik inkübasyonda 0, 25, 50 ve 100 μM 'lık konsantrasyonları kullanılmıştır.

Ashour ve ark.'nın hepatik steatoz rat modeli oluşturarak timokinonun etkilerini araştırdıkları çalışmada, timokinonun quercetin ile birlikte kullanılmasının SIRT1/p-AMPK aktivasyonunu arttırarak hepatik steatozun kontrol altına alınmasının ve karaciğer yapı ve fonksiyonunun korunmasının sağlandığı bildirilmiştir (160). Cheng ve ark.'nın yaptıkları çalışmada nikotin nikotin asetilkolin reseptörleri aracılığı ile kanserin ilerlemesinde rolü olduğu ve sirtuinlerin bu sinyal yolağında farklı rollere aracılık ettiği belirtilmiştir. Çalışmalar, nikotin/nAChR aksının ve SIRT1/3/5-7'nin kanser ilaç direncine aracılık ettiğini öne sürmüştür. Nikotin/nAChR ve spesifik sirtuinlerin aracılık ettiği sinyalizasyonun engellenmesinin kemoterapinin etkinliğini artırabildiği bildirilmiştir (161). Shin ve ark.'nın yaptıkları çalışmada SIRT1' in protein ve mRNA seviyelerinin $KRAS^{Mut}$ hücre hatlarında normal akciğer epitel hücrelerine ve $KRAS^{Mut}$ negatif ve $EGFR^{Mut}$ pozitif hücre hatlarına kıyasla daha yüksek olduğu açıklanmıştır. Hücre hatlarında SIRT1 ekspresyon analizinin önceki çalışmalarını doğrulamak için SIRT1 protein düzeyi 16. haftada spontan tümörjenez modelinde $Kras^{LA2_WT}$ ve $Kras^{LA2_G12D}$ farelerinin akciğer dokularında immünohistokimyasal boyama tekniği ile değerlendirilmiştir. $Kras^{LA2_G12D}$ farelerinin akciğer tümörlerindeki SIRT1 protein seviyeleri tümöre bitişik normal dokularda ve $Kras^{LA2_WT}$ farelerinin normal kontrol akciğer dokusundakilerden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. $Kras^{LA2_G12D}$ farelerinde akciğer tümörlerinin doğumdan sonra sekiz hafta sonra gelişmeye başladığı açıklanmıştır ve bu farelerdeki tümörler 16. haftaya kadar izlenmiş ve zamana bağlı geliştikleri bulunmuştur fakat $Kras^{LA_WT}$ farelerinde tümörler geliştirilmemiştir. $Kras^{LA2_G12D}$ akciğer tümörlerinde SIRT1 mRNA ekspresyonunun farelerde bulunan ilgili tümöre bitişik dokulara ve $Kras^{LA2_WT}$ fare akciğer dokularına kıyasla 8. ve 16. haftalarda daha yüksek olduğu açıklanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda $KRAS^{Mut}$ un, $KRAS^{Mut}$ akciğer kanseri hücrelerinde SIRT1 mRNA ve protein ekspresyonunun yukarı regüle edildiği ve $KRAS^{Mut}$ ile SIRT1 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu açıklanmıştır (162).

Yu ve ark. yaptığı çalışmada sisplatin tedavisinin A549/CADD hücrelerinde çeşitli sinyal moleküllerinde değişikliğe sebep olduğu açıklanmıştır. Sisplatin tedavisinin ilk olarak p53, p21, AKT ve anti-apoptoz sinyal molekülü Bcl-2 yukarı doğru düzenlenmesine

neden olurken SIRT1, NOX4 ve bölünmüş PARP gibi apoptotik faktörlerinin düzeylerini aşağı doğru düzenlediği görülmüştür. SIRT1 ekspresyonunun azalmasının A549/CADD hücrelerinde p53, p21 ve hücre döngüsüne yönelik etkileri incelendiğinde, SIRT1 yıkılmasının A549 hücrelerinde apoptoz belirteçlerini, -PARP, Bax ve NOX4'ü azalttığı ancak hücre döngüsü faktörü p53'ü artırdığı açıklanmıştır. SIRT1 aşırı ekspresyonunun A549 hücrelerinde hücre döngüsü faktörlerini, p53 ve p21 azalttığı belirtilmiştir (163).

Guangshun ve Zhong'un yaptıkları çalışmada SIRT1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin HBE hücreleri ile kıyaslandığında H1299 ve A549 hücrelerinde yukarı doğru düzenlendiği belirtilmiştir (164). Bizim yaptığımız çalışmada BEAS-2B, A549 ve CALU-1 hücre hatlarına uygulanan timokinon'un sirtuin 1 ifade düzeylerine bakılmıştır. Çalışmamızda önceden hücrelerin MTT deneyi ile IC50'si belirlenen dozu içerecek şekilde timokinonun 5 farklı dozu kullanılıp bu dozlara ait hücrelerden elde edilen mRNA örneklerinde sirtuin ifadelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Timokinonun her 3 hücre dizisinde (BEAS-2B, A549 ve CALU-1) SIRT1 gen ifade düzeylerini doza bağlı olarak arttırdığı görülmüştür.

Li ve ark. yaptıkları çalışmada SIRT2 ekspresyonu bağırsağın farklılaşmış bölgesinde lokalize olmuştur. SIRT2 eksikliği ex vivo ve in vivo olarak ince bağırsak epitelinde proliferasyonu ve farklılaşmayı bozduğu ve kök yapısını değiştirdiği açıklanmıştır. SIRT2 eksikliği olan farelerde bağırsak entorisiti ve goblet hücresi farklılaşmasında azalma gösterdiği ancak Paneth hücre soylarında artışı sağladığı açıklanmıştır. SIRT2 bağırsak homeostazısının korunmasında belirgin bir şekilde rol aldığı belirtilmiştir (165).

Lu ve Wei yaptığı çalışmada miyelim örneklerinden SIRT2 ekspresyonu belirlemek için hastalardan 20 miyelom örneğinden 8 tane normal kemik iliği örneğinden SIRT2 mRNA ekspresyonu belirlemek için RT-qPCR kullanılmıştır ve sonucunda SIRT2 mRNA ekspresyonu miyelomda normal dokular ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı açıklanmıştır. SIRT2 ekspresyonu azalmış miyelom hücrelerinde KLF4 ekspresyon düzeyine bakıldığında miyelom hücrelerine azalan SIRT2 ekspresyonunun KLF4 mRNA ekspresyon seviyesini arttırdığı açıklanmıştır (166). Çalışmamızda, BEAS-2B, A549 ve CALU-1 hücrelerinde timokinonun doza bağlı olarak SIRT2 gen ifade düzeylerini arttırdığı görülmüştür.

Yapılan araştırmada Zhang ve ark. SIRT3 ekspresyonunu hem mRNA hem de protein seviyesinde miR-224 tarafında inhibe edildiği açıklanmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler miR-224'ün SIRT3/AMPK inhibe ettiğini ve SIRT3'ü hedefleyerek mTOR/HIF-1a sinyal yolunu aktive ettiği belirtilmiştir. SIRT3 aşırı ekspresyonu veya HIF-1a inhibisyonunun CAF-CM^{miR-224} tarafından indüklenen A549 hücrelerinin epitel-mezenkimal-dönüşümü (EMT) sınırladığı gözlemlenmiştir. miR-224 seviyesi RT-PCR sonucunda veriler SIRT3 yukarı regülasyonunun daha düşük miR-224 seviyesine yol açtığı gözlemlenmiştir (167).

Biyoinformatik analiz yoluyla akciğer kanseri hastalarının tümör dokularında ve komşu dokularda miR-29b ekspresyonu analiz edilmiştir. Analiz sonucundan miR-29b'nin akciğer kanseri dokularında aşağı regülasyonu tespit edildiği açıklanmıştır. NSCLC hücre hatlarında (A549, Calu-1, Calu-6, HCC827 ve NCI-H-1792) ve normal akciğer hücre hattında (Beas-2B) miR-29b ekspresyonu tespit edilmesi için RT-PCR kullanılmıştır. RT-PCR sonucunda elde edilen verilerden NSCLC hücrelerinde miR-29b'nin ekspresyon seviyesinin normal akciğer hücre hattından daha düşük olduğu açıklanmıştır. Hücre hatları arasında A549 ve NCI-H1792'in en düşük miR-29b ekspresyon seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. miR-29b'nin aşırı ekspresyonunun A549 ve NCI-H' de FEM1B, AKT, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve SIRT3 ekspresyonunu inhibe ettiği açıklanmıştır (168). Çalışmamızda, timokinonun BEAS-2B ve A549 hücrelerinde SIRT3 gen ifade düzeylerini doza bağlı olarak arttırdığı, CALU-1 hücrelerinde ise azalttığı tespit edilmiştir.

SIRT4 ile osteoartrit (AO) arasındaki bağlantıyı belirlemek için hastalardan farklı osteoartrit düzeylerindeki kıkırdak dokuları toplayan Dai ve arkadaşlarının çalışmasında SIRT4 ekspresyonunun hem protein hem de mRNA düzeyinde azalma olduğu açıklanmıştır. SIRT4'n osteoartrit üzerindeki fonksiyonlarını belirlemek için şiddetli grubundaki kondrositler 24 saat SIRT4 ile tedavi edildiği ve şiddetli osteoartrit kondrositler SIRT4 tedavisinden sonraki hafif osteoartrit koşullarına karşılaştırıldığında daha düşük miktarda agrekan ekspresse edildiği açıklanmıştır. Kondrositlerin osteojenik yapıcısı olan kollejen I osteoartrit'in ilerlemesi esnasında daha yüksek doza yöneldiği fakat dış SIRT4 protein uyarıları tarafından baskılandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerden SIRT4 stimlasyonunun osteoartrit ilerlemesine olumlu etki yaptığı ve bu nedenle ECM dengesine ve ossifikasyonun inhibisyonuna katkı

sağladığı açıklanmıştır. Bu nedenle SIRT4'ün osteoartrit gelişimi ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (169). Çalışmamızda, timokinonun her 3 hücre dizisinde (BEAS-2B, A549 ve CALU-1) doza bağlı olarak SIRT4 mRNA düzeylerini kontrol gruplarına göre arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada kordoma tümör dokularında SIRT5'in mRNA ve protein düzeylerinin normal olanlar ile kıyaslandığında arttığı açıklanmıştır. Yapılan çalışmada 26 hasta SIRT5 ekspresyonuna göre yüksek ekspresyon ($n = 13$) ve düşük ekspresyon ($n = 13$) olarak iki grup oluşturulmuştur. Analiz sonucunda SIRT5 düzeyinin yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve tümör boyutundan bağımsız olduğu açıklanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre U-CH1 ve U-CH2 hücrelerindeki SIRT5'in mRNA ve protein düzeyleri HUVEC hücrelerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. SIRT5 susturulması U-CH1 ve U-CH2 hücrelerinde sh-NC grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığını, koloni sayısını ve göçünü azalttığı gözlemlenmiştir. SIRT5 inhibisyonunun HEK-293T hücrelerinde c-myc'nin protein stabilitesini azalttığı açıklanmıştır (170).

Yapılan bir çalışmada SIRT5 mRNA ve protein düzeyleri ilk olarak 34 hastanın eşleştirilmiş granülasyon dokusundan ve bitişik normal dokulardan RT-PCR ve western blotlama yapılmıştır ve bunun sonucunda SIRT5 mRNA ve protein seviyelerinin granülasyon dokuları ve normal dokularla karşılaştırıldığında düşük çıktığı açıklanmıştır. Ölümsüz mide epitel hücrelerinde SIRT5 protein ekspresyonunun bir granülasyon doku hücre çizgilerinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. İmmünohistokimya (IHC) ile toplamda 67 eşleştirilmiş granülasyon dokusu ve bitişik normal doku örneğini içeren doku dizisindeki SIRT5 ekspresyonuna bakıldığında SIRT5 ağırlıklı olarak sitozol pozitif olarak eşleşen normal mide epiteli ile kıyaslandığında granülasyon dokusunun daha az boyandığı tespit edilmiştir. İmmün boyama sonucunda SIRT5 ekspresyonunun granülasyon dokularında önemli bir azalma gösterdiği görülmüştür. SIRT5 hücre döngüsü üzerindeki etkisini tespit etmek için akım sitometrik analizler sonucunda SIRT5 yıkılmasının G1 fazındaki hücrelerin azalmasına ve S fazında artışa neden olduğu açıklanmıştır (171). Çalışmamızda, A549 ve CALU-1 hücrelerinde timokinonun SIRT5 gen ifade düzeylerini doza bağlı olarak azalttığı, bununla birlikte BEAS-2B hücrelerinde ise arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada SIRT6'nın Delta16HER2'ye bağımlı meme karsinogenezini etkileyip etkilemediğini anlamak için Delta16HER2 meme kanseri modelini SIRT6-OE'ye sahip fonksiyonel olarak etkin Sirt6BAC fareleri ile çiftleştirerek Delta16HER2/SIRT6-OE fareleri üretilmiştir. Delta16HER2/SIRT6-OE dişi fareler, Delta16HER2 yavruları ile kıyaslandığında belirgin bir şekilde gecikmiş tümör başlangıcı sergilediği açıklanmıştır. qRT-PCR sonucunda diğer sirtuinlerin ve Delta16HER2'nin ekspresyonunu bozmadan SIRT6'nın Delta16HER2 / SIRT6-OE tümörlerinde aşırı eksprese edildiği tespit edilmiştir. Veriler Delta16HER2/SIRT6-OE farelerinin kontrollere kıyasla daha büyük akciğer metastatik lezyonlara sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Deneyde yapılan birincil hücre kültürleri üzerinde hücre döngüsü analizine bakılmıştır. Akım sitometri analizi için 20 haftalık iken toplanan Delta16HER2 ve Delta16HER2/SIRT6-OE tümörlerinin birbirine benzer hücre döngüsü profili gösterdiği tespit edilmiştir. Deney son haftasında 30 haftalık Delta16HER2 hücrelerinin G2/M fazında durakladığı, Delta16HER2/SIRT6-OE tümör hücrelerinin büyük çoğunluğunun G0/1 fazında tutulduğu gözlenmiştir (172).

Prostat kanserinde SIRT6'nın yüksek düzeyde eksprese edildiği ve sonrasında SIRT6'nın prostat kanserindeki işlevlerinin incelenmesi için siRNA'lar (si-NC ve si-SIRT6) transfeksiyonu kullanılarak fonksiyon kaybı çalışmaları yapılmıştır. Deney sonucunda PC-3 veya DU145 hücrelerinde SIRT6'nın aşırı eksprese edildiği açıklanmıştır. Si-SIRT6'nın transfekte edildikten sonra prostat kanseri hücrelerinin hücresel büyümesinin 72. ve 96. saatlerde belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. SIRT6 susturulmasının prostat kanseri hücrelerinde klonojenik yeteneklerini bastırdığı açıklanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda SIRT6'nın prostat kanserinde yüksek düzeyde eksprese edildiği ve prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını desteklediği tespit edilmiştir. Ayrıca SIRT6 susturulmasının Wnt/ β -katenin aktivitesini baskıladığı açıklanmıştır (173). Çalışmamızda her 3 hücre dizisinde timokininin doza bağlı olarak SIRT6 mRNA düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada SIRT7'nin shRNA aracılı susturulmasının LNCap ve 22Rv1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu, andojen kaynaklı otofajiyi ve bu hücrelerin enjeksiyonu ile indüklenen fare ksenograft tümörlerini inhibe ettiği açıklanmıştır. SIRT7 yokluğunun prostat kanseri hücrelerinin radyasyona duyarlılığını artırdığı görülmüştür. Ayrıca SIRT7 ekspresyonunun androjen reseptörü (AR) ile pozitif ilişkili olduğu açıklanmıştır. Androjen reseptörü sinyal yolunun prostat kanseri hücre çoğalması ve

otofajinin SIRT7 aracılı düzenlenmesine katıldığı bildirilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde SMAD4 proteini düzeyinin yükselmesine neden olan SIRT7 tükenmesinin, androjen kaynaklı sinyal yolunu azalttığı tespit edilmiştir. Deney sonucunda beş prostat kanseri hücre hatlarının (LNCaP, 22Rv1, C4-2b, PC3 ve DU145) tümünde normal prostat epitel hücre hatlarından (RWPE-1 ve BPH-1) daha yüksek SIRT7 protein ekspresyon düzeyleri görülmüştür (174).

NAD⁺ (Nikotinamid adenin dinükleotid) bağımlı histon deasetilaz ailesi üyesi olarak bilinen SIRT7'in, DNA hasarında ve PARP1 aktivitesinin korunmasında önemli bir rolü vardır. SIRT7'nin PARP1 ekspresyonu üzerine etkisini incelemeye yönelik yapılan bir çalışmada ilk önce tümör ve normal dokulardaki SIRT7 mRNA ve protein düzeyleri belirlenmiştir ve PARP1 ekspresyonu ile ilişkisine bakılmıştır. Elde edilen veriler normal dokular ile kıyaslandığında tümör dokularında SIRT7'nin mRNA düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Normal dokulara göre NSCLC dokularında mRNA seviyesinde SIRT7 ve PARP1 arasındaki mRNA seviyelerinde benzer yükselme eğrileri TC ve CC mutant genotiplerinde de gösterilmiştir. SIRT7 protein düzeylerinin normal dokulara kıyasla tümör dokularında arttığı görülmüştür. NSCLC dokularında SIRT7 ve PARP1 protein seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür. In vitro olarak SIRT7'nin aşırı ekspresyonunun PARP1 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği ve SIRT7 ekspresyonunun susturulmasının A549 hücresinde PARP1 ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. SIRT7'nin PARP1'in ekspresyonunu ve enzim aktivitesini baskılamak için doğrudan proteine bağlandığı sonucu elde edilmiştir (175). Bizim çalışmamızda, timokinon uygulanan BEAS-2B ve CALU-1 hücrelerinde, sirtüin 7 gen ifade düzeylerinin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı, A549 hücrelerinde ise azaldığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda;

Timokinonun akciğer normal ve kanser hücreleri üzerine, doza ve zamana bağlı olarak farklı düzeylerde sitotoksik etkiler gösterdiği görülmüştür. Timokinonun sirtüin gen ifade düzeylerine olan etkisinin hücreler arasında farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların olası mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik, sirtüinler ile ilişkili yukarı ve aşağı sinyal yollarının incelenmesini de içeren daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamız akciğer kanseri tedavisinde yeni tanı ve hücre sağkalımını hedef alan tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkı sağlayacak ve akciğer kanseri ile ilişkili ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.

6. KAYNAK

1. Garnique AMB, Rezende-Teixeira P, Machado-Santelli GM. Telomerase inhibitors TMPyP4 and thymoquinone decreased cell proliferation and induced cell death in the non-small cell lung cancer cell line LC-HK2, modifying the pattern of focal adhesion. *Braz J Med Biol Res.* 2023;56:e12897.
2. Romaszko AM, Doboszynska A. Multiple primary lung cancer: A literature review. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(5):725-730.
3. Rzyman W, Mulshine JL. Lung cancer screening moving forward. *Ann Transl Med.* 2016;4(8):149.
4. Wang C, Tan S, Li J, Liu WR, Peng Y, Li W. CircRNAs in lung cancer - Biogenesis, function and clinical implication. *Cancer Lett.* 2020;492:106-115.
5. Saab S, Zalzal H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A, Kadara H. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. *Front Immunol.* 2020;11:159.
6. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2007;75(1):56-63.
7. Watroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* 2016;61(1):52-62.
8. Nakagawa T, Guarente L. Sirtuins at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 6):833-838.
9. Gong J, Wang H, Lou W, Wang G, Tao H, Wen H, Liu Y, Xie Q. Associations of sirtuins with clinicopathological parameters and prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 2018;10:3341-3356.
10. Alves-Fernandes DK, Jasiulionis MG. The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
11. Yang Y, Liu Y, Wang Y, Chao Y, Zhang J, Jia Y, Tie J, Hu D. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Front Immunol.* 2022;13:831168.
12. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1479-1514.
13. Palmeira CM, Teodoro JS, Amorim JA, Steegborn C, Sinclair DA, Rolo AP. Mitohormesis and metabolic health: The interplay between ROS, cAMP and sirtuins. *Free Radic Biol Med.* 2019;141:483-491.
14. Yang M, Peng Y, Liu W, Zhou M, Meng Q, Yuan C. Sirtuin 2 expression suppresses oxidative stress and senescence of nucleus pulposus cells through inhibition of the p53/p21 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(3):616-622.
15. Wu M, Zhang JB, Xiong YW, Zhao YX, Zheng MG, Huang XL, Huang F, Wu XX, Li X, Fan WJ, Hu L, Zeng YY, Cheng XJ, Yue JC, Du JJ, Chen NN, Wei WX, Yao QH, Lu XM, Huang C, Deng J, Chang ZJ, Liu HB, Zhao TC, Chinn YE. Promotion of Lung Cancer Metastasis by SIRT2-Mediated Extracellular Protein Deacetylation. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(3):e2205462.
16. Zhang L, Kim S, Ren X. The Clinical Significance of SIRT2 in Malignancies: A Tumor Suppressor or an Oncogene? *Front Oncol.* 2020;10:1721.
17. Ji Z, Liu GH, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *J Genet Genomics.* 2022;49(4):287-298.
18. Diao Z, Ji Q, Wu Z, Zhang W, Cai Y, Wang Z, Hu J, Liu Z, Wang Q, Bi S, Huang D, Ji Z, Liu GH, Wang S, Song M, Qu J. SIRT3 consolidates heterochromatin and counteracts senescence. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(8):4203-4219.

19. Hu S, Wang S. The Role of SIRT3 in the Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:893678.
20. Du L, Liu X, Ren Y, Li J, Li P, Jiao Q, Meng P, Wang F, Wang Y, Wang YS, Wang C. Loss of SIRT4 promotes the self-renewal of Breast Cancer Stem Cells. *Theranostics*. 2020;10(21):9458-9476.
21. McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, Hirschey MD. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(9):486-492.
22. Tomaselli D, Steegborn C, Mai A, Rotili D. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:474.
23. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, Wagner GR, Thompson JW, Madsen AS, Green MF, Sivley RM, Ilkayeva OR, Stevens RD, Backos DS, Capra JA, Olsen CA, Campbell JE, Muoio DM, Grimsrud PA, Hirschey MD. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell Metab*. 2017;25(4):838-855 e815.
24. Han Y, Zhou S, Coetzee S, Chen A. SIRT4 and Its Roles in Energy and Redox Metabolism in Health, Disease and During Exercise. *Front Physiol*. 2019;10:1006.
25. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, Arcangeli T, Rotili D, Palmerio S, Steegborn C, Nowak T, Schutkowski M, Pellegrini L, Sansone L, Villanova L, Runci A, Pucci B, Morgante E, Fini M, Mai A, Russo MA, Tafani M. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. *Autophagy*. 2015;11(2):253-270.
26. Zhou B, Yang Y, Pang X, Shi J, Jiang T, Zheng X. Quercetin inhibits DNA damage responses to induce apoptosis via SIRT5/PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 2023;165:115071.
27. Rardin MJ, He W, Nishida Y, Newman JC, Carrico C, Danielson SR, Guo A, Gut P, Sahu AK, Li B, Uppala R, Fitch M, Riiff T, Zhu L, Zhou J, Mulhern D, Stevens RD, Ilkayeva OR, Newgard CB, Jacobson MP, Hellerstein M, Goetzman ES, Gibson BW, Verdin E. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab*. 2013;18(6):920-933.
28. Li Y, Jin J, Wang Y. SIRT6 Widely Regulates Aging, Immunity, and Cancer. *Front Oncol*. 2022;12:861334.
29. Lagunas-Rangel FA. SIRT7 in the aging process. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(6):297.
30. Tang M, Li Z, Zhang C, Lu X, Tu B, Cao Z, Li Y, Chen Y, Jiang L, Wang H, Wang L, Wang J, Liu B, Xu X, Wang H, Zhu WG. SIRT7-mediated ATM deacetylation is essential for its deactivation and DNA damage repair. *Sci Adv*. 2019;5(3):eaav1118.
31. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(8):643-661.
32. Khan A, Alsahli MA, Aljasir MA, Maswadeh H, Mobark MA, Azam F, Allemailem KS, Alrumaihi F, Alhumaydhi FA, Alwashmi ASS, Almatroudi AA, Alsugoor MH, Khan MA. Safety, Stability, and Therapeutic Efficacy of Long-Circulating TQ-Incorporated Liposomes: Implication in the Treatment of Lung Cancer. *Pharmaceutics*. 2022;14(1).
33. Mahmoud YK, Abdelrazek HMA. Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomed Pharmacother*. 2019;115:108783.

34. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on Clinical Trials of Black Seed (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone. *J Pharmacopuncture*. 2017;20(3):179-193.
35. Ke X, Zhao Y, Lu X, Wang Z, Liu Y, Ren M, Lu G, Zhang D, Sun Z, Xu Z, Song JH, Cheng Y, Meltzer SJ, He S. TQ inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo via repression of Notch signaling. *Oncotarget*. 2015;6(32):32610-32621.
36. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):515-527.
37. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
38. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(5):363-385.
39. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3855-3864.
40. Moreno P, Mantey SA, Lee SH, Ramos-Alvarez I, Moody TW, Jensen RT. A possible new target in lung-cancer cells: The orphan receptor, bombesin receptor subtype-3. *Peptides*. 2018;101:213-226.
41. Wong-Rolle A, Wei HK, Zhao C, Jin C. Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer. *Protein Cell*. 2021;12(5):426-435.
42. Wang S-S, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cellular & Molecular Immunology*. 2019;16(1):6-18.
43. Alexander M, Lin E, Cheng H. Leptomeningeal Metastases in Non-small Cell Lung Cancer: Optimal Systemic Management in NSCLC With and Without Driver Mutations. *Curr Treat Options Oncol*. 2020;21(9):72.
44. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2017;31(1):13-29.
45. Nanavaty P, Alvarez MS, Alberts WM. Lung cancer screening: advantages, controversies, and applications. *Cancer Control*. 2014;21(1):9-14.
46. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
47. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1563-1579.
48. Bondre MF, Al Qubtan M, Al Harthy SO. Assessing Suitability of a Colorectal Cancer Screening Program in Oman. *Cureus*. 2022.
49. Dubin S, Griffin D. Lung Cancer in Non-Smokers. *Mo Med*. 2020;117(4):375-379.
50. Alduais Y, Zhang H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(8):e32899.
51. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2019;28(10):1563-1579.
52. Li MY, Liu LZ, Dong M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis. *Mol Cancer*. 2021;20(1):22.
53. Maghfoor I, Perry MC. Lung cancer. *Ann Saudi Med*. 2005;25(1):1-12.
54. Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer*. 2002;37(2):153-159.

55. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol.* 2012;3:4.
56. Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretiello E, Hailu GS, Jarho E, Lahtela-Kakkonen M, Mai A, Altucci L. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics.* 2016;8:61.
57. Mostoslavsky R, Esteller M, Vaquero A. At the crossroad of lifespan, calorie restriction, chromatin and disease: meeting on sirtuins. *Cell Cycle.* 2010;9(10):1907-1912.
58. Hamaidi I, Zhang L, Kim N, Wang MH, Iclozan C, Fang B, Liu M, Koomen JM, Berglund AE, Yoder SJ, Yao J, Engelman RW, Creelan BC, Conejo-Garcia JR, Antonia SJ, Mule JJ, Kim S. Sirt2 Inhibition Enhances Metabolic Fitness and Effector Functions of Tumor-Reactive T Cells. *Cell Metab.* 2020;32(3):420-436 e412.
59. Matsushima S, Sadoshima J. The role of sirtuins in cardiac disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(9):H1375-1389.
60. Zheng M, Hu C, Wu M, Chin YE. Emerging role of SIRT2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2021;22(4):731.
61. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:435-465.
62. Almeida M, Porter RM. Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis. *Bone.* 2019;121:284-292.
63. Rada P, Pardo V, Mobasher MA, Garcia-Martinez I, Ruiz L, Gonzalez-Rodriguez A, Sanchez-Ramos C, Muntane J, Alemany S, James LP, Simpson KJ, Monsalve M, Valdecantos MP, Valverde AM. SIRT1 Controls Acetaminophen Hepatotoxicity by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(13):1187-1208.
64. Zhao E, Hou J, Ke X, Abbas MN, Kausar S, Zhang L, Cui H. The Roles of Sirtuin Family Proteins in Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 2019;11(12).
65. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27628-27635.
66. Gillum MP, Kotas ME, Erion DM, Kursawe R, Chatterjee P, Nead KT, Muise ES, Hsiao JJ, Frederick DW, Yonemitsu S, Banks AS, Qiang L, Bhanot S, Olefsky JM, Sears DD, Caprio S, Shulman GI. SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes.* 2011;60(12):3235-3245.
67. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):138-145.
68. Alcain FJ, Villalba JM. Sirtuin inhibitors. *Expert Opin Ther Pat.* 2009;19(3):283-294.
69. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, Oh DY, Lu M, Milne JC, Westphal C, Bandyopadhyay G, Olefsky JM. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E419-428.
70. Xu R, Luo X, Ye X, Li H, Liu H, Du Q, Zhai Q. SIRT1/PGC-1alpha/PPAR-gamma Correlate With Hypoxia-Induced Chemoresistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2021;11:682762.
71. Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol.* 2007;210(1):161-166.

72. Derr RS, van Hoesel AQ, Benard A, Goossens-Beumer IJ, Sajet A, Dekker-Ensink NG, de Kruijf EM, Bastiaannet E, Smit VT, van de Velde CJ, Kuppen PJ. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2014;14:604.
73. North BJ, Verdin E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One*. 2007;2(8):e784.
74. Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin AS, Tainsky MA. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2003;23(9):3173-3185.
75. Chen G, Huang P, Hu C. The role of SIRT2 in cancer: A novel therapeutic target. *Int J Cancer*. 2020;147(12):3297-3304.
76. Jiang W, Wang S, Xiao M, Lin Y, Zhou L, Lei Q, Xiong Y, Guan KL, Zhao S. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol Cell*. 2011;43(1):33-44.
77. Wang F, Tong Q. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. *Mol Biol Cell*. 2009;20(3):801-808.
78. Beirowski B, Gustin J, Armour SM, Yamamoto H, Viader A, North BJ, Michan S, Baloh RH, Golden JP, Schmidt RE, Sinclair DA, Auwerx J, Milbrandt J. Sirt-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(43):E952-961.
79. Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, Chopra V, Hersch SM, Kazantsev AG. The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum Mol Genet*. 2011;20(20):3986-3996.
80. Ji S, Doucette JR, Nazarali AJ. Sirt2 is a novel in vivo downstream target of Nkx2.2 and enhances oligodendroglial cell differentiation. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(6):351-359.
81. Cha Y, Han MJ, Cha HJ, Zoldan J, Burkart A, Jung JH, Jang Y, Kim CH, Jeong HC, Kim BG, Langer R, Kahn CR, Guarente L, Kim KS. Metabolic control of primed human pluripotent stem cell fate and function by the miR-200c-SIRT2 axis. *Nat Cell Biol*. 2017;19(5):445-456.
82. Szego EM, Gerhardt E, Outeiro TF. Sirtuin 2 enhances dopaminergic differentiation via the AKT/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Neurobiol Aging*. 2017;56:7-16.
83. Wang G, Li S, Gilbert J, Gritton HJ, Wang Z, Li Z, Han X, Selkoe DJ, Man HY. Crucial Roles for SIRT2 and AMPA Receptor Acetylation in Synaptic Plasticity and Memory. *Cell Rep*. 2017;20(6):1335-1347.
84. Jing E, Gesta S, Kahn CR. SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab*. 2007;6(2):105-114.
85. Yang W, Guo X, Thein S, Xu F, Sugii S, Baas PW, Radda GK, Han W. Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of alpha-tubulin. *Biochem J*. 2013;449(3):605-612.
86. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(4):243-256.
87. Yang X, Park SH, Chang HC, Shapiro JS, Vassilopoulos A, Sawicki KT, Chen C, Shang M, BurrIDGE PW, Epting CL, Wilsbacher LD, Jenkitkasemwong S,

- Knutson M, Gius D, Ardehali H. Sirtuin 2 regulates cellular iron homeostasis via deacetylation of transcription factor NRF2. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1505-1516.
88. Wang Y, Yang J, Hong T, Chen X, Cui L. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. *Ageing Res Rev*. 2019;55:100961.
 89. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Kudo N, Thelen JN, Ito A, Yoshida M, Denu JM. Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+) Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. *Biochemistry*. 2015;54(19):3037-3050.
 90. Lombard DB, Zwaans BMM. SIRT3: As Simple As It Seems? *Gerontology*. 2014;60(1):56-64.
 91. Zhou W, Hu G, He J, Wang T, Zuo Y, Cao Y, Zheng Q, Tu J, Ma J, Cai R, Chen Y, Fan Q, Dong B, Tan H, Wang Q, Xue W, Cheng J. SENP1-Sirt3 signaling promotes alpha-ketoglutarate production during M2 macrophage polarization. *Cell Rep*. 2022;39(2):110660.
 92. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metabolism*. 2010;12(6):662-667.
 93. Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One*. 2010;5(5):e10486.
 94. Kanfi Y, Shalman R, Peshti V, Pilosof SN, Gozlan YM, Pearson KJ, Lerrer B, Moazed D, Marine JC, de Cabo R, Cohen HY. Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett*. 2008;582(5):543-548.
 95. Li S, Zheng W. Mammalian Sirtuins SIRT4 and SIRT7. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;154:147-168.
 96. Van De Ven RAH, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. *Trends in Molecular Medicine*. 2017;23(4):320-331.
 97. Min Z, Gao J, Yu Y. The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:783.
 98. Fu L, Dong Q, He J, Wang X, Xing J, Wang E, Qiu X, Li Q. SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway. *Oncogene*. 2017;36(19):2724-2736.
 99. Betsinger CN, Cristea IM. Mitochondrial Function, Metabolic Regulation, and Human Disease Viewed through the Prism of Sirtuin 4 (SIRT4) Functions. *J Proteome Res*. 2019;18(5):1929-1938.
 100. Huang G, Zhu G. Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3395-3400.
 101. Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VC, Davies M, Koves TR, Dephore N, Fischer F, Boanca G, Vaitheesvaran B, Lovitch SB, Sharpe AH, Kurland IJ, Steegborn C, Gygi SP, Muoio DM, Ruderman NB, Haigis MC. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*. 2013;50(5):686-698.
 102. Wu T, Liu YH, Fu YC, Liu XM, Zhou XH. Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Clin Lab Sci*. 2014;44(4):410-418.
 103. Frye RA. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(1):273-279.

104. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, Kang Y, Shenk T, Cristea IM. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell*. 2014;159(7):1615-1625.
105. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, Li YH, Wang X, Laurent G, German NJ, Xu X, Li C, Wang RH, Lee J, Csibi A, Cerione R, Blenis J, Clish CB, Kimmelman A, Deng CX, Haigis MC. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*. 2013;23(4):450-463.
106. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282(46):33583-33592.
107. Ho L, Titus AS, Banerjee KK, George S, Lin W, Deota S, Saha AK, Nakamura K, Gut P, Verdin E, Kolthur-Seetharam U. SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(11):835-849.
108. Gertz M, Steegborn C. Using mitochondrial sirtuins as drug targets: disease implications and available compounds. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(15):2871-2896.
109. Sadhukhan S, Liu X, Ryu D, Nelson OD, Stupinski JA, Li Z, Chen W, Zhang S, Weiss RS, Locasale JW, Auwerx J, Lin H. Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(16):4320-4325.
110. Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M, Inagaki N. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(1):73-78.
111. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, Kim J, Woo J, Kim JH, Choi BH, He B, Chen W, Zhang S, Cerione RA, Auwerx J, Hao Q, Lin H. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*. 2011;334(6057):806-809.
112. Chen XF, Tian MX, Sun RQ, Zhang ML, Zhou LS, Jin L, Chen LL, Zhou WJ, Duan KL, Chen YJ, Gao C, Cheng ZL, Wang F, Zhang JY, Sun YP, Yu HX, Zhao YZ, Yang Y, Liu WR, Shi YH, Xiong Y, Guan KL, Ye D. SIRT5 inhibits peroxisomal ACOX1 to prevent oxidative damage and is downregulated in liver cancer. *EMBO Rep*. 2018;19(5).
113. Park J, Chen Y, Tishkoff DX, Peng C, Tan M, Dai L, Xie Z, Zhang Y, Zwaans BM, Skinner ME, Lombard DB, Zhao Y. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*. 2013;50(6):919-930.
114. Lin ZF, Xu HB, Wang JY, Lin Q, Ruan Z, Liu FB, Jin W, Huang HH, Chen X. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(1):191-195.
115. Seto E, Yoshida M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(4):a018713-a018713.
116. Liu G, Chen H, Liu H, Zhang W, Zhou J. Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators. *Med Res Rev*. 2021;41(2):1089-1137.
117. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. 2011;332(6036):1443-1446.

118. Chang AR, Ferrer CM, Mostoslavsky R. SIRT6, a Mammalian Deacetylase with Multitasking Abilities. *Physiological Reviews*. 2020;100(1):145-169.
119. Geng A, Tang H, Huang J, Qian Z, Qin N, Yao Y, Xu Z, Chen H, Lan L, Xie H, Zhang J, Jiang Y, Mao Z. The deacetylase SIRT6 promotes the repair of UV-induced DNA damage by targeting DDB2. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(16):9181-9194.
120. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, Geneva AJ, Morello TD, Seluanov A, Gorbunova V. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nature Communications*. 2014;5(1):5011.
121. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*. 2021;3(10):1290-1301.
122. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013;123(3):966-972.
123. Koo JH, Jang HY, Lee Y, Moon YJ, Bae EJ, Yun SK, Park BH. Myeloid cell-specific sirtuin 6 deficiency delays wound healing in mice by modulating inflammation and macrophage phenotypes. *Exp Mol Med*. 2019;51(4):1-10.
124. Gil R, Barth S, Kanfi Y, Cohen HY. SIRT6 exhibits nucleosome-dependent deacetylase activity. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(18):8537-8545.
125. Jiang H, Zhang X, Lin H. Lysine fatty acylation promotes lysosomal targeting of TNF-alpha. *Sci Rep*. 2016;6:24371.
126. Pillai VB, Samant S, Hund S, Gupta M, Gupta MP. The nuclear sirtuin SIRT6 protects the heart from developing aging-associated myocyte senescence and cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(9):12334-12358.
127. Mahlknecht U, Ho AD, Voelter-Mahlknecht S. Chromosomal organization and fluorescence in situ hybridization of the human Sirtuin 6 gene. *Int J Oncol*. 2006;28(2):447-456.
128. Priyanka A, Solanki V, Parkesh R, Thakur KG. Crystal structure of the N-terminal domain of human SIRT7 reveals a three-helical domain architecture. *Proteins*. 2016;84(10):1558-1563.
129. Kiran S, Chatterjee N, Singh S, Kaul SC, Wadhwa R, Ramakrishna G. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal. *FEBS J*. 2013;280(14):3451-3466.
130. Kida Y, Goligorsky MS. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging. *Can J Cardiol*. 2016;32(5):634-641.
131. Das A, Huang GX, Bonkowski MS, Longchamp A, Li C, Schultz MB, Kim LJ, Osborne B, Joshi S, Lu Y, Trevino-Villarreal JH, Kang MJ, Hung TT, Lee B, Williams EO, Igarashi M, Mitchell JR, Wu LE, Turner N, Arany Z, Guarente L, Sinclair DA. Impairment of an Endothelial NAD(+)-H(2)S Signaling Network Is a Reversible Cause of Vascular Aging. *Cell*. 2018;173(1):74-89 e20.
132. Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, Sarkar FH, Hadi SM. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death Dis*. 2013;4(6):e660.
133. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Samarghandian S. Anti-inflammatory effects of thymoquinone and its protective effects against several diseases. *Biomed Pharmacother*. 2021;138:111492.

134. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10421-10431.
135. Amin B, Hosseinzadeh H. Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta Medica.* 2015;82(01/02):8-16.
136. Khazdair MR, Ghafari S, Sadeghi M. Possible therapeutic effects of *Nigella sativa* and its thymoquinone on COVID-19. *Pharm Biol.* 2021;59(1):696-703.
137. Khan MA, Tania M, Wei C, Mei Z, Fu S, Cheng J, Xu J, Fu J. Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget.* 2015;6(23):19580-19591.
138. Huwait E, Al-Gharawi N, Al-Ghamdi MA, Gari M, Prola A, Natesan Pushparaj P, Kalamegam G. Thymoquinone (TQ) Inhibits Inflammation and Migration of THP-1 Macrophages: Mechanistic Insights into the Prevention of Atherosclerosis Using In-Vitro and In-Silico Analysis. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(4):1740-1753.
139. Salim LZ, Mohan S, Othman R, Abdelwahab SI, Kamalidehghan B, Sheikh BY, Ibrahim MY. Thymoquinone induces mitochondria-mediated apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia in vitro. *Molecules.* 2013;18(9):11219-11240.
140. Chen H, Zhuo C, Zu A, Yuan S, Zhang H, Zhao J, Zheng L. Thymoquinone ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by activating the AMPK signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2022;26(3):855-867.
141. Karaçıl Ermumucu MŞ, Şanlıer N. BLACK CUMIN (*Nigella sativa*) AND ITS ACTIVE COMPONENT OF THYMOQUINONE: EFFECTS ON HEALTH. *Journal of Food and Health Science.* 2017:170-183.
142. ARDEBİLİ SS. BAİCALEİN VE THYMOQUINONE KOMBİNASYONUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI. 2021, İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ, YÜKSEK LİSANS TEZİ, yüksek lisans tezi, 45, <https://acikerisim.istinye.edu.tr/>, (ULUKAYA PDE).
143. Velagapudi R, El-Bakoush A, Lepiarz I, Ogunrinade F, Olajide OA. AMPK and SIRT1 activation contribute to inhibition of neuroinflammation by thymoquinone in BV2 microglia. *Mol Cell Biochem.* 2017;435(1-2):149-162.
144. Negi P, Rathore C, Sharma G, Singh B, Katare OP. Thymoquinone a Potential Therapeutic Molecule from the Plant *Nigella sativa*: Role of Colloidal Carriers in its Effective Delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2018;12(1):3-22.
145. Ashour AE, Abd-Allah AR, Korashy HM, Attia SM, Alzahrani AZ, Saquib Q, Bakheet SA, Abdel-Hamied HE, Jamal S, Rishi AK. 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):85-98.
146. Li F, Rajendran P, Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *Br J Pharmacol.* 2010;161(3):541-554.
147. Ansary J, Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Regolo L, Quinzi D, Gracia Villar S, Garcia Villena E, Tutusaus Pifarre K, Alvarez-Suarez JM, Battino M, Cianciosi D. Nutritional Value and Preventive Role of *Nigella sativa* L. and Its Main Component Thymoquinone in Cancer: An Evidenced-Based Review of Preclinical and Clinical Studies. *Molecules.* 2021;26(8).

148. Dera AA, Rajagopalan P, Al Fayi M, Ahmed I, Chandramoorthy HC. Indirubin-3-monoxime and thymoquinone exhibit synergistic efficacy as therapeutic combination in in-vitro and in-vivo models of Lung cancer. *Arch Pharm Res.* 2020;43(6):655-665.
149. Elgohary S, Elkhodiry AA, Amin NS, Stein U, El Tayebi HM. Thymoquinone: A Tie-Breaker in SARS-CoV2-Infected Cancer Patients? *Cells.* 2021;10(2).
150. Mizuno M, Fukuhara K. Antioxidant and Prooxidant Effects of Thymoquinone and Its Hydroquinone Metabolite. *Biol Pharm Bull.* 2022;45(9):1389-1393.
151. Kundu J, Choi BY, Jeong CH, Kundu JK, Chun KS. 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. *Oncol Rep.* 2014;32(2):821-828.
152. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejjwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(16):7782-7788.
153. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs.* 2004;15(4):389-399.
154. Gomathinayagam R, Ha JH, Jayaraman M, Song YS, Isidoro C, Dhanasekaran DN. Chemopreventive and Anticancer Effects of Thymoquinone: Cellular and Molecular Targets. *J Cancer Prev.* 2020;25(3):136-151.
155. Li Y, Yan B, He S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023;169:115891.
156. Li H, Chen Z, Chen N, Fan Y, Xu Y, Xu X. Applications of lung cancer organoids in precision medicine: from bench to bedside. *Cell Commun Signal.* 2023;21(1):350.
157. Khan A, Alsahli MA, Aljasir MA, Maswadeh H, Mobark MA, Azam F, Allemailem KS, Alrumaihi F, Alhumaydhi FA, Almatroudi AA, AlSuhaymi N, Khan MA. Experimental and Theoretical Insights on Chemopreventive Effect of the Liposomal Thymoquinone Against Benzo[a]pyrene-Induced Lung Cancer in Swiss Albino Mice. *J Inflamm Res.* 2022;15:2263-2280.
158. Alotaibi BS, Hakami MA, Anwar S, Mawkili W, Albaqami A, Hassan MI. Structure-based investigation of pyruvate dehydrogenase kinase-3 inhibitory potential of thymoquinone, targeting lung cancer therapy. *Int J Biol Macromol.* 2024;265(Pt 2):131064.
159. Alexander HR, Syed Alwi SS, Yazan LS, Zakarial Ansar FH, Ong YS. Migration and Proliferation Effects of Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (TQ-NLC) and Thymoquinone (TQ) on In Vitro Wound Healing Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2019;2019:1-14.
160. Ashour H, Rashed LA, Hassanein RTM, Aboulhoda BE, Ebrahim HA, Elsayed MH, Elkordy MA, Abdelwahed OM. Thymoquinone and quercetin protect against hepatic steatosis in association with SIRT1/AMPK stimulation and regulation of autophagy, perilipin-2, and cytosolic lipases. *Arch Physiol Biochem.* 2023;129(1):268-281.
161. Cheng WL, Chen KY, Lee KY, Feng PH, Wu SM. Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer. *J Cancer.* 2020;11(5):1125-1140.
162. Shin DH, Jo JY, Choi M, Kim KH, Bae YK, Kim SS. Oncogenic KRAS mutation confers chemoresistance by upregulating SIRT1 in non-small cell lung cancer. *Exp Mol Med.* 2023;55(10):2220-2237.

163. Yu H, Kim YM, Cho M. Cytoplasm-localized SIRT1 downregulation attenuates apoptosis and cell cycle arrest in cisplatin-resistant lung cancer A549 cells. *Journal of Cancer*. 2020;11(15):4495-4509.
164. Li G, Zhong S. MicroRNA-217 inhibits the proliferation and invasion, and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer cells by targeting sirtuin 1. *Oncol Lett*. 2021;21(5):386.
165. Li C, Zhou Y, Rychahou P, Weiss HL, Lee EY, Perry CL, Barrett TA, Wang Q, Evers BM. SIRT2 Contributes to the Regulation of Intestinal Cell Proliferation and Differentiation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;10(1):43-57.
166. Lu C, Wei J. SIRT2-KLF4 Interactions are Critical for Myeloma Survival and Migration. *Comput Intell Neurosci*. 2022;2022:7356477.
167. Zhang J, Han L, Yu J, Li H, Li Q. miR-224 aggravates cancer-associated fibroblast-induced progression of non-small cell lung cancer by modulating a positive loop of the SIRT3/AMPK/mTOR/HIF-1alpha axis. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(7):10431-10449.
168. Zhang H, Wang R, Deng Q. miR-29b Regulates Lung Cancer Progression by Downregulating FEM1B and Inhibiting the FOXO1/AKT Pathway. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2022;2022:1-14.
169. Dai Y, Liu S, Li J, Li J, Lan Y, Nie H, Zuo Y. SIRT4 suppresses the inflammatory response and oxidative stress in osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2020;12(5):1965-1975.
170. Jiang M, Huang Z, Chen L, Deng T, Liu J, Wu Y. SIRT5 promote malignant advancement of chordoma by regulating the desuccinylation of c-myc. *BMC Cancer*. 2024;24(1).
171. Lua X, PY, XZ, MJ, SH, YO, LZ, JW. OGDH mediates the inhibition of SIRT5 on cell proliferation and migration of gastric cancer. *Experimental Cell Research*. 2019;382:12.
172. Andreani C, Bartolacci C, Persico G, Casciaro F, Amatori S, Fanelli M, Giorgio M, Galie M, Tomassoni D, Wang J, Zhang X, Bick G, Coppari R, Marchini C, Amici A. SIRT6 promotes metastasis and relapse in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep*. 2023;13(1):22000.
173. Zhang X, Chen R, Song LD, Zhu LF, Zhan JF. SIRT6 Promotes the Progression of Prostate Cancer via Regulating the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *J Oncol*. 2022;2022:2174758.
174. Ding M, Jiang CY, Zhang Y, Zhao J, Han BM, Xia SJ. SIRT7 depletion inhibits cell proliferation and androgen-induced autophagy by suppressing the AR signaling in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):28.
175. Wang Y, Xia XB, Tang HZ, Cai JR, Shi XK, Ji HX, Yan XN, Xu T. Association of T2285C polymorphism in *PARP1* gene coding region with its expression, activity and NSCLC risk along with prognosis. *Mutagenesis*. 2021;36(4):281-293.

6. ÖZGEÇMİŞ

Şahadet YEL, İlköğretim öğrenimini Yakaköy ilköğretim okulunda tamamlamıştır. Ortaöğretimi Gercüş Yatılı İlköğretim Bölge okulunda okumuştur. Lise öğrenimini Batman Atatürk Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. Lisans öğrenimini 2015-2019 yılları arasında Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde tamamlamıştır. 2021 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümünde yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

