

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİGELLA SATIVANIN RATLARDA DENEYSEL
KARBONTETRAKLORÜR HEPATOTOKSİSİTESİ
MODELİNDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan EVLİYAĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİGELLA SATIVANIN RATLARDA DENEYSEL
KARBONTETRAKLORÜR HEPATOTOKSİSİTESİ
MODELİNDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan EVLİYAĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Nurcan EVLİYAĞLU tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV
Selçuk Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Selçuk Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Mehmet Necmettin Erbakan Üniversitesi

Üye:

Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu 2012-090 sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu projeyi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının her aşamasında maddi ve manevi katkıda bulunan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e;

Tez çalışmam sırasında gerekli yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri ile destek olan hocalarım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye, Doç. Dr. Aysel KIYICI'ya, Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU'na ve Uzm. Dr. Abdullah SİVRİKAYA'ya; İmmünohistokimya çalışmalarında bilgi ve ekip desteği için Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Pınar KARABAĞLI'ya; DNA izolasyonu çalışmalarındaki yardımları için Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a; tezimin deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen tüm asistan ve laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca bana her aşamada destek olan aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Nurcan EVLİYAOĞLU

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
RESİMLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1. 1. Karaciğer	3
1. 1. 1. Karaciğerin Anatomisi	3
1. 1. 2. Karaciğerin Histolojisi	4
1. 1. 2. 1. Karaciğer Hücre Yapısı.....	6
1. 1. 3. Karaciğerin Fizyolojisi.....	8
1. 1. 4. Karaciğerin Fonksiyonları.....	8
1. 1. 4. 1. Metabolik Fonksiyonları	8
1. 1. 4. 2. Safra Salgılanması.....	9
1. 1. 4. 3. Detoksifikasyon ve İnaktivasyon Fonksiyonu	9
1. 1. 4. 4. Karaciğerin Diğer Önemli Fonksiyonları.....	9
1. 5. Karaciğer Hasarı ve Mekanizması	10
1. 5. 1. Hücre İçi İyon Dengesinin Bozulması	10
1. 5. 2. Safra Kanaliküler Hasarı	10
1. 5. 3. Apoptozun Tetiklenmesi	10
1. 5. 4. İmmün Mekanizma	10
1. 5. 5. Mitokondriyal Disfonksiyon	10
1. 2. Karbontetraklorür	11
1. 3. Serbest Radikaller	12
1. 3. 1. Reaktif Oksijen Türleri	13
1. 3. 2. Reaktif Azot Türleri	13
1. 3. 3. Serbest Radikallerin Kaynakları	14
1. 3. 4. Süperoksit Radikali $O_2^{\bullet-}$	14
1. 3. 5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	15
1. 3. 6. Hidroksil Radikali (OH^{\bullet})	15
1. 3. 7. Singlet Oksijen (O_2)	15

1. 3. 8. Nitrik Oksit (NO)	16
1. 3. 8. 1. Nitrik Oksitin Biyosentezi ve Nitrik Oksit Sentazlar.....	16
1. 4. Serbest Radikallerin Etkileri	19
1. 4. 1. Lipitler Üzerine Etkileri	19
1. 4. 2. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	20
1. 4. 3. Proteinler Üzerine Etkileri	21
1. 4. 3. 1. 3-Nitrotirozin (3-NT)	23
1. 4. 4. DNA Üzerine Etkileri	24
1. 4. 4. 1. DNA Hasarı ve Oluşum Mekanizması.....	24
1. 4. 4. 2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	26
1. 4. 4. 3. DNA Hasrına Verilen Yanıtlar.....	27
1. 5. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)	28
1. 5. 1. Apoptozun Morfolojisi.....	28
1. 5. 2. Kaspazlar.....	29
1. 5. 3. Apoptozun Mekanizması	30
1. 6. Antioksidanlar	33
1. 7. Nigella sativa (Çörek otu)	35
1. 7. 1. Nigella sativanın Kimyasal İçeriği.....	37
1. 7. 2. Nigella sativanın Etkileri	39
1. 7. 2. 1. Solunum Sistemine Etkisi	39
1. 7. 2. 2. Kardiyovasküler Sisteme Etkisi	39
1. 7. 2. 3. Üriner Sisteme Etkisi	39
1. 7. 2. 4. Gastrointestinal Sisteme Etkisi	40
1. 7. 2. 5. Santral Sinir Sisteme etkisi	40
1. 7. 2. 6. Anti-Diyabetik Etkisi	40
1. 7. 2. 7. İmmün Sisteme Etkisi	41
1. 7. 2. 8. Anti-İnflamatuar Etkileri.....	41
1. 7. 2. 9. Antiülser Etkisi.....	41
1. 7. 2. 10. Anti-Mikrobiyal Etkileri	42
1. 7. 2. 11. Antikoagulan Etkisi.....	42
1. 7. 2. 12. Antioksidan Savunma Sistemine Etkisi	42
1. 7. 2. 13. Anti-Histaminik Etkisi	43
1. 7. 2. 14. Anti-Tümör Etkisi	43
1. 7. 2. 15. Toksik Etkisi	43

2. GEREÇ VE YÖNTEM	44
2. 1. Deney Hayvanları.....	44
2. 2. Karaciğer Hasarı Oluşturulması.....	44
2. 3. Kullanılan Cihazlar	45
2. 4. Kullanılan Kimyasallar	46
2. 5. Biyokimyasal Analizler.....	47
2. 5. 1. Karaciğer fonksiyon testleri	47
2. 5. 2. Karaciğer Dokusunda 8-OHdG Ölçümü.....	47
2. 5. 3. Karaciğer Dokusunda 3-NT Ölçümü	48
2. 5. 3. 1. Karaciğer Dokularının Hazırlanması	48
2. 5. 3. 2. Dokularda 3-NT miktar hesabı.....	48
2. 5. 3. 3. Kullanılan Reaktifler	48
2. 5. 3. 4. HPLC Sistemi	49
2. 5. 3. 5. 3-Nitrotirozin Standart Ölçümleri ve Grafiği.....	50
2. 5. 4. Serumda M30 Ölçümü	52
2. 6. Karaciğer Dokularında Apoptotik Hücrelerin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	52
2. 7. İstatistiksel Analiz.....	53
3. BULGULAR	54
3. 1. Karaciğer Dokusu Morfolojik Bulguları.....	54
3. 2. AST, ALT ve LDH Sonuçları	55
3. 3. 3-Nitrotirozin Sonuçları	57
3. 4. 8-OHdG Sonuçları	58
3. 5. M30 Sonuçları.....	59
3. 6. Kaspaz 3 Sonuçları.....	60
3. 7. Kaspaz 9 Sonuçları.....	61
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
6. ÖZET.....	72
7. SUMMARY	73
8. KAYNAKLAR	74
9. EKLER.....	86
10. ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	Apopitoz Uyarıcı Faktör
ALT	Alanin aminotransferaz
Apaf – 1	Apopitotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiopterin
C	Sitozin
CAD	Caspase-Activated DNAaz
CCl ₃	Triklorometil
CCl ₃ OO	Triklorometilperoksi
CCl ₄	Karbontetraklorür
CK-18	Sitokeratin-18
cNOS	Yapısal NOS
CYP	Sitokrom
DNA	Deoksiribonükleik asit
eNOS	Endotelyal NOS
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Fas	Hücre Ölüm Reseptörü
FasL	Hücre Ölüm Reseptörü Ligandı
FMN	Flavin Mononükleotid
G	Guanin
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon Proksidaz
GSSG	Glutatyon (yükseltgenmiş)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IAP	Apopitoz İnhibitörü
iNOS	Uyarılabilir NOS
KMnO ₄	Potasyum Permanganat
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

nDNA	Nükleus DNA
nNOs	Nöronal NOS
NO	Nitrik Oksit
NO ₂	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NSY	Nigella sativa yağı
O ₂	Singlet Oksijen
O ₂ • ⁻	Süperoksit Radikali
OH•	Hidroksil Radikali
ONOO-	Peroksinitrit
OsO ₄	Osmiyum Tetraoksit
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
SOD	Süperoksit Dismutaz
TNFR-1	Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü-1
3-NT	3-Nitrotirozin

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1. Biyolojik Önemi Olan Oksijen Türleri	13
Çizelge 1. 2. Reaktif ve Nonreaktif Azot Türleri.....	13
Çizelge 1. 3. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	32
Çizelge 1. 4. Nigella sativa L. Yağ Asidi İçeriği	38
Çizelge 1. 5. Nigella sativa L. Eser Element Düzeyleri.....	38
Çizelge 1. 6. Nigella sativa L. Vitamin Değerleri.....	38
Çizelge 2. 1. 3-NT tayininde kullanılan HPLC sistem parametreleri.....	49
Çizelge 3. 1 AST, ALT ve LDH Sonuçları ve İstatistik.....	56
Çizelge 3. 2. 3-Nitrotirozin Sonuçları ve İstatistik	57
Çizelge 3. 3. 8-OHdG Sonuçları ve İstatistik	58
Çizelge 3. 4. M30 Sonuçları ve İstatistik	59
Çizelge 3. 5.Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Apoptotik indeksi ve istatistik	62

RESİMLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. 1. Karaciğer Anteriör Görünümü.....	3
Şekil 1. 2. Karaciğerde Lobül Yapısı.....	5
Şekil 1. 3. Nitrik Oksitin Sentezi	17
Şekil 1. 4. Lipit Peroksidasyonu	20
Şekil 1. 5. Tirozinin Peroksinitrit Tarafından Nitrasyonu.....	23
Şekil 1. 6. Modifiye Baz Yapıları	25
Şekil 1. 7. 8-OHdG'nin Oluşumu	26
Şekil 1. 8. Apoptoz Mekanizması	31
Şekil 1. 9. Nigella Sativa Yağının Temel Bileşenleri	37
Şekil 2. 1. 3-NT 1,25 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı	50
Şekil 2. 2. 3-NT 2,5 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı	50
Şekil 2. 3. 3-NT 5 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı	51
Şekil 2. 4. 3-NT 10 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı	51
Şekil 2. 5. 3-NT Standart eğrisi.....	52
Şekil 3. 1. Ratlardan alınan karaciğer dokuları	54
Şekil 3. 2. Kontrol ve deney gruplarının serum AST değerleri	54
Şekil 3. 3. Kontrol ve deney gruplarının serum ALT değerleri	54
Şekil 3. 4. Kontrol ve deney gruplarının serum LDH değerleri.....	55
Şekil 3. 5. Kontrol ve deney gruplarının 3-Nitrotirozin (3-NT) değerleri	57
Şekil 3. 6. Kontrol ve deney gruplarının 8 OHdG değerleri	58
Şekil 3. 7. Kontrol ve deney gruplarının M30 değerleri	59
Şekil 3. 8. Kaspaz 3 aktivitesi sonuçları	60
Şekil 3. 9. Kaspaz 9 aktivitesi sonuçları	61
Resim 1. 1. Nigella Sativa Çiçeği ve Tohumu	35
Resim 1. 2. Nigella Sativa, Nigella Damascena ve Nigella Arvensis.....	36

1. GİRİŞ

Karaciğer çeşitli anatomik yapılardan oluşmuş organizmadaki en büyük ve en önemli metabolik organdır. Karaciğer, anatomik yerleşimi, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeni ile toksik maddelere ve çeşitli ilaçlara çok sık maruz kalmaktadır.

Karaciğerde hasar dahil çeşitli patolojik tablolara yol açan 100'lerce maddeden biri de karbontetraklorür (CCl₄)'dür. Bu hasarın değişik şekillerinin, oksidatif stres ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikallerle oluştuğu bilinmektedir. Toksik oksijen ve hidroksil radikallerinin lipid peroksidasyonu ve başka yollarla hepatosit membranlarını hasarlayabilecekleri *in vivo/in vitro* ortamlarda deneysel olarak gösterilmiştir (Erdoğan ve ark. 2004).

Serbest radikal üretiminin artması ile antioksidan kapasitenin bu duruma yanıt vermesinin yetersiz kaldığı durumlarda, oluşan stres hücrede proteinlerin, DNA'nın ve lipidlerin doğrudan hasara uğramasına sebep olur. Böylece hücrelerde fonksiyon bozuklukları meydana gelir.

Oksidatif DNA hasar belirteci olarak sıklıkla baz hasarlarının analizi yapılmaktadır. Cu⁺² iyonlarının DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunması nedeniyle oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu sebeple en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OHdG'dir ve oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul edilmektedir (Burçak ve Andican 2004, Eken 2012).

Proteinler, hücrede reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından saldırı için ana hedeflerdendir. ROT çeşitleri arasında hidroksil radikali (OH[·]) alkoksil radikali (RO[·]) ve nitrojen reaktif radikalleri ağırlıklı olarak protein hasarına yol açarlar. Protein oksidasyon ürünleri sıklıkla aldehitler, keto bileşikler ve karbonillerdir. Kolay saptanabilen majör ürünlerden biri olan 3-nitrotirozin, protein oksidatif hasarı için iyi bir biyobelirteç olarak kabul görmektedir (Kohen ve Nyska 2002).

Apoptoz; gelişim, dokularda hücre populasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immün reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır (Vaux ve Flavell 2000, Güleş ve Eren 2008). Apoptoz ile, organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılmaktadır.

İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir. Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark. 1985, Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Nigella sativa, çoğu ortadoğu ve uzak doğu ülkelerinde 2000 yılı aşkın süredir birçok hastalığın tedavisinde kullanılan şifalı bir bitki olarak tanımlanmaktadır. Bu bitki Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller) familyasındandır. *Nigella sativa* için ülkemizde kullanılan diğer isimler: çörek otu, ekilen çörek otu, kara çörek otu ve siyah kimyondur (Baytop 1984).

Yaptığımız çalışmada; ratlarda, CCl₄'ün indüklediği akut karaciğer hasarına karşı *Nigella sativa* yağının koruyucu etkisi 8-OHdG ve 3-NT düzeyleri ölçülerek, antiapoptotik etkisinin ise M30, kaspas-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

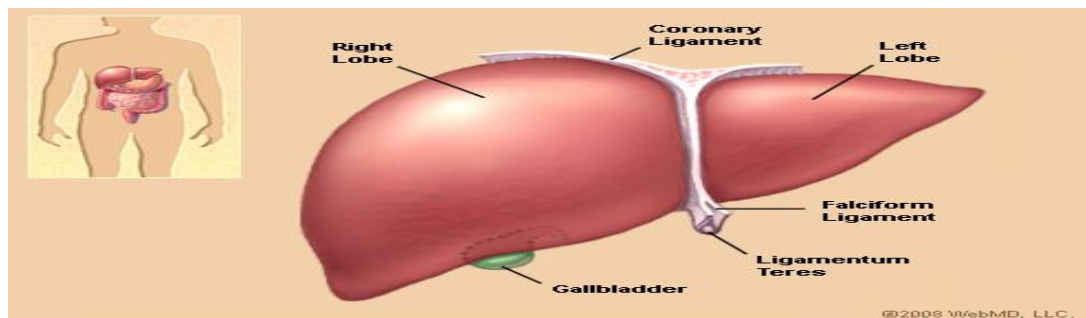
1. 1. Karaciğer

1. 1. 1. Karaciğerin Anatomisi

Vücuttaki en büyük iç organ ve bez olan karaciğer yetişkinde 1-2,5 kg ağırlığındadır. Karaciğer, diyaframın altında bulunur ve yukarıda diyafram aracılığı ile de plevra, akciğerler, perikardiyum ve kalp ile komşuluk yapar. Kama veya yarım bir elipsoid şeklinde olup, kırmızı-kahve rengindedir (Yıldırım 2003 ve Elhan 2006).

Karaciğer, sağ üst kadranda kostalar tarafından korunur. Lobus dexter (sağ) ve lobus sinister (sol) olmak üzere iki anatomik lobdan oluşur. Sağ lob sol lobdan altı kat daha büyüktür. Ayrıca sağ lobun alt yüzünde iki küçük lob daha bulunur. Bunlar lobus kuadratus (dörtgen lob) önde ve alt yüzde, lobus kaudatus (kuyruklu lob) arka yüzdedir (Sturgill ve Lambert 1997).

Karaciğerin facies diaphragmatica ve facies visceralis olarak adlandırılan iki yüzü vardır. Facies diaphragmatica diyaframın alt yüzüne uyacak şekilde düzgün satırlı, konveks (kubbe şeklinde) olup üst, ön, sağ ve arka bölümlere ayrılır. Karaciğerin karın organları ile komşuluk yapan, aşağıya-arkaya-sola bakan yüzüne facies visceralis denir. Intraperitoneal bir organ olan karaciğer, peritoneal ve ventral mezenter orijinli bağlara sahiptir (Şekil 1.1). Diaphragmatik yüzde diaphragma ve karaciğer arasında vertikal olarak falsiform bağ (falsiform ligamenti), diaphragma ile karaciğer arasında frontal plan boyunca uzanan sağda ve solda trianguler bağlar olarak görülen koroner bağ (coronarium ligamenti) ve falsiform bağın alt serbest ucu boyunca uzanan karaciğerin yuvarlak bağı (lig. teres hepatis) bulunmaktadır (D'Angelica ve Fong 2004).



Şekil 1.1. Karaciğer anterior görünümü (<http://www.webmd.com/digestive-disorders/picture>).

1. 1. 2. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer, kollajen ve elastik lif içeren bir kapsül olan Glisson kapsülü ile çevrelenmiş olup; periton ile kaplıdır. Hilumda organa portal ven ve hepatik arter girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Karaciğerde fonksiyonel ve yapısal birim; karaciğer lopçuğudur. Karaciğer lobülü 0,7x2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. İnsanlarda, lobüller birbirleriyle yakın temasta oldukları için, kesin sınırları ayırt etmek oldukça güçtür (Junqueira ve ark. 1993).

Bazı kenar bölümlerinde, lopçuklar safra kanalları, lenfatikler, sinirler ve kan damarları içeren bağ dokusuyla sınırlanmıştır. Portal alanlar adı verilen bu bölgeler, lopçukların köşelerinde bulunur. İnsan karaciğer lobülünde 3-6 portal alan bulunur ve her bir portal alanda bir venül (portal venin bir dalı); bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı); bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar bulunur (Kierszenbaum 2006).

Karaciğer lobülü içindeki hepatositler ırsalsal olarak dizilmiş ve bir duvarın tuğlalarına benzer biçimde düzenlenmiştir. Bu hücre plakları lobülün periferinden merkezine doğru yönlenmişlerdir. Labirent şeklinde ve sünger benzeri bir yapı oluşturacak biçimde serbestçe anastomozlaşır. Bu plaklar arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidleri adı verilen kapillerler bulunur. Sinüzoidler sadece kesintili pencereleri endotelial hücre tabakasından oluşan düzensiz olarak genişlemiş damarlardır. Pencereler yaklaşık 100 nm çapında eleğe benzer plaklar oluşturan kümeler halinde toplanmışlardır (Erbengi 1985).

Karaciğer lobülü üç farklı yaklaşımla açıklanmaktadır.

Klasik karaciğer lobülü; Genelde altıgen bir yapı olarak izah edilen, kan sinüzoidlerinin birleştiği merkezi bir venül içeren polihedral bir yapıdır (Şekil 1.2).

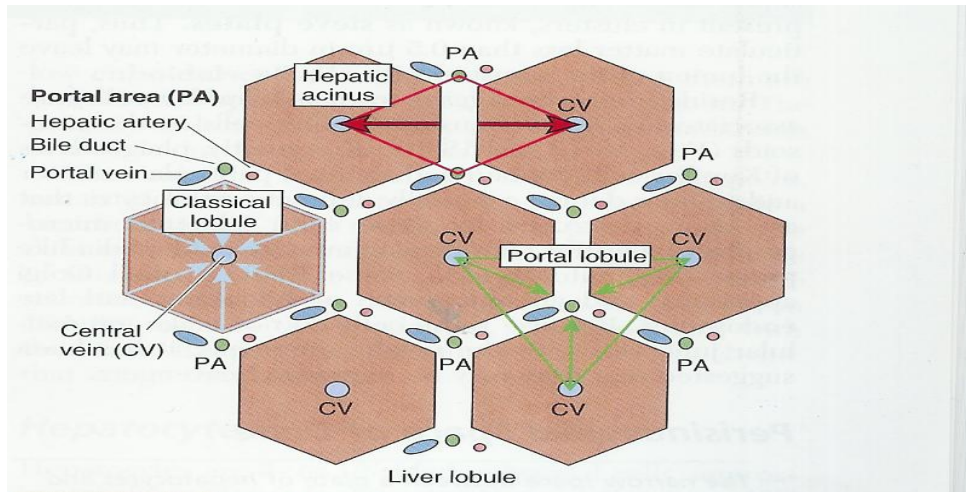
Portal lobül; Portal ven ile hepatik arterin birer dalları ve bir safra kanalı şeklinde portal triadı oluşturan bu yapılar, altıgenin köşelerinde yer alırlar. Merkezde bulunan portal triad etrafı saran hepatosit parankimasından safrayı toplamaktadır.

Karaciğer asinusu; İki komşu klasik lobül içinde aynı interlobüler venden kanlanan gruplar hepatik asinus olarak adlandırılır. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven komşu iki lobüle dağılmaktadır. Sınırları 2 vena sentralis ve 2 portal aralığın birleştirilmesiyle çizilir. Hepatik asinusta dağıtıcı venlere olan yakınlığına göre hücreleri 3 zona ayırmak mümkündür (Bissel ve Maher 1996).

Periferik zon (Zon I); kan damarları lobülün periferinden merkezine doğru ilerlediği için, glikojen, oksijen ve diğer maddelerden en zengin kanla karışan periferik hücreler bu bölgede bulunur. Kandaki her türlü maddeden de ilk etkilenen bu hücrelerdir. Glikojen en çok bu hücrelerde depolanır, daha az olarak da iç zonlarda birikir. Açlık durumunda glikojenin yeniden kana verilmesi gerektiğinde periferik hücreler glikojeni boşaltmaktadır. Bu zondaki hücrelerde glikojen tükenene kadar diğer zondaki hücrelerden glikojen verilmez.

Ara zon (Zon II); oksijen ve besin maddeleri açısından ara bir durumdadır ve aktivitesi değişen bir zondur. Bu fonksiyonel farklılığa bağlı olarak da granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondri sayısı farklı zonlarda farklı sayılardadır.

Santral zon (Zon III); merkezi vene en yakın olup oksijen açısından fakirdir. Buradaki hücreler santral ven çevresinde dar bir bölgede bulunan dinlenme evresindeki hücrelerdir. Bu zonal düzenleme, hepatositlerin çeşitli zararlı ajanlar ya da hastalıklarda, farklı derecelerde hasar görmelerinin nedenini açıklamaktadır (Ökten 2001).



Şekil 1.2. Karaciğerde Lobül Yapısı (<http://okulsel.net/docs/index11629.html>)

1. 1. 2. 1. Karaciğer Hücre Yapısı

Karaciğerde beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlar hepatosit, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, Ito hücreleri ve safra kanalı epitel hücreleridir.

Hepatosit

Hepatositler polihedral, 6 ya da daha fazla yüzeyli ve 20-30 µm çapındadır. Hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde, çok sayıda mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulumun bulunması nedeniyle sitoplazma eozinofiliktir. Portal triadlardan farklı uzaklıklarda bulunan hepatositler, yapısal, histokimyasal ve biyokimyasal açıdan farklılıklar gösterirler. Her bir hepatositin yüzeyi, diğer hepatositlerin yüzeyi ve Disse aralığı boyunca sinüzoidlerin duvarıyla temas halindedir. Hepatositin Disse aralığına bakan yüzeyinde bu aralığa doğru uzanan çok sayıda mikrovillus bulunmakla birlikte bu hücreler ile sinüzoid duvarının hücreleri arasında her zaman bir boşluk (Disse aralığı) vardır (Tekelioğlu 2002).

Hepatosit, bir ya da iki tipik çekirdekçik içeren bir ya da iki yuvarlak çekirdeğe sahiptir. Çekirdeklerin bazıları poliploiddir; yani haploid kromozom sayısının çift katlarında kromozom içerirler. Poliploid çekirdeklerin boyutları daha büyüktür. Hepatositte kaba endoplazma retikulumu sitoplazma içine saçılmış kümeler oluşturur, bunlar bazofilik cisimler olarak isimlendirilir. Bu yapılardaki poliribozomlarda farklı tip protein sentezi yapılmaktadır. Sitoplazma içinde yaygın olarak dağılmış düz endoplazma retikulumunda çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce etkisizleştirilmesi ya da zehirlenmeyi önlemek için gerekli oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon işlemleri yapılmaktadır (Cormarek 2001).

Her bir hepatositte yaklaşık 2000 mitokondri bulunur. Sık görülen diğer bir hücresel yapıda sayıları büyük farklılıklar gösteren lipid damlacıklarıdır. Hepatosit lizozomları hücre içi organelleri yıkımı ve dönüşümü için önemlidir. Peroksizomlar da lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan organellerdir. Peroksizomların işlevlerinden bazıları, fazla yağ asitlerinin oksidasyonu, bu oksidasyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin yıkılması, pürinlerin fazlasının ürik aside yıkılması, kolesterol, safra asitleri ve miyelin yapımında kullanılan bazı lipidlerin sentezine katılmaktır (Kierszenbaum 2006).

Endotelyal hücreler

Karaciğerde en çok bulunan hücrelerden olup, hepatositlerden Disse aralığı adı verilen subendotelyal bir boşlukla ayrılmışlardır. Bu aralıkta retiküler lifler ve hepatositlerin mikrovillusları bulunur. Kan sıvısı endotelyal duvardan kolayca geçer ve hepatosit yüzeyi ile temas eder. Bağırsaklardan gelen ve organizmaya zararlı olabilecek çeşitli kimyasal maddeler ve mikroorganizmalar için karmaşık bir filtre görevi görürler (Poli 2000).

Kupffer hücreleri

Karaciğer sinüzoidleri içerisinde çok değişik şekil ve yerleşimde bulunabilirler. Kupffer hücreleri tipik makrofajlardır. Asıl fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek, immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak ve kalın bağırsaktan portal kana geçen bakterileri ortadan kaldırmaktır. Hücre içi çok zengin lizozomal yapılar hücre içi sindirim kapasitesini yansıtmaktadır. Çok iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi hücrede aktif bir protein sentezi olduğunu göstermektedir (Bouwens 1986, Jones ve ark. 1988).

Karaciğer Stellat hücreleri (Ito hücreleri)

Bu hücreler endotelyal hücre tabakası altında, Disse aralığına yerleşmiştir. Endotelyal hücrelere bitişik veya hepatositlerin mikrovillusları içerisine gömülüdürler. Endotelin altında ve sinüzoidlerde uzun sitoplazmik uzantıları bulunan, hepatositler arasında bağlantıyı sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler dışarıdan verilen A vitaminini lipid damlaları içinde retinil esterler halinde biriktirme kapasitesine sahiptir. Sağlıklı karaciğerde bu hücreler, retinoidlerin alınması, depolanması ve salınması, bazı ekstraselüler matriks proteinlerinin ve proteoglikanların sentezi ve salgılanması, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanması ve çeşitli düzenleyici maddelere yanıt olarak sinüzoid lümen çapının düzenlenmesi gibi bazı işlevler görür (Hautekeete 1993).

Safra kanalı epitel hücreleri

Safraya pasif olarak karışan amino asitler ve glukoz, kanallarda aktif olarak geri alınırlar. Sekretin gibi hormonların kanal epitel hücrelerine etkisi ile safraya su ve bikarbonat salgılanması sağlanır (Önür ve Beyler 2001).

1. 1. 3. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğerin en önemli fizyolojik fonksiyonu kandan gelen besin maddelerinin alımı, depolanması ve dağılımıdır. Karaciğere arteriyal sistem kanı yanında, venöz sistem kanı da gelmektedir. Karaciğere dakikada 1500 ml. kan gelmektedir. Bu miktarın %25'i hepatic arter, %75'i portal venden gelir. Karaciğerin oksijen ihtiyacının ise %50'sini hepatic arter, %50'sini portal ven karşılamaktadır (Skandalakis ve ark. 2000).

1. 1. 4. Karaciğerin Fonksiyonları

Karaciğer gastrointestinal sistemden emilen besinlerin metabolize edildiği ve depolandığı organdır. Bu nedenle sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturmaktadır (Junqueira LC ve ark. 1993). Özefagusun abdominal kısmından itibaren, mide duodenum-jejunum-ileum, kalın bağırsakların tümü, dalak ve pankreasın tüm venöz kanı, içindekilerle beraber kalbe dönmeden önce işlenmek üzere karaciğerden geçmek zorundadır. Bu durum karaciğeri, metabolik faaliyetlerin merkezi haline getirmektedir (Karaöz 2002).

1. 1. 4. 1. Metabolik Fonksiyonları

Karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında önemli fonksiyonlara sahiptir. Kanda normal glukoz konsantrasyonunun devamlılığının sağlanmasında glikoz tampon işlevi görmektedir. Glikojenin depo edilmesi ve glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, galaktoz ve fruktozun glukozla dönüştürülmesi gibi görevleri vardır (Barrett ve ark. 2011).

Karaciğerin, protein metabolizmasında, aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücuttan uzaklaştırılması, endojen aminoasitlerin ve albumin, protrombin, fibrinojen, lipoproteinler gibi plazma proteinlerinin sentezi, aminoasitlerin ve diğer maddelerin birbirine dönüşümlerini sağlar (Onat ve ark. 2006).

Karaciğer lipid metabolizması açısından da önemli görevlere sahiptir. Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonu, lipoprotein, fosfolipid, keton cisimleri ve kolesterol sentezi, yağ asitlerinden trigliserit oluşumu, safra asitleri ve tuzlarının oluşturulması karaciğerde gerçekleşmektedir (Guyton ve Hall 1996).

1. 1. 4. 2. Safra Salgılanması

Karaciğerin en önemli fonksiyonlarından biri de safra salgılanmasıdır. Hepatositler kan komponentlerini alıp, dönüştürerek safra kanalikülleri içine salgılayarak ekzokrin bir faaliyet oluştururlar. Safra sıvısı içerisinde; su, elektrolitler, safra asitleri, fosfolipidler, kolesterol, bilirubin bulunur. Bu maddelerin %90'ı distal intestinal epitelden emilim yoluyla alınır ve hepatositler aracılığıyla kandan safra kanaliküllerine taşınır. Safra asitleri sindirim sisteminde lipidlerin emülsiyon haline getirilerek lipaz ile sindirilmesini sağlar (Junqueira ve ark. 1998).

1. 1. 4. 3. Detoksifikasyon ve İnaktivasyon Fonksiyonu

İlaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen östrojen, kolesterol, aldosteron, tiroksin gibi hormonların fazlasının veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının detoksifikasyonunu veya safra ile atılımını sağlar. Karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücutta birikmesi, hormonal sistemin aşırı faaliyetine yol açar. Birçok ilaç karaciğerde p 450 enzim sistemi tarafından metabolize ve inaktive edilmektedir. Karaciğer, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale getirilmesinden de sorumludur. Hemoglobinin yıkım ürünü olan bilirubin karaciğerde glukronik asitle konjuge edilerek suda erir hale getirildikten sonra safra yolu ile vücut dışına atılır. Protein yıkımından ortaya çıkan ve hücreler için toksik bir madde olan amonyağı, üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlar (İliçin ve ark. 1996).

1. 1. 4. 4. Karaciğerin Diğer Önemli Fonksiyonları

Hepatik venlerdeki ve hepatik sinuslardaki kan ile birlikte karaciğerin normal kan volümü 450 ml'dir. Sağ atriumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve genişleyebilen bir organ olduğundan normalde var olan rezervuarına duruma göre ekstra 500 – 1000 ml daha kan ekleyebilir. Portal sistemde bağırsaklardan gelen mikroorganizmalar hepatik sinüslerde bulunan makrofajlar aracılığı ile filtrelenmektedir. Kanda koagülasyon işleminde kullanılan fibrinojen, protrombin, globulin, faktör V, VII, IX, X gibi maddeler karaciğerde yapılır. Karaciğerde A, D ve B12 vitamini depo edilmektedir. Bütün bu fonksiyonları nedeniyle biyokimya biliminin odağında bu organ vardır (Guyton ve Hall 1996).

1. 5. Karaciğer Hasarı ve Mekanizması

Karaciğer, anatomik yerleşimi, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeni ile toksik maddelere ve çeşitli ilaçlara çok sık maruz kalmaktadır. Karaciğer hasarına yol açan ve hemen hemen her tür karaciğer hastalığı tablosuyla sonuçlanabilen 600'den fazla ilaç vardır. Karaciğer hasarı 5 temel mekanizma ile oluşabilmektedir.

1. 5. 1. Hücre İçi İyon Dengesinin Bozulması

İyon dengesinin bozulması sonucu ilaçlar kovalent bağ ile intraselüler proteinlere bağlanır. Hücre içi kalsiyum dengesi bozulur. Hücrede şişme, zarda parçalanma ve hücre yıkımı gerçekleşir.

1. 5. 2. Safra Kanaliküler Hasarı

Safra kanalikül membranındaki transport proteini etkilenerek veya safra sekresyonundan sorumlu bölgedeki aktin liflerinin yıkımına neden olarak safra sekresyonuna engel olup kolestaza neden olur. Safra asitlerinin hücre içindeki birikimi de apoptoza neden olmaktadır.

1. 5. 3. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Hücre zedelenmesi ile uyarılan immün sistem sitokinleri (TNF gibi) aktifleşip, hücre içi kaspazları tetikleyerek apoptoza neden olurlar.

1. 5. 4. İmmün Mekanizma

İlaçlar küçük moleküllerdir ve immün cevap oluşturamazlar. Ancak biyotransformasyon sonucu p450 enzim reaksiyonları sırasında oluşan ara metabolitler enzimlere bağlanıp "addukt" denilen antijen gibi algılanan bileşikler oluştururlar. Bu bileşiklerin hepatosit yüzeyine taşınması ile antikor oluşumu ve humoral immünite uyarılır. Direkt T hücre cevabı ile sitolize neden olurlar.

1. 5. 5. Mitokondriyal Disfonksiyon

Bu tip hasar 3 şekilde gerçekleşebilmektedir. Yağ asitlerinin beta oksidasyonunun inhibisyonu, solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu veya doğrudan mitokondriyal DNA'yı etkiler. Serbest yağ asitleri metabolize olamayıp, laktat ve reaktif oksijen radikallerinin birikimine yol açar (Eren ve ark. 2004, Arıcı 2008).

1. 2. Karbontetraklorür

Karbontetraklorür endüstride çözücü, temizleyici ve yağ sökücü olarak uzun süre yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Günümüzde CCl₄, hepatotoksitenin neden olduğu yağlı dejenerasyon, fibrozis, hepatosellüler ölüm, ve kanser gibi vakaların hepatotoksik etki mekanizmaları aydınlatmak için bir model olarak kullanılmaktadır.

CCl₄, sitokrom (CYP) 2E1, CYP2B1 veya CYP2B2 ve muhtemelen CYP3A tarafından triklorometil radikali CCl₃• oluşturulması için aktive edilir. Bu radikal nükleik asit, protein, lipit gibi hücresel moleküllere bağlanabilir, lipid metabolizmasındaki gibi önemli hücresel süreçleri bozarak yağlı dejenerasyona (steatoz) sebep olur. CCl₃• ve DNA arasındaki adduct oluşumu hepatik kanseri başlatıcı işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu radikal ayrıca oksijen ile reaksiyona girerek yüksek reaktif olan trichloromethylperoksiyi CCl₃OO• oluşturur. CCl₃OO, poliansature yağ asitleri ile reaksiyonu başlatır. Hücrede, mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranlarının permeabilitesinin bozulması ile hücresel kalsiyum dengesi kaybolur. Hücre içi yüksek Ca⁺² düzeyleri, hücre iskeleti yapılarının yıkılmasına, proteazlar, endonükleazlar ve fosfolipazlar gibi çeşitli katabolik enzimlerin aktive olmasına neden olur. Sonuçta apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümü gerçekleşir (Manibusan ve ark. 2007).

Hepatotoksik kimyasallar genellikle, karaciğerde metabolik aktivasyon gerektirenler ve gerektirmeyenler olarak iki gruba ayrılırlar. CCl₄, ilk grup hepatotoksinlerdendir, karma fonksiyonlu oksijenazlar ile metabolize olarak daha alt moleküllere ayrılır ve bu moleküller de başka enzim sistemleri için substrattır (Nelson ve Pearson 1990). CCl₄'ün dozu, uygulama süresi, tetikleyici etken varlığı ya da uygulandığı organizmanın yaşına bağlı olarak hücrelerde rejenerasyon oluşabilir ve karaciğer hasarı tamamen ortadan kalkabilir.

Reaktif bileşiklerin veya metabolitlerinin toksisitesi, DNA, protein, lipit ve karbonhidrat gibi önemli hedef moleküllerle kovalent olarak bağlanmaları (primer) veya sekonder ilişki yoluyla (lipit peroksidasyonu, ROT oluşumu, GSH/GSSG oranında değişiklik) hedef moleküllerde değişiklik oluşturmaları sonucunda ortaya çıkabilir (Weber ve ark. 2003).

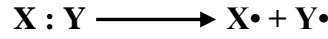
1. 3. Serbest Radikaller

Atomların çekirdeklerini çevreleyen ve içinde elektronların bulunduğu boşluklara orbital adı verilmektedir. Her bir orbitalde spinleri birbirine ters yönde olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmemiş veya ortaklanmamış elektronlar denir (Halliwell ve Gutteridge 1984).

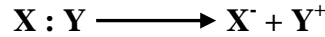
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (Akkuş 1995).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (Wu ve Cederbaum, 2003):

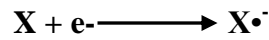
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Oksijen metabolizması ara ürünleri olan oksijen türleri, halojen atomlar, sodyum (Na^+), potasyum (K^+) gibi alkali metal atomları, bir orbitalinde tek elektron bulunduran nitrit (NO^\cdot), nitrat (NO_2^\cdot) gibi bileşikler, klor (Cl^\cdot) veya brom (Br^\cdot) gibi tek atomlu yapılar radikaller olarak sınıflandırılmaktadır. Radikaller; pozitif, negatif yada nötr olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Valko ve ark. 2007).

1. 3. 1. Reaktif Oksijen Türleri

Organizmada genellikle en etkili serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Bunlar Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species-ROS) olarak adlandırılırlar. Moleküler oksijenin kendisi ise iki eşlenmemiş elektrona sahip olması sebebiyle bir diradikal olarak tanımlanır (Yu 1994). Reaktif Oksijen Türleri Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Biyolojik önemi olan oksijen türleri (Turko ve Murad 2002).

Reaktif ve Nonreaktif Oksijen Türleri	
Süperoksit Radikali	$O_2^{\bullet-}$
Hidroksil Radikali	HO^{\bullet}
Peroksil Radikali	ROO^{\bullet}
Alkoksil Radikali	RO^{\bullet}
Hidroperoksil Radikali	HO_2^{\bullet}
Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hipokloröz Asit	$HOCl$
Ozon	O_3
Singlet Oksijen	O_2

1. 3. 2. Reaktif Azot Türleri

+1'den +5'e kadar değişen farklı oksidasyon durumlarındaki azot atomu bulunduran yapılar çeşitli azot oksitlere sıklıkla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon durumları guanido azot ile nitrat arasında bir ara metabolit olan bu azot oksitlere Reaktif Azot Türleri (Reactive Nitrogen Species-RNS) adı verilir (Vliet ve ark. 1996). Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Reaktif ve nonreaktif azot türleri (Turko ve Murad 2002).

Reaktif ve Nonreaktif Azot Türleri	
Nitrik Oksit	NO^{\bullet}
Azot Dioksit	NO_2^{\bullet}
Nitröz Asit	HNO_2
Nitrik Asit	HNO_3
Nitrozil Katyonu	NO^+
Nitrozil Anyonu	NO^-
Diazot Tetraoksit	N_2O_4
Diazot Trioksit	N_2O_3
Peroksinitrit	$ONOO^-$
Peroksinitröz Asit	$ONOOH$
Nitril (Nitronyum) Katyonu	NO_2^+
Nitril (Nitronyum) Klorür	NO_2Cl

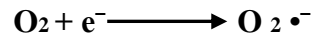
1. 3. 3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik Kaynaklar: Aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine ve adriamicine), radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler).

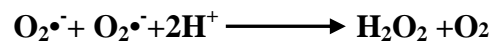
İntraselüler Kaynaklar: Küçük moleküllerin (tioller, antibiyotikler, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, hidrokinonlar) otooksidasyonu, enzimler ve proteinler (triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p450 ve sitokrom b5 gibi), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler), plazma membranında (lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu, fagositlerde NADPH oksidaz) ve oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) serbest radikallerin intraselüler kaynaklarıdır (Akkuş 1995, Özkan ve Fışkın 2004).

1. 3. 4. Süperoksit Radikali $O_2^{\bullet-}$

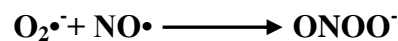
Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet-}$) oluşur.



Süperoksit radikali H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgeyebilmesinden dolayı önemlidir. İki molekül süperoksit proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşür (Nodberg ve Arner 2001).

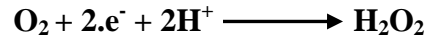
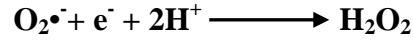


Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir (Gümrükçüoğlu 2009).

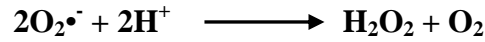


1. 3. 5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşmaktadır. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (Cheesman ve Slater 1993).

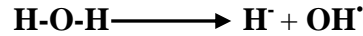


Ancak, biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi O₂•⁻ nin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu dismutasyon kendiliğinden yada SOD enzimi aracılığıyla katalizle olabilmektedir (Palmieri ve Sblendorio 2006).



1. 3. 6. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali (OH•), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Song 2004).



Son derece reaktif bir oksidan radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olmaktadır. Hidroksil radikali hücrel DNA hasarının oluşumundan ve iyonize radyasyonun membranlara etkisinden de sorumludur (Fantel 1996).

1. 3. 7. Singlet Oksijen (O₂)

Singlet oksijen (O₂), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin yüksek enerjili ve mutajenik formudur. Eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spin yönünün tersine yer değiştirmesi sonucunda oluşur (Ames ve ark. 1993).

1. 3. 8. Nitrik Oksit (NO)

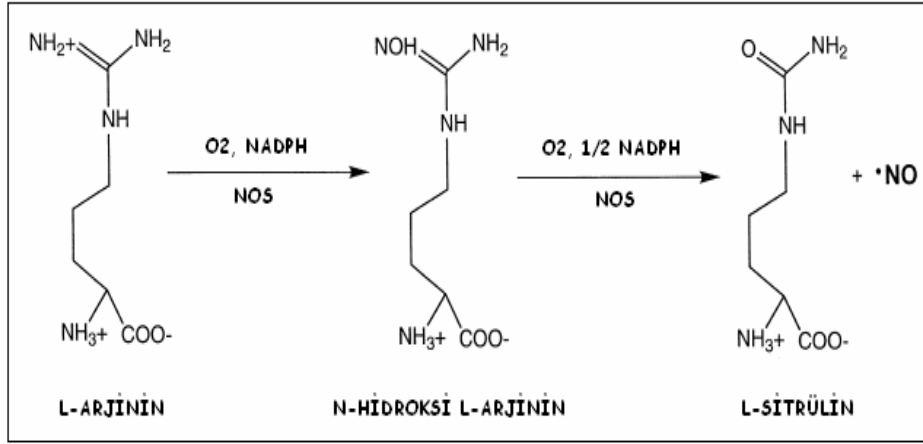
Canlı sistemlerde oluşan reaktif azot türlerinin en önemlisidir. Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO, 20-30 saniyelik yarı ömre sahip bir serbest radikaldir. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterirken, düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Havadaki NO, kısa sürede O₂ ile oksitlenerek nitrojen dioksit (NO₂) dönüşür. NO₂ dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. NO'nin üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyer ile karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır (Schulman 1997).

NO fizyolojik konsantrasyonlarda hemen hemen tüm organ sistemlerinde değişik biyolojik etkilere sahiptir. NO gastrointestinal sistem düz kası, hava yolları düz kası ve kavernoöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, NO merkezi sinir sisteminde hafızanın şekillenmesini de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlar için nörotransmitterdir (Wass ve ark. 2006).

Bununla birlikte NO'nun yüksek konsantrasyonlardayken, çeşitli enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek, lipid peroksidasyonunu indükleyerek, antioksidanların azalmasına ya da DNA'da mutasyonlara sebep olarak aynı zamanda sitotoksik etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (Wink ve Mitchell 1998).

1. 3. 8. 1. Nitrik Oksitin Biosentezi ve Nitrik Oksit Sentazlar

Nitrik oksit (NO), pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile sentezlenmekte ve L-arginin ile O₂ molekülleri, NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir (Şekil 1.3). NO'nin sentez reaksiyonu sırasında moleküler O₂'nin yanı sıra kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve hem kullanılır. Bu kofaktörler arasında elektron transferi gerçekleşmektedir (Alderton ve ark. 2001)



Şekil 1.3. Nitrik oksitin sentezi (Eiserich ve Patel 1998).

NOS'un iki izoenzimi tanımlanmıştır (Richard 1994).

A.Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS)

Yapısal (Constitutive) NOS, normal biyolojik sistemlerdeki düşük miktarlardaki NO sentezinden sorumludur. Bu izoenzimin esas özelliği aktivitesinin kalsiyuma bağımlı olmasıdır. Asetilkolin gibi bir haberci, hücre üzerindeki reseptörüne bağlanarak oluşan impulsla Ca⁺² iyon kanalları açılarak intrasellüler Ca⁺² düzeyi yükselir. Kalsiyumun kalmodüline bağlanmasıyla oluşan kompleks NOS'u uyarır. İntrasellüler kalsiyumu artıran etkiler cNOS'un aktifleşmesini sağlamaktadır. Uyarı ortadan kalkınca intrasellüler kalsiyum da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkar. cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur ancak intrasellüler Ca⁺² düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır.

cNOS'un bulunduğu yer ve oluşturduğu etkiye göre nNOS ve eNOS olarak adlandırılan iki izoformu bulunmaktadır (Atmaca ve Mert 2001).

I-Nöronal NOS (nNOS)

En düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Presinaptik uçtan salgılanan glutamatın etkisiyle postsinaptik uçtaki hücrenin nNOS'u aktiveleştirilir ve oluşan NO ile hedeflenen etkisini oluşturur. Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur. Bununla birlikte koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması işlevlerinde de rol oynar. Dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde solunum fonksiyonlarında, mesane sfinkter işlevinde fonksiyon gösterir (Ercan E. ve ark. 2003).

II-Endotelyal NOS(eNOS)

Vasküler endotel hücrelerinde ve böbrek tübül hücrelerinde bulunan NO, endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine girer. Düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklazın hem grubundaki demirine bağlanarak onu aktifleştirir ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur. Böylece, düz kas hücrelerinde cGMP'ye bağımlı protein kinazların aktive olmasını sağlar ve miyozin hafif zincirli kinazlar fosforillenir. Fosforillenmiş miyozin hafif zincirli kinazların kalsiyum-kalmodülün kompleksine afinitesinin azalmasıyla daha az miyozin hafif zinciri fosforillenir. Miyozinin regülatör hafif zincirinin fosforile edilememesi enzimin inaktif formda kalmasına ve düz kas kontraksiyonunun azalmasına sebep olur. Böylece vasküler tonus azalır. Endotel hücrelerinde kalsiyum konsantrasyonu artırılması ile eNOS aktive olur (Loscalzo 1998).

eNOS'un, düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve böylece kalp kasılmasını organize ettiği (Bossenge 1994), trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe ettiği (Salvemine ark. 1989) ve endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Usmar ve Radomski 1994).

B- Uyarılabilir (Inductible) NOS (iNOS)

Bu sistem özellikle makrofajlarda görülmektedir. Bu tip enzim indüklenebilir NOS olarak adlandırılır. Burada lipopolisakkaritler ve sitokinler gibi ajanlar Ca^{+2} ya bağımlı olmadan NOS'u indüklemektedirler. İlgili hücrede önceden NOS yoktur ya da çok azdır. Nükleer Faktor Kappa B gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir. Bu sentez Kappa B'ye cevap veren elemanların iNOS promotor gen bölgesini aktive etmesiyle başlar. Bu aktivasyon sonucunda enfeksiyon, enflamasyon yada vasküler travma durumlarında diğer iki NOS formunun ürettiğinin 100-1000 katı kadar NO üretimi sağlanır (Bivalacqua 2002).

Nitrik oksit çeşitli hücresel işlevlerde bir ikincil mesajcı olarak önemli rol oynamasına rağmen, süperoksit anyonu ile reaksiyona girdiğinde oldukça toksik peroksinitrit radikale dönüşmektedir.

1. 4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açmaktadırlar. Oluşan bu hasarın kanser, ateroskleroz, amiloidoz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, senil demans ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (Kopáni ve ark. 2006).

1. 4. 1. Lipitler Üzerine Etkileri

Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki en önemli etkilerinden biri lipidler üzerine olanıdır. Bu olay lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanır (Arıcıoğlu 1994).

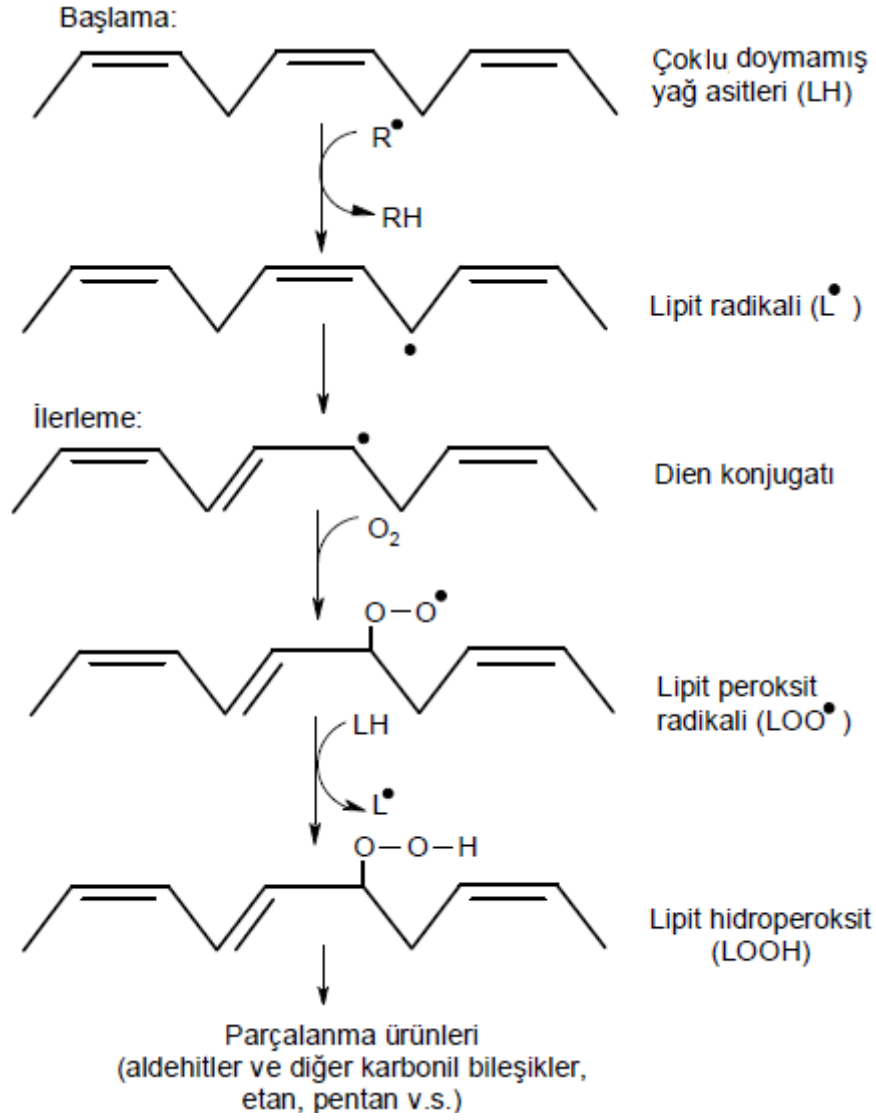
Karbon merkezli radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluştururlar. Bu peroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup, çok uzun ömürlüdür. Lipit peroksidasyonu, membran yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksijen radikallerine maruz kalması sonucunda ve dört aşamada oluşmaktadır (Şekil 1.4).

Başlama basamağı: OH• radikali PUFA zincirindeki (LH) α -metilen gruplarından hidrojen atomunun çıkarması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasıyla başlar.

İlerleme basamağı: Zincir reaksiyonu, oluşan lipid radikaline O₂ ilavesi ile devam eder ve lipid peroksi radikali (LOO•) ile lipid hidroperoksidi (LOOH) oluşur.

Yıkım basamağı: Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipid parçalanması ile sonuçlanır.

Sonlanma basamağı: Zincir reaksiyonu, antioksidanlar tarafından ayrıca radikallerin birbiri ile tepkime vermesiyle sonlandırılabilir.



Şekil 1.4. Lipit peroksidasyonu (Uysal 2010).

Lipid peroksitlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır sonuçta hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden aldehitler en toksik maddeler olup diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar (Gümüştaş ve Atukeren 2008).

1. 4. 2. Karbonhidratlar üzerine etkileri

Fizyolojik pH ve ısıda, glukoz gibi monosakkaridlerin otooksidasyonu ile H_2O_2 , peroksitler ve okzalaldehidler oluşabilir. Karbonhidratların proteinlere bağlanması ise, proteinlerin serbest radikal saldırısına duyarlılığını artırmaktadır.

1. 4. 3. Proteinler üzerine etkileri

Serbest radikallerin oksidan etkisi sonucu meydana gelen oksidatif protein modifikasyonu ve bunun sonucu oksitlenmiş proteinlerin fazla miktarda birikmesi hücre ve doku hasarına bağlı olarak çeşitli patolojik durumlara yol açmakla birlikte yaşlanma nedenleri arasında bulunmaktadır (Stadtman 1992, Dean ve ark. 1997).

Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir (Berlett ve Stadtman 1997, Gülbahar 2007). Protein oksidasyonu, ROS ile doğrudan veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu dolaylı olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Gülbahar 2007). Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücrel fonksiyonları etkiler. Taşıma sistemlerinin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, reseptörlerin ve enzimlerin rol aldığı hücrel fonksiyonlar oksidatif protein hasarından etkilenir (Reznick ve Packer 1994). Protein oksidasyonu birçok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino açıl yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabilmesi sebebiyle çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır.

Peroksinitrit Radikali Aracılığıyla Protein Oksidasyonu;

Arjinin metabolizması ile ilgili olarak sentezlenen nitrik oksit çeşitli hücrel işlevlerde bir ikincil mesajcı olarak önemli rol oynamasına rağmen, süperoksit anyonu ile reaksiyona girdiğinde oldukça toksik peroksinitrit radikaline dönüşür. Peroksinitrit radikali sisteinin sülfidril gruplarının nitrolanmasına, tirozin ve triptofana nitrat grubunun eklenmesine ve metiyoninin oksitlenmesine sebep olur. Nitrotrozin oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır (Büyükgüzel 2013).

Peroksinitrit oluşumu:

Peroksinitrit (ONOO⁻), nitrik oksidin (NO), süperoksit ile reaksiyonu sonucunda oluşan reaktif bir türevidir (Stadtman ve Levine 2000). Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktiftir. Normal koşullarda süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat

süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda nitrik oksit radikali meydana gelmişse, nitrik oksidin süperoksit radikali ile tepkimesi sonucu daha reaktif peroksinitrit oluşur (Kayalı ve Çakatay 2004, Büyükgüzel 2013).

Bu reaksiyon hızı süperoksitin SOD ile olan reaksiyon hızından yaklaşık 3 kez daha fazladır. Cu-Zn SOD'un intraselüler konsantrasyonu (2-40 μM) süperoksitin intraselüler konsantrasyonundan (10-100 pM) yaklaşık 1 milyon kez fazla olduğundan normal koşullarda çok az peroksinitrit oluşabilir (Demiryürek ve ark. 2004). Normal şartlarda NO'nun fizyolojik konsantrasyonu yaklaşık 10-100 nM kadardır ve SOD konsantrasyonundan çok düşüktür. İnflamasyon gibi birçok patolojik olayda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarak NO ve süperoksitin simultane olarak salıverilmesine yol açar. Makrofajlar ve nötrofiller stimüle edildiklerinde NO ve süperoksiti salıvererek peroksinitrit oluşumuna neden olabilecekleri gibi, NO ve süperoksit farklı hücrelerden salıverilip peroksinitrit oluşturabilirler (Gow ve ark. 1998).

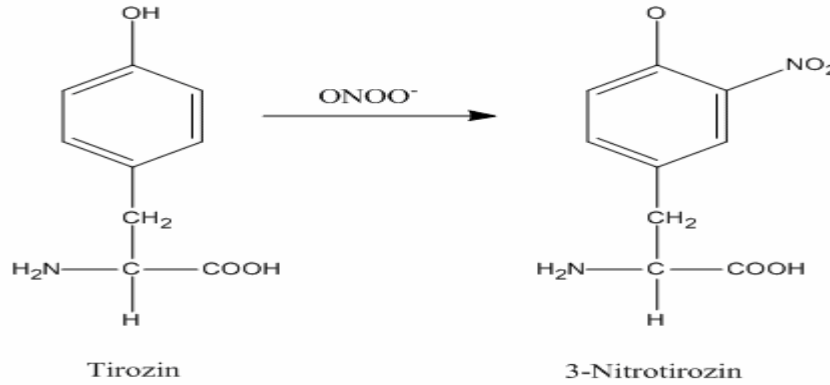
Biyolojik sistemlerdeki peroksinitrit reaksiyonları apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüyle sonuçlanan sitotoksik olaylara neden olabilir (Pacher ve ark. 2007). Sitotoksik etki genellikle çeşitli efektör molekül ve süreçlerin katılımını içeren oksidasyon ve nitrasyon reaksiyonları ile tetiklenmektedir. Örneğin, poly (ADP-ribose) polimeraz aktivitesi ile oksidatif DNA hasarının tetiklediği nekroza göre mitokondrial membran komponentlerinin Peroksinitrit-aracılı oksidasyonu pro-apoptotik faktörlerin salınımını kolaylaştırmaktadır (Szabo' ve ark. 2007).

Peroksinitrit membranlardaki çeşitli iyon pompalarını, membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini ve Ca^{+2} ile aktive olan potasyum kanallarının inhibe etmektedir. Mitokondriyal hasar, Ca^{+2} homeostazının bozulması ile kaspaz aktivasyonu, ve hücre sinyal iletiminde bozukluklar oluşturmakta, ortaya çıkan DNA'nın hasarlanmasıyla nekroz veya apoptoz ile hücre ölümüne sebep olmaktadır (Szabo 2003).

Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest haldeki tirozinin fenolik halkasına nitro grubu ekleyerek 3-nitrotirozini oluşturur. Bu reaksiyon spontan olarak oluşabileceği gibi, geçiş metalleri, SOD, CO_2 ve miyeloperoksidaz tarafından katalize edilebilir (Sampson ve ark. 1996, Royall ve ark. 1997).

1. 4. 3. 1. 3-Nitrotirozin (3NT)

Peroksinitrit proteinlerdeki tirozin rezidülerinin 3-pozisyonundaki hidroksil grubuna bir nitro grubu ekleyerek, stabil bir son ürün olan 3-nitrotirozin (3-NT)'i oluşturur (Ischiropoulos ve ark. 1992) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Tirozinin peroksinitrit tarafından nitrosasyonu (Yaman 2000).

3-NT protein nitrosasyonunun indirekt ve stabil ürünü olup, nitrozatif stresi göstermede yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Der Vliet ve ark. 1999).

İn vivo 3-NT oluşumunun ilk kanıtı 1990 yılında Ohshima ve arkadaşları tarafından insan idrarında serbest nitrotirozin ve onun deaminlenmiş, dekarboksillenmiş metaboliti olan 3-nitro-4-hidroksifenil asetatın tespit edilmesiyle elde edilmiştir. 3-NT, normal bireylerin plazma ve dokularında saptanamayacak kadar düşük seviyelerdeyken, NO \cdot üretiminin artması ve oksidatif stresle ilgili durumlarda artış göstermektedir (Eiserich ve ark. 1998).

3-nitrotirozinin nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma ve metabolik hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlarda belirgin olduğu bildirilmektedir (Laura ve ark. 2011).

NO \cdot , ONOO $^-$ ve benzeri türler oldukça çabuk bozulan radikaller olmaları nedeniyle in vivo olarak NO \cdot ve NO \cdot deriveli maddelerin ölçümü için spesifik markırlar kullanılmaktadır. Peroksinitritin stabil ve spesifik bir son ürünü olan 3-NT, insan hastalıklarında ve hayvan modellerinde, peroksinitrite bağlı protein hasarının tespit edilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Yaman ve ark. 2000).

1. 4. 4. DNA üzerine etkileri

Oksidatif stres, DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi çeşitli lezyonlara neden olarak hasara neden olmaktadır (Williams ve Jeffrey 2000, Cooke ve ark. 2003).

DNA'nın oksidatif hasarlanmaları ile ilgili ilk çalışma 1952 yılında Beers ve Sizer tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada nükleer DNA'nın $KMnO_4$ (potasyum permanganat) ve OsO_4 (osmiyum tetraoksit) gibi oksidasyon ajanları ile muamele edildiğinde timin glikol olarak isimlendirilen bir oksidasyon ürününün ortaya çıktığı saptanmıştır. Reaktif oksijenler deoksiriboz-fosfat omurgasına zarar verirken, pürin ve pirimidin bazları arasında da değişime neden olarak DNA-protein yapısında değişime yol açmaktadır (Zwart ve ark. 1999, Ekici ve Sağdıç 2008).

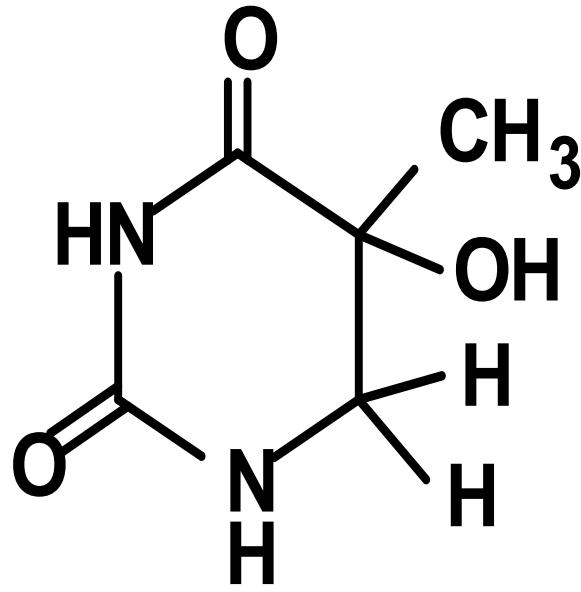
Serbest radikaller nükleik asitlerin baz ve şeker gruplarını etkilemekte, fakat en çok timin-tirozin bağlantısına zarar vermektedir (Beckman ve Ames 1998). Fare karaciğerinin çekirdek DNA'sında oksidatif hasar sonucu timidin glikol olduğu ince tabaka kromatografisi tekniği ile gösterilmiştir (Frenkel ve ark. 1981).

1. 4. 4. 1. DNA Hasarı ve Oluşum Mekanizması

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca sürekli görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücrenel metabolitler ve ekzojen ajanlar tarafından devamlı değişmektedir. Bu değişimler sonuçta tek hücreli organizmalarda hücrenel ölüme veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanma sebebi olmaktadır (Sancar ve ark. 2004, Atmaca ve Aksoy 2009).

Hasar, doğrudan veya dolaylı olabilir. Doğrudan hasar, H_2O_2 'den oluşan hidroksil radikalının DNA'ya çok yakın bir yerde oluşması ve onu kırması şeklindedir. Dolaylı olarak ise hücre içi sıvıda serbest Ca^{+2} nin artışı proteazları aktive etmekte böylece hücre iskeleti bozulmaktadır. Nükleazların aktivasyonu sonucu DNA kırılması gerçekleşmektedir.

Reaktif oksijen türleri Şekil 1.6’da görüldüğü gibi DNA’da 20’den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açmaktadır (Dizdaroğlu 1998). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2’-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir (De Martinis ve De Lourdes Pires Bianchi 2002).

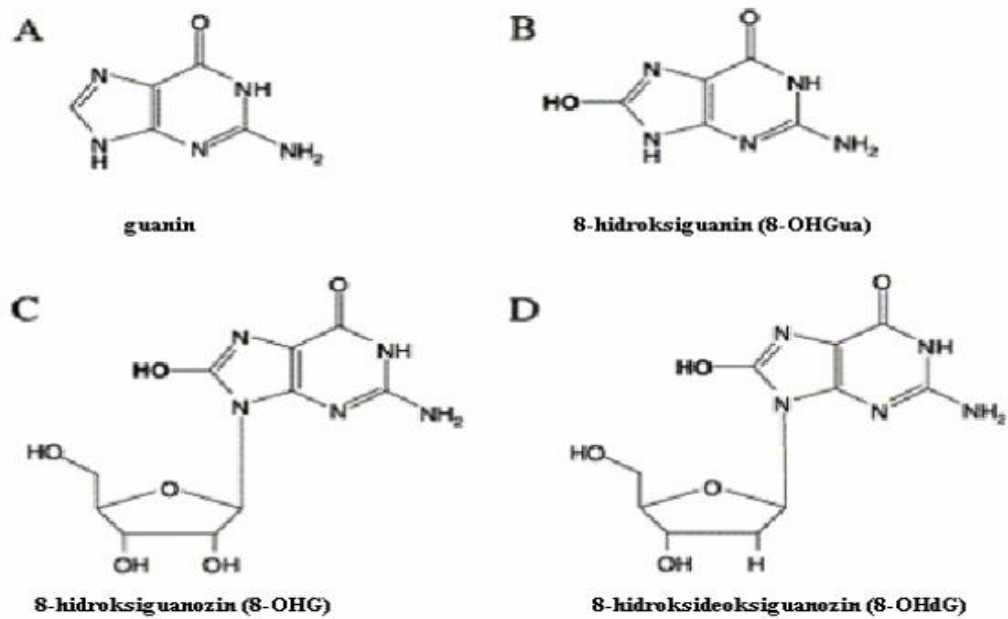


**5-hydroxy-6-hydro-
thymine**

Şekil 1.6. Modifiye baz yapıları (Evans 2004, Dizdaroğlu ve Jaruga 2012).

1. 4. 4. 2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

Guaninin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olması, Cu^{+2} iyonlarının en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunması nedeniyle oksidasyona en yatkın olan bazdır (Helbock ve ark. 1999, McDorman ve ark. 2005). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı yirmiden fazla oksidatif baz hasar ürünüdür ve oksidatif DNA hasarının belirteçlerinden biridir (Şekil 1.7). 8-OHdG, ROS'un DNA'da yaptığı baz hasar ürünlerinden mutajenitesi en iyi bilinen ve en çok karşılaşılan biyomoleküldür. Bu molekül, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen ROS ya da ekzojen kaynaklı ROS tarafından DNA'da şekillenmektedir. OH radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girerek DNA ürün radikallerini oluşturmaktadır. OH- radikalının C-8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali (C8-OH) bir elektron ve proton kaybederek 8-OHGua'e okside olur (Yokuş ve Çakır 2002, Atmaca ve Aksoy 2009). DNA replikasyonu sırasında kalıptan yanlış okunma yoluyla G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırmaktadır (McDorman ve ark. 2005). 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın direkt göstergesi olduğu kabul edilerek oksidatif DNA hasarını belirlemede son zamanlarda en sık çalışılan parametre haline gelmiştir (Helbock ve ark. 1999).



Şekil 1.7. 8-OHdG'nin oluşumu (Altuntaş 2007).

1. 4. 4. 3. DNA Hasırına Verilen Yanıtlar

Tüm organizmalar, hücreleri çevresel hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücre ölümünü, mutasyonu, replikasyon hatalarını, DNA hasarının devamlılığını ve genomik kararsızlığı azaltan bütün işlemlerde kullanılır. Bu işlemlerdeki bir anormallik kansere ve yaşlanmaya yol açar (Bütüner ve Kantarcı 2006). DNA hasarı hücrede, hasarı ortadan kaldıracak eğer hasar giderilemiyorsa programlı hücre ölümünü sağlayacak bir □ çok hücreli mekanizmayı aktifleştirir.

Hücre DNA hasarına dört şekilde yanıt verir;

1-Hasarlı DNA'nın □ çıkarılarak DNA □ çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),

2-DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,

3-Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),

4-Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elimine edilmesi (programlı hücre ölümü= apoptoz)

Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıklara, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklara, kansere veya yaşlanmaya sebep olur. Dinamik bir yapıya sahip olan DNA molekülü, onarılabilen tek biyomolekül olması bakımından önemlidir. Hücre, DNA hasarlarına karşı farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür ya da hasar DNA onarım mekanizmaları ile onarılabılır (Friedberg 1984, Onur ve ark. 2009).

1. 5. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış olup ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılarak dökülmesi anlamına gelen “apoptoz” adı verilmiştir (Cohen 1998).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu sürer. Bu şekilde ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini sağlamak üzere dinamik bir denge halinde devam eder (Elmore 2007).

İnsan vücudunda her saniyede 100 000 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (Vaux ve ark. 1999). Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptoz, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım, yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar (Cooper 1994).

1. 5. 1. Apoptozun Morfolojisi

Apoptozda ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup diffüz bir görünümdeydir. Apoptozda süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır (Narula ve ark. 1997). İmmün elektroforez yapıldığında “ladder patern” olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Gavrieli ve ark. 1992).

Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler.

Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi ile sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar. Hücre büzülüp, küçülmesiyle makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalar oluşur. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (Trump ve ark. 1997, Pınarbaşı 2007).

Çekirdek de hücre gibi büzülür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Cohen 1998).

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar). Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ile Fas (CD95) 'dir. Bunlar karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspase-activated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımına neden olur (Büyükgebiz ve Caferler 2001).

1. 5. 2. Kaspazlar

Apoptoz sırasında meydana gelen sellüler ve morfolojik değişimler, kaspazların rol oynadığı süreçler sonucunda gelişir (Nicholson 1999). Apoptotik hücre ölümünde rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzim "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. İnaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit yapıları tanır ve bazı önemli hücre içi proteinleri, aspartik asit rezidülerinden keser. Bu şekilde hücreyi kontrollü bir şekilde

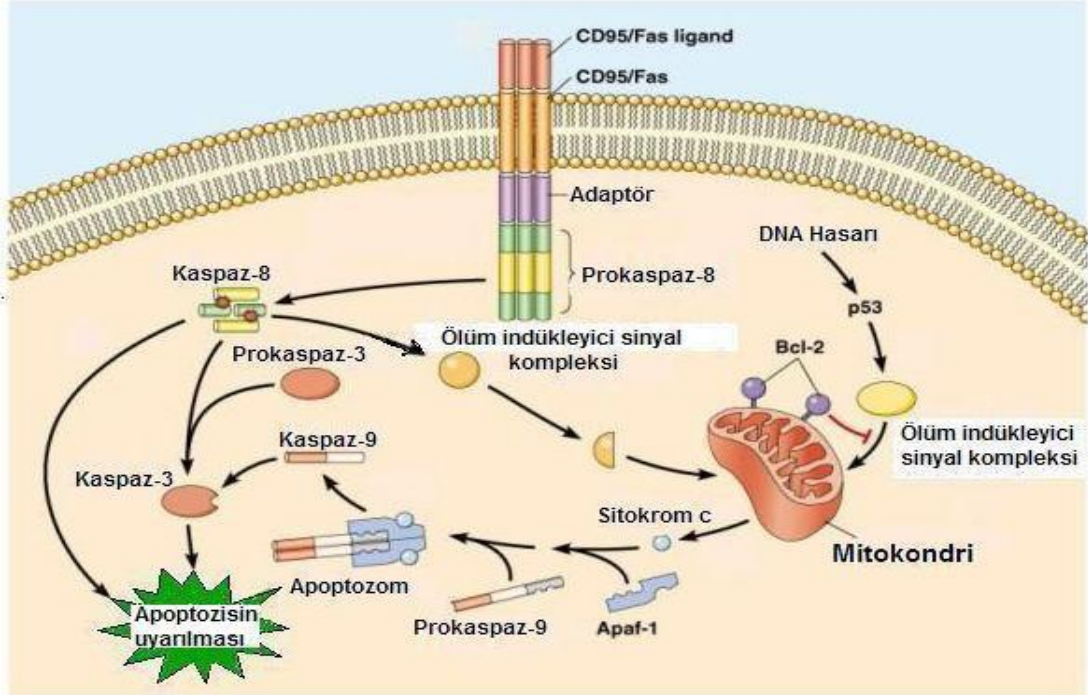
ölüme götürürler. Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır (Hampton ve Orrenius 1998). En az 14 kaspaz tanımlanmıştır (Alnemri ve ark. 1996).

Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (Büyükgebiz ve Caferler 2001). Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenmektedirler (Israels ve Israels 1999).

1. 5. 3. Apoptozun Mekanizması

Yapılan araştırmalar sonucunda, apoptoz ve apoptozdan sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Apoptoz indüklenmesi için iki ana yol ortaya çıkarılmıştır; Birinci yol (ekstrensek yolak) hücre dışı sinyallerle CD95 ligandına (Fas ligand= CD95L) bağlanan tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) ailesi tarafından uyarılmaktadır. Bu bağlanma, reseptörde ATP'den bağımsız bir takım değişikliklere neden olarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi oluşumuna neden olur. CD95 adaptör molekül Fas reseptörü ilişkili ölüm ünitesi, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksini oluşturmaktadır. Sonraki adımda prokaspaz-8 aktifleşerek, kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük altünitenin ayrılmasına, böylece enzimin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bu yolak kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden mitokondriyal yolak ile birleşerek apoptoz sinyalini güçlendirmektedir (Kuwano 2007).

İkincisi ise, mitokondriyal bir yolaktır ve aynı zamanda intrinsik yolak da denilmektedir. DNA hasarını da içeren çeşitli hücrel streslere cevap olarak aktive olur. Bu yolağın ayırıcı özelliği mitokondriyal tutulum ve apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonunu içermesidir (M De Falco 2005). Hücre içi sinyal bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini uyararak mitokondriye göçünü sağlarken, pro-apoptotik üyeler dış mitokondriyal membrana yerleşerek burada porlar oluşturmaktadır. Bu porlar mitokondriden sitokrom-c ayrılmasına olanak sağlar. Sitokrom-c, Apaf-1, ATP, dATP ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozomu oluşturur. Oluşan apoptozom kaspaz-3'ü aktive eder. Başlangıçları farklı olmakla birlikte, her iki yol kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Apoptoz mekanizması
(<https://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter>)

Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirmektedir (Tsujimoto 1998).

p53

p53 apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ile hücre bölünmesi durdurularak hasarın tamiri için zaman kazandırılır ya da hasar onarılamayacak düzeyde ise hücre apoptozu yönlendirilir (Fisher 1994).

Kaspazlara ek olarak bir serin proteaz olan granzim-B gibi başka proteazlar da kaspaz aktivasyonunda görev alır ve bazen de kaspazların yerine fonksiyon görerek apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apopitoz yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral infeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Kiess ve Gallaher 1998). Apopitoz tanısına özgü bazı aktivasyonların belirlenmesi için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler Çizelge 1.3'te verilmiştir. Apopitozun belirlenmesine yönelik geliştirilen metodlar, apoptotik epitelyal hücrelerde bulunan kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorlar kullanılarak daha spesifik olarak saptama yapılmasını sağlamıştır.

Çizelge 1.3. Apopitozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apopitozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	
Morfolojik görüntüleme yöntemleri	Işık mikroskobu kullanımı Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı Elektron mikroskobu Faz kontrast mikroskobu
İmmünohistokimyasal yöntemler	Anneksin V Yöntemi TUNEL Yöntemi M30 Yöntemi Kaspaz Yöntemi
Biyokimyasal yöntemler	Agaroz Jel Elektforezi "Western" Blotting "Flow" Sitometri
İmmünolojik yöntemler	ELISA: (DNA fragmentasyonu, M30 düzeyi) Flourimetrik Yöntem
Moleküler biyoloji yöntemleri	"DNA Microarrays"

Kaspaz aktivasyonu hastalıklarda hücre hasarının bir belirteçdir. Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 ekspresine ettiği bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler. Yine aynı yöntemle farklı kaspazların antikoru kullanılarak bu kaspazların aktiflikleri immünohistokimyasal olarak değerlendirilebilir.

Sitokeratin-18 (CK-18) hepatositlerin başlıca sitoplazmik ara filament proteinidir ve apoptoz esnasında spesifik olarak fragmente olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar apoptotik kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ile kesilmiş serum CK-18 (M30 antijen) düzeyinin karaciğer hastalıklarında karaciğer hasarını anlamlı bir şekilde yansıtabileceği göstermiştir. M30 antijen düzeyinin plazmada ölçümü biyokimyasal bir parametre olarak sıkça kullanılmaktadır.

1. 6. Antioksidanlar

Normal fizyolojik şartlarda, hücreler oluşan serbest radikal ürünlerinin belirli bir düzeyin altında tutulması ve onların neden olduğu oksidatif hasarların engellenmesi için enzimatik ve nonenzimatik yapılardan oluşan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Hücreler bu sayede serbest radikallerden ve lipid peroksidasyonundan korunurlar (Thomas 1995.).

Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılırlar. Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemlerden başlıcaları antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dir. Non enzimatik antioksidan savunma sistemleri ise glutatyon (GSH), vitamin A, C, E, melatonin, en çok bilinenler arasında sıralanabilir (Aydın ve ark. 2001).

Antioksidanlar etkilerini temel olarak iki şekilde gösterirler; (Winston 1991, Murray ve ark. 1993, Hermes-Lima ve ark. 2001).

A- Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

- 1- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak
- 2- Oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak
- 3- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak

B- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

- 1- Toplayıcı etki: ROS'ları etkileyerek onları tutmaya ve daha az reaktif başka moleküllere çevirmeye yönelik etki (enzimler).
- 2- Bastırıcı etki: ROS'lar ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki (flavonoidler, vitaminler).
- 3- Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması
- 4- Zincir kırıcı etki: ROS'ları ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler).

Özellikle enzimatik savunma sistemleri reaktif oksijen türevleri (ROS), reaktif nitrojen türevleri (RNT) ve bunların ara ürünlerini ortadan kaldırma ya da süpürme yeteneğine sahip molekülleri içerirler (Mruk ve ark. 2002).

Antioksidanlar vücutta özellikle protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi yapısal ve fonksiyonel moleküllerin hasarlanmasına engel olan, düşük konsantrasyonlarda bile oksidan denen substratlara karşı etkili olan maddelerdir (Vinson 2006). Yapılan çalışmalar antioksidan tüketimindeki artışla birlikte, serbest radikal mekanizması üzerindeki etkinin arttığını, daha uzun ve kaliteli bir yaşam sağlandığını ortaya koymuştur (Meydani 1999).

1.7.Nigella sativa (Çörek otu)



Resim 1.1. Nigella sativa çiçeği ve tohumu

Nigella sativa bitkisinin sistematığı (Tanker ve ark. 2007).

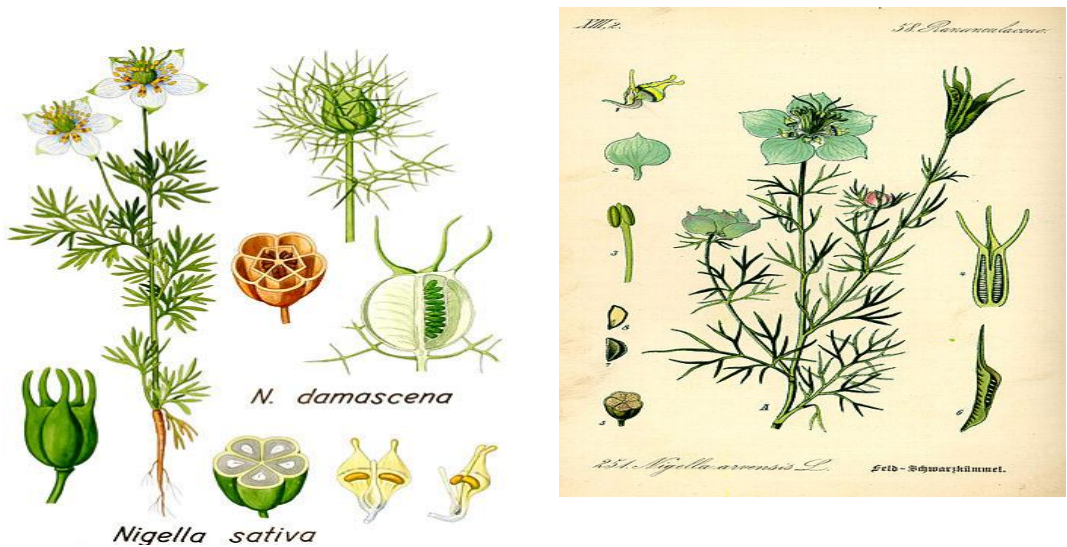
- Alem:** Plantae
Şube: Spermatophyta
Altşube: Angiospermae
Sınıf: Dicotyledonae
Takım: Ranales
Familya: Ranunculaceae
Cins: Nigella
Tür : Nigella sativa L.

Tek senelik otsu bitki olan çörek otu, dikine inen iplik şeklinde bir kök sistemine sahiptir. Az veya çok dallanan gövdesi 20- 40 (60) cm arasında olup, az veya çok tüylüdür. Esas yapraklar alternat (yaprakların karşılıklı değil aralıklı olarak sağda ve solda yerleşmiş olması) dizilişte olup, üçlü bir durum gösterirler. Alt yaprakları saplı, üst yapraklar ise sapsız durumdadır. Renkleri açık yeşildir. Çiçek rengi beyaz ya da açık veya koyu mavi olabilir. Meyvesi çok tohumlu olup 5 fonikulumun tepeye doğru birleşmesinden meydana gelmiş bir kapsül şeklindedir.

Nigella sativa'nın kullanılan kısmı tohumudur (Resim 1.1). Mat siyah renkli 3-4 köşeli olan tohum, 2.5-4 mm uzunlukta 1.5-2.0 mm genişlikte ve 1 mm kalınlıktadır. Sıcak, besin maddelerince zengin topraklar *Nigella sativa* yetiştiriciliği için uygundur. Özellikle kumlu-tınlı topraklarda iyi yetişir. Meyve kabuğu siyahlaşmaya başladığı zaman hasat edilir (Ceylan 1983).

Bitki, ismini tohumlarının siyah renginden almıştır. 'Nigella' kelimesi Latince siyahımsı anlamına gelen 'nigellus'dan türetilmiştir. *Nigella sativa* bitkisinin Türkçe karşılığı olarak çörek otu; kara çörek otu ve siyah kimyon isimleri ile de anılmaktadır. Çörek otunun anavatanı Doğu Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Güney Avrupa'dır. Çörek otu diğer ülkelere buradan yayılmıştır. Bu bitkinin ikinci vatanının Kuzey Afrika, Hindistan ve Türkiye olduğu söylenebilir. Bu bitki, Türkiye'de bilhassa Afyon, Burdur, Isparta, Kütahya ve Konya yörelerinde üretilmektedir (Baytop 1984). Günümüzde Güney Avrupa, Rusya, Kuzey Afrika, Ortadoğu ülkeleri ve Hindistan'da çörek otu büyük ölçüde üretilmekte ve tüketilmektedir (Türker ve ark. 1997).

Türkiye'de 14 *Nigella* türü yetişmektedir. Çoğunun kimyasal ve farmakolojik özellikleri henüz incelenmemiştir. Bunlardan *Nigella sativa*, *Nigella Damascena* (Şam çörek otu) ve *Nigella Arvensis*'in (kır çörek otu) tohumları halk hekimliğinde ve baharat olarak daha yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Resim 1.2). Ülkemizde tarımı yapılan ve ticarete konu olan tek tür, yalnızca Black cumin, *Nigella sativa* L.dir (Seçmen ve ark. 2000).



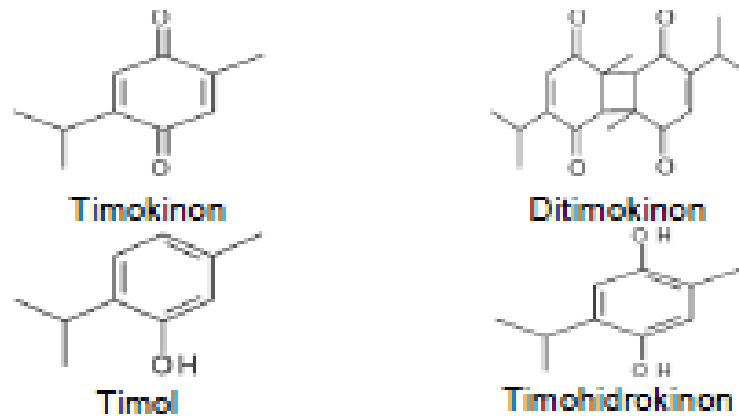
Resim 1.2. *Nigella sativa*, *Nigella Damascena* ve *Nigella Arvensis*

1. 7. 1. Nigella sativanın Kimyasal İçeriği

Çörek otu tohumunun kimyasal içeriği bitkinin yetiştirildiği bölgeye, hasat mevsimine, çeşidine ve iklime göre değişmektedir. Nigella sativa tohumları, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler, mineraller, ve 9 esansiyel amino asidin sekizini içeren proteinler ihtiva etmektedir (Chun ve ark. 2002). Nigella sativa tohumun SDS PAGE ile fraksiyonlanması sonucunda molekül kütleleri 94 – 10 kDa aralığında değişen bir dizi protein bandı elde edilmiştir (Haq ve ark. 1999).

Nigella sativa tohumları, uçucu yağ (% 0,38- 0,49), sabit yağ (% 30- 40), protein (% 20- 30), saponin, melantin, nigellon ve tanen ihtiva eder. Ülkemizde yapılan bir araştırmada; çörek otu tohumlarında % 6,4 su, %4 kül, % 32 yağ, % 20,2 ham protein, % 6,6 ham lif ve % 37,4 karbonhidrat bulunduğu belirlenmiştir. Sabit yağın; % 1,2 miristik, % 8,4 palmatik, %2,9 stearik, %17,9 oleik, % 60,8 linoleik, az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerden oluştuğu bildirilmiştir (Nergiz ve Ötleş 1993). Monosakkaritlerden glukoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz içerdikleri bildirilmiştir (Rouhou ve ark. 2007).

Nigella sativa yağının HPLC analizi ile en aktif maddesi olan timokinon (TQ) ve ditimokinon (DTQ), nigellon, timohidrokinon (THQ), timol (THY) (Şekil 1.9), karvakrol α ve β pinen, d-limonen, p-cymen, d-citronellol, 2-(2-metoksipropil)-5-metil-1, 4-benzendiol izole edilmiştir (Salem 2005).



Şekil 1.9. Nigella sativa yağının temel bileşenleri

Doymamış ve esansiyel yağ asitleri bakımından zengin *Nigella sativa* tohumları yağ asidi profili incelendiğinde, linoleik asidinin *Nigella*'da en bol bulunan doymamış yağ asidi olduğu görülmüştür (Mahmoud ve ark. 2002, Nickavar ve ark. 2003). *Nigella sativa*'da bulunan temel fosfolipid sınıfları fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinisitoldür (El-Mahmoudy ve ark. 2002). Ayrıca az miktarda B1, B2 ve B6 vitamini, organizmada önemli metabolik faaliyetlerde rol alan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken demir, kalsiyum, magnezyum, çinko ve selenyum gibi mineralleri de ihtiva etmektedir (Mahfouz ve El-dakhakhny 1960).

Ülkemizin Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen çörek otu tohumları yağ asidi, vitamin ve eser element içerikleri yapılan bir çalışmayla belirlenmiştir (Vatansev ve ark. 2013). Bu içerikler Çizelge 1.4., 1.5. ve 1.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. *Nigella sativa* L. Yağ Asidi İçeriği (Vatansev ve ark. 2013).

Yağ Asidi	%
Palmitik C16:0	5.4
Stearik C18:0	1.1
Oleik C18:1	23.5
Linoleik C18:2	66.5
Linolenik C18:3	0.8
Eikosadienoik 20:2	2.7
Total ansature yağ asidi	93.5
Total sature yağ asidi	6.5

Çizelge 1.5. *Nigella sativa* L. Eser Element Düzeyleri ($\mu\text{g/g}$ kuru madde)

Co	Ni	Fe	Zn	Cu	Mn	Cr
0.12 \pm 0.02	1.489 \pm 0.125	117.32 \pm 18.7	41.42 \pm 5.8	30.26 \pm 4.5	28.56 \pm 2.5	2.55 \pm 0.18

Çizelge 1.6. *Nigella sativa* L. Vitamin Değerleri ($\mu\text{g/g}$ kuru madde)

α -tocopherol	δ -Tocopherol	Retinol	Vitamin D2	Vitamin K1	Vitamin K2
10.19	2.28	0.18	1.38	1.85	2.15

1. 7. 2. Nigella Sativanın Etkileri

1. 7. 2. 1. Solunum Sistemine Etkisi

N. sativa tohumları ve yağı astım tedavisi için sıklıkla kullanılmaktadır. Nigellonun bronşiyal astım için mükemmel bir profilaktik madde olup yetişkinlere oranla çocuklarda daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Randhawa ve Al-Ghamdi 2002). Astıma karşı N. sativanın iyileştirici ve koruyucu etkileri anti-histaminik özelliğine bağlı olabilir (Chakarvarti 1993). N. sativa uçucu yağı doza bağımlı olarak, mepiramin, atropin ve rezerpin ile antagonize olan solunum hızı ve intra-trakeal basınçtaki artışı indükler(El-Tahir K ve ark. 1993). Kuveytte N. Sativa ekstresi burun kanamalarında doğal yağ ile birlikte kullanılmaktadır (El-Kadi ve Kandil 1986).

1. 7. 2. 2. Kardiyovasküler Sisteme Etkisi

N. sativa tek başına ya da bal veya sarımsak ile bir arada hipertansiyonun tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağ ve thymoquinone arteriyel kan basıncı ve kalp hızında doza bağlı bir azalma oluşturmaktadır. Nigella sativa tohumlarının ekstresi ile yapılan bir çalışmada hipertansiyonlu farelerde hipotansif etki araştırılmıştır. Farelere 0,6 mL/kg dozda oral olarak Nigella sativa ekstresi 15 gün boyunca verilerek ekstrenin, idrar sıklığını % 16-30 oranında artırdığı; Cl⁻, Na⁺, K⁺ ve ürenin idrarla atılmasının da arttığı gözlenmiştir. Ayrıca arteriyel kan basıncının % 22 oranında düştüğü saptanmıştır. Nigella sativa tohumlarının hipotansif etkisinin diüretik özelliğinden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Zaoui ve ark. 2000).

1. 7. 2. 3. Üriner Sisteme Etkisi

Gentamisin ile indüklenen toksisitede Nigella sativa yağı ile yapılan tedavi, nefrotoksitenin biyokimyasal ve histolojik parametrelerinde doza bağımlı iyileşme sağlamış, ayrıca iyileşmeye, renal korteksteki GSH konsantrasyonu ve toplam antioksidan düzeyinde artış gözlenmiştir (Yaman ve Balıkçı 2010). Doksorubisin ile indüklenen nefropatide proteinüri ve hiperlipidemi ile ilişkili nefrotik sendrom için Timokinonun koruyucu bir madde olarak kullanılabilceği önerilmiştir (Badary O ve ark. 2001)

1. 7. 2. 4. Gastrointestinal Sisteme Etkisi

N. sativa, karın ağrılarında, gaz giderici ve müshil ilacı olarak kullanılmıştır (Gilani ve ark. 2004). N. sativanın alkolik ekstresinin pilor ligasyonu ve aspirin ile oluşturulan gastrik ülser modellerinde antiülser etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Raj Kapoor ve ark. 2002). N. Sativa yağının gastroprotektif etkisi gastrik lezyonlara karşı gastrik mukozal redoks durumunun korunması ile ilgili olabilir (El-Abhar ve ark. 2003).

N. sativanın, anti-ülser etkisi muhtemelen prostaglandin aracılı ve / veya antioksidan ve anti-sekretuar aktiviteleriyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Al Mofleh ve ark. 2008).

1. 7. 2. 5. Santral Sinir Sisteme Etkisi

Nigella sativa tohumlarının sulu ve metanollü ekstresi, genel davranış biçimlerinde bir değişiklik, anlık hareketlilikte önemli azalışlar, vücut sıcaklığında düşüş, hot plate ve basınç testlerinde önemli analjezik etki, santral sinir sistemi üzerinde sakinleştirici etki ve kas gevşetici gibi santral sinir sistemini baskılayıcı etkileri bulunmuştur (Al-Naggar ve ark. 2003).

Yapılan çalışmalarda Timokinon oksidatif stresi inhibe ederek santral sinir sisteminin demiyelinizan hastalıklarında deneysel alerjik ensefalomyelitli hayvanlarda gelişme sağlamıştır. Böylece timokinonun Multiple Skleroz tedavisindeki rolü düşünülebilir (Mohamed ve ark. 2003).

1. 7. 2. 6. Anti-Diyabetik Etkisi

Diabetes Mellitus, birçok etiyojisi olan karmaşık bir metabolik bozukluktur. İnsülin sekresyonunun bozulması, insülinin etki mekanizmasının bozulması veya her iki durumun da aynı anda ortaya çıkmasıyla, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarını etkileyen, kronik hiperglisemi ile karakterize edilmektedir.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş farelere verilen N. sativa yağının hipoglisemik etki oluşturduğu ve bunun da kısmen hepatik glikojenezisdeki bir azalıştan kaynaklandığı bildirilmiştir (Fararh ve ark. 2004).

1. 7. 2. 7. İmmün Sisteme Etkisi

Günde bir gram *N. sativa* iki kez gönüllü insanlarda uygulanmış ve T hepler hücrelerin (T4), T süpressör hücrelere (T8) oranını %72 artırmış ve naturel killer hücre aktivitesini artırmıştır. Ancak, immunglobulin (IgA, IgG ve IgM) düzeyleri azalma olduğu gözlenmiştir (Omar ve ark. 1999).

Farklı bir çalışma ile *Nigella sativa* tohumunun, T lenfosit ve total lökosit değerlerinde anlamlı bir artış yaptığı gösterilmiş ve çörekotu tohumunun insan bağışıklık sistemini güçlendirebileceği sonucuna varılmıştır (Kaya ve ark. 2003).

Nigella sativa yağı ve Timokinon ile yapılan çalışmada ise ikisininde T lenfosit hücrelerine ve immün cevaba aracılık eden Natural killer hücrelerinin artışını sağlayarak önemli oranda immünomodülatör etki gösterdiği bildirilmiştir (Salem 2005).

1. 7. 2. 8. Anti-İnflamatuvar Etkileri

Reaktif oksijen türleri, doku harabiyetine sebep olan bol miktarda toksik oksidatif reaksiyonlar başlatmaktadır. *Nigella sativa*'nın anti-inflamatuvar aktiviteleri hücrel NO oluşturma kapasitesinin inhibisyonu yolu ile açıklanmaktadır. Pekçok dokuda nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-argininden sentezlenen NO çoğu inflamatuvar hastalıkla ilişkilidir. Tunus'tan toplanan *Nigella sativa* tohum yağı ve bileşenleri üzerinde bir çalışma yapmış ve bu çalışmaya göre *Nigella sativa* yağı LPS-indüklü NO sekresyonunu %90 oranında, *Nigella sativa*'nın temel aktif bileşeni timokinonun ise NO üretimini %95 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir (Bourgou ve ark. 2010). Timokinonun NO üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi uyarılabilir ROS mRNA'sı ve protein ekspresyonunu azaltma yoluyla gerçekleştiği öne sürülmüştür (El-Mahmoudy ve ark. 2002).

1. 7. 2. 9. Antiülser Etkisi

Nigella sativa yağının gastrik sekresyon ve farelerde etanol ile indüklenen ülser modelindeki etkileri araştırılmış ve *Nigella sativa* yağının farelerde etanolun neden olduğu ülserlere karşı koruyucu bir etki sağladığı öne sürülmüştür (El-Dakhak ve ark. 2000).

1. 7. 2. 10. Anti-Mikrobiyal Etkileri

S. masonili farelere Nigella sativa yağıyla muamele edilmesiyle karaciğerdeki S. masoni kurtlarının sayısının azaldığı, karaciğer ve bağırsaktaki yumurta miktarının düştüğü görülmüştür. Bu farelere Nigella sativa yağı verilmesi ile serum albumin düzeyi ile ALT, ALP ve GGT aktiviteleri gibi enfeksiyona bağlı biyokimyasal ve patolojik değişimleri ortadan kaldırmıştır (Mahmoud ve ark. 2002). Tunus'tan toplanan Nigella sativa tohumlarının yağı ve bileşenlerinin S. aureus ve E. coli üzerinde antibakteriyel özelliği bulunduğu bildirilmiştir (Bourgou ve ark. 2010).

1. 7. 2. 11. Antikoagulan Etkisi

N. sativa ekstresi kullandıktan sonra ratlarda kanama zamanında önemli bir kısalma gözlenmiştir. Ancak, trombin süresi ve protrombin süresi üzerinde önemli bir etkisi olmazken parsiyel tromboplastin zamanı kısalmıştır. Farklı bir çalışmada ise N. sativa tavşanların kan pıhtılaşma süresi ve plazma pıhtılaşma süresini kısaltmıştır (Salama 2010).

1. 7. 2. 12. Antioksidan Savunma Sistemine Etkisi

Son zamanlarda Nigella sativa tohumları, yağı ve etken maddeleriyle yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla Nigella sativanın antioksidan özellikleri ortaya konulmuş ve oksidatif hasarın sebep olduğu birçok hastalığın engellenmesinde ya da tedavisinde faydalı olabileceği savunulmuştur. Tunus'taki çörekotu tohumlarının yağı üzerinde yapılan çalışmada Nigella sativa yağının ROS üretimini belirgin biçimde inhibe ettiği tespit edilmiştir. ROS inhibisyonu hücreleri oksidatif stresten korumaktadır (Bourgou ve ark.2010).

Yapılan in-vitro çalışmalarla, Nigella sativa tohum ekstresinin yılan ve akrep zehirlerinin hemolitik etkisini önlediği, eritrositleri lipit peroksidasyonuna, protein denaturasyonuna, H₂O₂'nin sebep olduğu artan ozmotik kırılma ve laringeal karsinoma hücrelerini, lipopolisakkarit veya kortisol tarafından indüklenen apoptozisten koruduğu gösterilmiştir (Salem ML. 2005)

1. 7. 2. 13. Anti-Histaminik Etkisi

Bronşial astım, atopik ekzama, allerjik iç burun iltihabı gibi allerjik hastalığı bulunan bireylerde, *Nigella sativa* yağı uygulanmasının IgE, eosinofil sayısı, plazma ve idrardaki endojen kortizol miktarının düşmesine sebep olduğu bildirilmiştir (Kalus ve ark. 2003).

Ülser indüksiyonundan önce *Nigella sativa* yağı verilen sıçanların ve verilmeden ülser indüklenen sıçanların gastrik mukozadaki histamin miktarları ölçülmüş ve önceden *Nigella sativa* yağı ile muamele edilen sıçanların gastrik mukozadaki histamin içerikleri daha düşük bulunmuştur. *Nigella sativa* yağıyla muamelenin, gastrik mukozadan histamin salınmasına karşı % 53.56 oranında koruyucu etki gösterdiği savunulmuştur (El Dakhakhny ve ark. 2000).

1. 7. 2. 14. Anti-Tümör Etkisi

Yapılan birçok çalışma ile *Nigella sativa* tohumlarının ve aktif bileşenlerinin anti-tümör etkileri gösterilmiştir. *Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin in vitro anti-tümör etkileri, farklı tümör modelleri üzerinde yapılan in vivo çalışmalarla teyit edilmiştir. İn vitro sitotoksik bir çalışmada *Nigella sativa*'nın ham metanol ekstraktının Ehrlich Assit Karsinomu, Dalton lenfoma ve Sarkoma-180 hücreleri üzerinde yaklaşık %50 oranında sitotoksik etki yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca *Nigella sativa* yağının topikal uygulanmasının farelerde kroton yağı ile indüklenmiş deri kanserinin başlama ve artmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Salomi ve ark. 1992). *Nigella sativa* yağının tümör boyutunu küçültmekte, karaciğer metastazını engellemekte ve P815 mastositoma tümör taşıyan farelerin ölümünü geciktirdiği bildirilmiştir (Mbarek ve ark. 2007).

1. 7. 2. 15. Toksik Etkisi

N. sativa tohumların sabit yağının toksisitesi LD 50 değerlerinin belirlenmesi ve olası biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değişikliklerin incelenmesi yoluyla fare ve ratlarda araştırılmıştır. Yüksek LD50 değerleri tarafından düşük toksisite kanıtlanmış, önemli karaciğer enzimlerinin stabilitesi ve organ bütünlüğü *N. sativa* tohumların sabit yağı için tedavi dozlarında geniş bir güvenlik marjı önermekte olduğu bildirilmiştir (Zaoui A. ve ark. 2002).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar, Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji-Genetik-Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalları Araştırma Laboratuvarları ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Metabolizma-Araştırma ve Rutin Laboratuvarlarında yapılmıştır.

2. 1. Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlığı 200-300 g arasında değişen, 32 adet Wistar cinsi sağlıklı ratlar kullanıldı. Deney süresince hayvanlar, Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Ve Uygulama Merkezi laboratuvarında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ve 24°C kontrollü odalarda % 20 protein içeren kuru pelet yem ve su ad libitum verilerek beslendi. Deney hayvanları 4 gruba ayrıldı.

1. Kontrol Grubu (n=6)
2. Nigella Sativa Yağı Grubu (NSY) (n=6)
3. CCl₄ Grubu (CCl₄) (n=10)
4. CCl₄+Nigella Sativa Yağı Grubu (CCl₄+NSY) (n=10)

2. 2. Karaciğer Hasarı Oluşturulması

Çalışmamızda karaciğer hasarı oluşturulmak üzere kullanılan CCl₄, 1ml/1ml (1 birim CCl₄: 1 birim zeytinyağı) olacak şekilde zeytinyağı içerisinde çözdürülerek (Susan; 2002) yöntemine göre hazırlandı.

Kontrol Grubu: 14 gün boyunca her gün günde bir kez 0,4 mL/kg zeytinyağı intraperitoneal (i.p.) uygulandı. Deney bitiminden 24 saat sonra ketamin anestezisi ile ratların kalplerinden kan örnekleri alındı.

Nigella Sativa Yağı Grubu: 14 gün boyunca her gün günde bir kez 0,4 mL/kg Nigella sativa yağı (i.p.) uygulandı. Deney bitiminden 24 saat sonra ketamin anestezisi ile ratların kalplerinden kan örnekleri alındı.

CCl₄ Grubu : 14 gün boyunca hergün günde bir kez 0,4 mL/kg zeytinyağı (i.p.) uygulanıp 14. gün uygulamadan 1 saat sonra karbontetraklorür 1 mL/kg (ip.) uygulandı. Deney bitiminden 24 saat sonra ketamin anestezisi ile ratların kalplerinden kan örnekleri alındı.

CCl₄+ Nigella Sativa Yağı Grubu: 14 gün boyunca hergün günde bir kez 0,4 mL/kg Nigella sativa yağı (i.p.) uygulanıp 14. gün uygulamadan 1 saat sonra karbontetraklorür 1 mL/kg (ip.) uygulandı. Deney bitiminden 24 saat sonra ketamin anestezisi ile ratların kalplerinden kan örnekleri alındı.

Tüm gruplarda kanlar alındıktan sonra ratlar ketamin anestezisi ile sakrifiye edildi. Alınan kanlar 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi ve serumları ayrıldı. Serumlar ayrı ayrı eppendorf tüplere bölünerek -80°C'de saklandı. Karaciğer dokuları % 0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra, immünohistokimyasal çalışmalar için formaldehitte, biyokimyasal çalışmalar için ise sıvı azotda dondurularak -80°C'de saklandı.

2. 3. Kullanılan Cihazlar

Otoanalizör (Architect 1600)

Benmari (BM 302)

Elisa okuyucu (RT-2600 Rayto)

Elisa çalkalayıcı (GFL 3017)

Buz makinası (Scotsman AF 100)

Santrifüj (Sigma)

Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter Mikrofuge 22R)

Etüv

Nuçe erleni

Degazer

HPLC (Agilent 1200)

Vorteks

Homojenizatör

Hassas Terazi

Frozen kesit için kreostat

Mikroskop (Olympus DP72)

pH Metre

Magnetik karıştırıcı, magnetik bar

0.45µm selülöz asetat filtre

2. 4. Kullanılan Kimyasallar

AST kiti (Abbott)

ALT kiti (Abbott)

LDH kiti (Abbott)

nükleaz P1 (Sigma N 8630)

Alkalen Fosfataz (Merck Millipore 524572)

8-hidroksi-2-deoksiguanozin (EIA Kit Cayman 589320 USA)

M30 (EIA Kit Eastbiopharm CK-E90547)

Sodyum asetat (Merck 106268)

Sitrat (Merck 100244)

Saf metanol (Merck 106008)

3-Nitro-L-Tirozin (N 7389)

HCL (Merck 100317)

TCA (Merck 100807)

NaOH (Merck 106498)

Formaldehit (Sigma- Aldrich F8775)

Aseton (Sigma 179124)

Goat serum (Abcam ab 7481)

Twen 20 (Sigma- Aldrich P228)

Glisin (Merck 104201)

Kaspaz 3 primeri (Abcam ab 4051)

Kaspaz 9 primeri (Abcam ab 4053)

Sekonder antikör (Texas Red sc-2780)

Mounting Medium(sc-24941)

2. 5. Biyokimyasal Analizler

2. 5. 1. Karaciğer fonksiyon testleri

-80°C’de muhafaza edilen serumlar oda ısısında çözülerek AST, ALT ve LDH düzeyleri otoanalizörde ölçüldü ve U/L olarak birimlendirildi.

2. 5. 2. Karaciğer Dokusunda 8-OHdG Ölçümü

DNA İzolasyonu:

-Nüklei lizis solüsyonu hazırlanması

- Tris EDTA, pH 8,0 1ml
- 5M NaCl 8ml
- 0,5M EDTA 0,4ml
- dH₂O ile 100ml’ye tamamlanır.

Metod

1. -80°C’de saklanan karaciğer dokusundan 0,5 mm çapında parça alınarak 1ml distile su içersinde bistüri ile daha küçük parçalara ayrıldı. Üzerine 850 µl nüklei lizis ve 10µg /ml proteinaz K eklendi.
2. Vortekslenerek bir gece 65° C’de inkübe edildi.
3. 850 µl kloroform eklenip vortekslendi.
4. Karışım 1,5-2,0 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı.
5. 10000 rpm’de 3 dk. santrifüj edildi.
6. Süpernetant içersinde 1ml %96’lık alkol bulunan ependorf tüpe aktarıldı.
7. Alt-üst edilip, DNA görünür hale geldi.
8. DNA gözle görünür hale geldikten sonra 13000 rpm’de 3.dk santrifüj edildi.
9. Süpernetant dökülüp %70’lik alkolde yıkandı.
10. 13000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernetant dökülerek kurutma kağıdında kurutuldu.
11. Üzerine 200-300 µl steril distile su eklendi.
12. Vortekslenip oda ısısında 37° C’de 1-2 saat inkübe edildi.
13. Tekrar vortekslendi ve kullanıncaya kadar -20° C’de muhafaza edildi.

İzole edilen DNA, nükleaz P1 ile parçalandı. 1 M Tris ile pH’sı 7,5-8,5 olacak şekilde ayarlandı. Her örneğe 1 ünite Alkalen Fosfataz eklendi ve 37° C’de 30 dakika inkübe edildi. 10 dakika 95° C’de kaynatıldı ve kullanılıncaya kadar buzda bekletildi.

Hazırlanan ekstraktlarda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin analizi, 8-OHdG monoklonal antijeninin (Anti 8-OHdG) örnek, standart veya önceden kaplanmış kuyucuklarına bağlanmamış 8-OHdG'lere yarışmalı olarak bağlanma özelliğinden yararlanarak hazır ticari kit (8-hidroksi-2-deoksiguanozin EIA Kit) kullanılarak yapıldı ve 405 nm'de okutuldu. Curve Fit programı ile hesaplanan veriler pg/ml olarak verildi.

2. 5. 3. Karaciğer Dokusunda 3-NT Ölçümü

2. 5. 3. 1. Karaciğer Dokularının Hazırlanması

Sıvı azotda dondurularak -80°C'de saklanan karaciğer dokuları, potasyum fosfat tamponu ile (1:3) homojenize edildikten sonra, 300 µL homojenata proteinleri çöktürmek amacıyla 300 µL TCA eklendi. Karışım vortekslendikten sonra 3000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar atılıp, çökeltiye hidroliz amacıyla 1 ml 6 N HCl eklendi. Her numune ortalama 1 dk kadar sonike edildikten sonra hidroliz tüplerine alındı ve 24 saat etüvde, 105°C'de bekletildi. Ertesi gün etüvden çıkarılan örnekler çeşme suyunda soğutuldu. 1ml 6N NaOH eklenerek vortekslendi, 5dk 3000rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant 0,45 µm'lik membran filtrelerden süzülerek HPLC sistemine verildi.

2. 5. 3. 2. Dokularda 3-NT Miktar Hesabı:

HPLC de elde edilen standart 3-NT değerlerine göre, numunelerin pik alanlarından numune 3-NT konsantrasyonları µmol/L olarak elde edildi. Elde edilen bu değerler, kullanılan doku miktarı için elde edilen 3-NT konsantrasyonunu ifade etmektedir. Buradan 1g doku için elde edilen 3-NT konsantrasyonu hesaplanarak, doku 3-NT miktarı nmol/g doku şeklinde verildi.

2. 5. 3. 3. Kullanılan Reaktifler

1.Mobil faz: 50 mM Sodyum asetat, 50 mM sitrat, % 8 saf metanol içerecek şekilde hazırlandı ve pH'sı 3.1'e ayarlandı. Hazırlanan mobil faz daha sonra 0.45 µm'lik selülöz asetat filtreden süzülerek degaze edildi.

2.3-Nitrotirozin Standardı: 23 mg 3-Nitro-L-Tirozin'in 0,01 N HCl içinde çözülmesiyle elde edilen 100 µM'lık stok standart taze olarak dilüe edilerek, 0,3125 - 0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 µM'lık standartlar hazırlandı.

3.Asit hidroliz reaktifleri: Dokuların asit hidroliz işlemleri için % 10'luk TCA, 6 N HCl, 6 N NaOH hazırlandı.

4.Fosfat tamponu: 50 mM hazırlandı pH:7,4'e ayarlandı.

2. 5. 3. 4. HPLC Sistemi

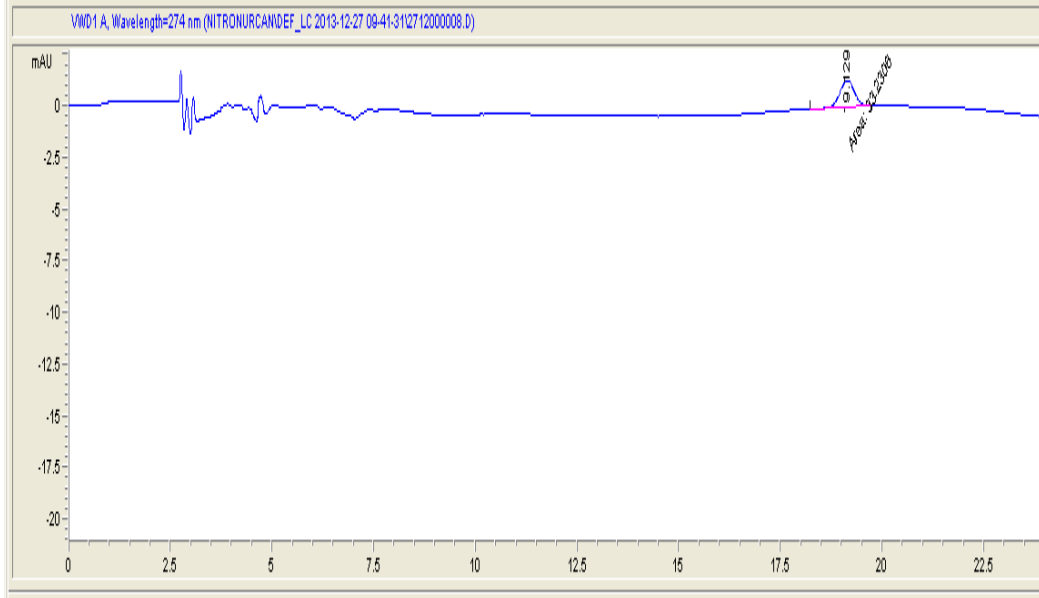
Kullanılan ölçüm programı çizelge 2.1'deki şekilde sisteme yüklendi. Sistem çalıştırılarak 24 saat süre ile kolondan mobil faz akışı sağlandı.

Çizelge 2.1. 3-NT tayininde kullanılan HPLC sistem parametreleri

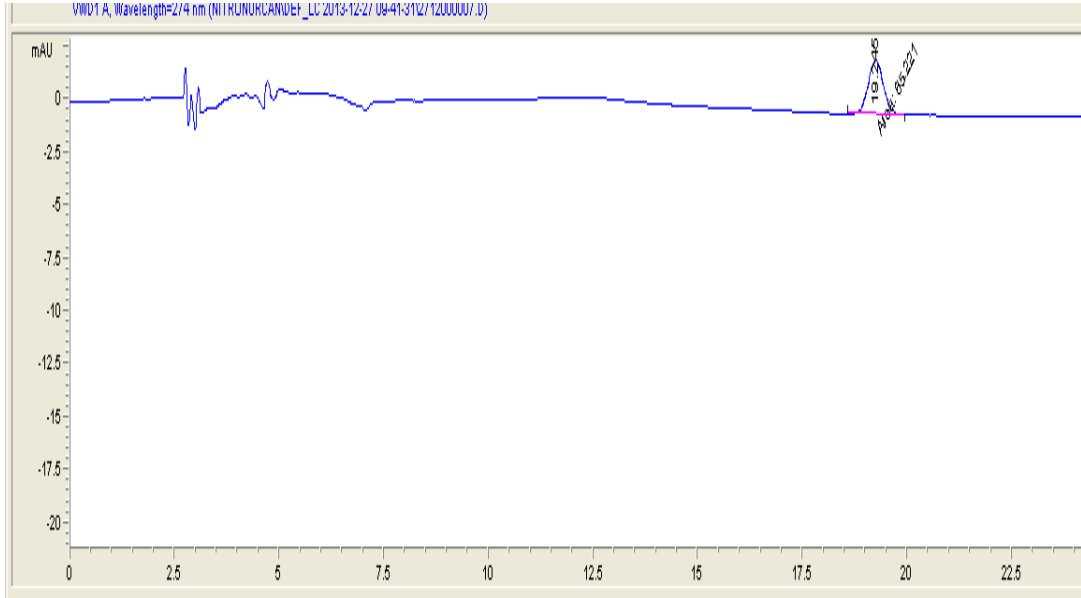
HPLC Modeli	Agilent 1200
Dedektör	uv
Mobil Faz	%8 Metanol içeren 50 mmol/L NaOAc / 50 mmol/L sitrat tampon, pH:3.1
Analitik Kolon	4.6. I.D.x 250 (mm)
Dalga boyu	274 nm
Akım Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Hacmi	70 µL
Çalışma Süresi	30 dakika
Sensitivite	0,1µmol/L
Numune Lopu	100 µL
Enjeksiyon sistemi	Rheodyne Injektör
Bilgisayar Ünitesi	Kromatografi programı ile donanımlı

2. 5. 3. 5. 3-Nitrotirozin Standart Ölçümleri ve Grafiği

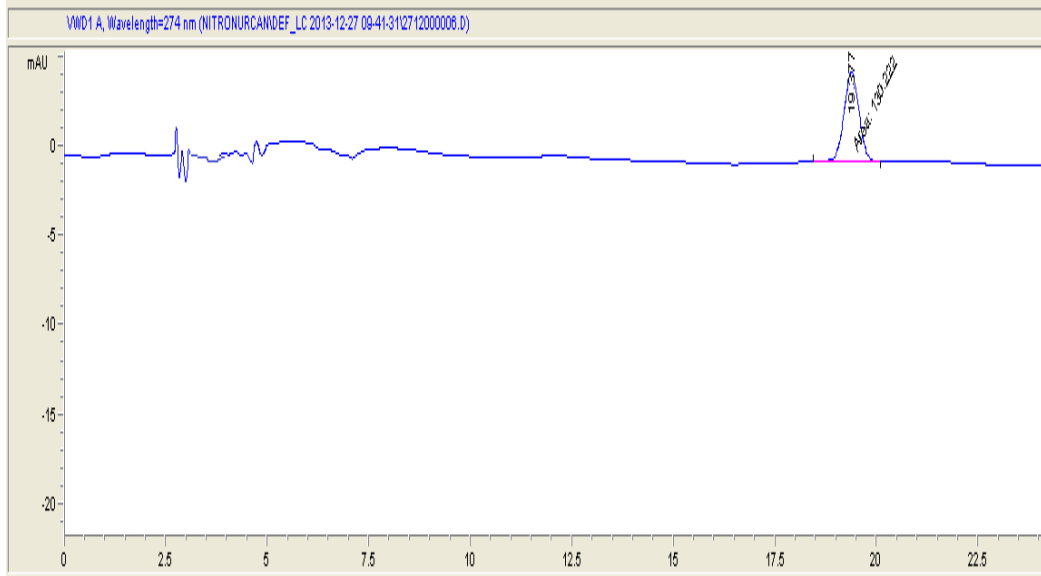
0,01 N HCl içinde hazırlanan 0,3125 - 0,625 – 1,25 - 2,5 - 5 - 10 μ M konsantrasyonlarındaki 3-nitrotirozin standartları otosampler ile HPLC sistemine verildi sonra, pikin ortaya çıkış zamanı numuneye standart eklenerek tespit edildi.



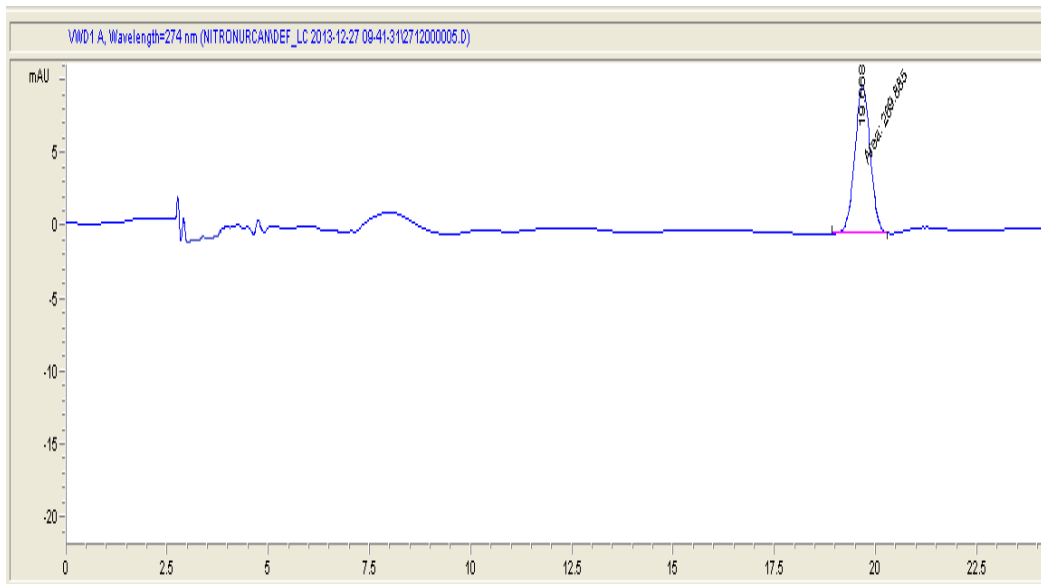
Şekil 2.1. 3-NT 1,25 μ M konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı



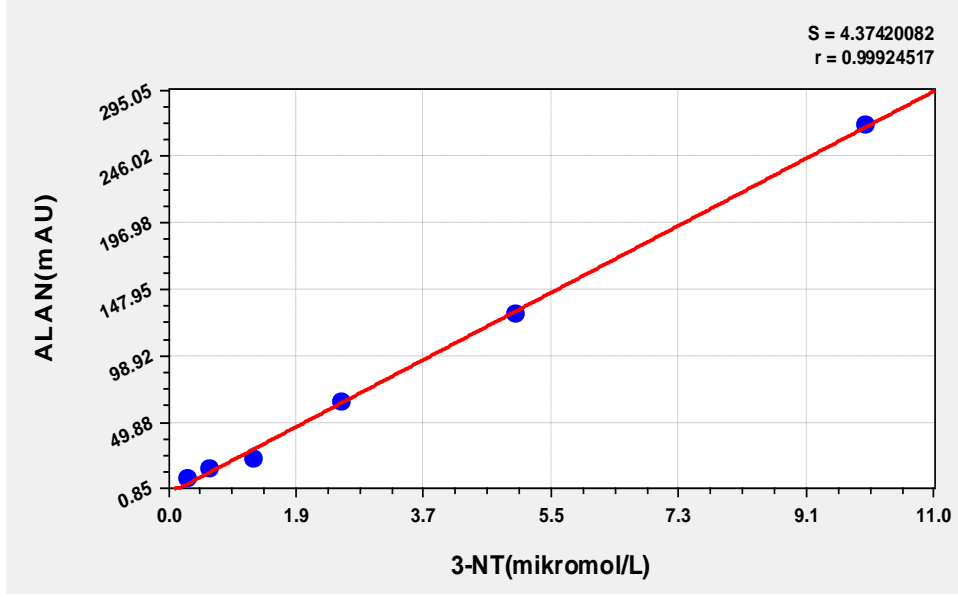
Şekil 2.2. 3-NT 2,5 μ M konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı



Şekil 2.3. 3-NT 5 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı



Şekil 2.4. 3-NT 10 µM konsantrasyonlarındaki standart kromatogramı



Şekil 2.5. 3-NT Standart eğrisi

Standart çalışmalarından elde edilen pik alanları esas alınarak, regresyon analizi yapılarak 3-NT standart eğrisi çizildi. Elde edilen standart 3-NT değerlerine göre, numunelerin pik alanlarından 3-NT konsantrasyonları hesaplandı.

2. 5. 4. Serumda M30 Ölçümü

Serum apoptotik M30 antijen düzeyi M30 (EIA Kit Eastbiopharm CK-E90547) ile kantitatif olarak tayin edildi.

2. 6. Karaciğer Dokularında Apoptotik Hücrelerin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitelerinin Belirlenmesi

%10'luk formol içinde saklanan karaciğer dokusundan küçük parçalar alınarak 3 gün süreyle %30 sükröz çözeltisinde bekletilerek poly-L-lysine kaplı lamalara 5 mikron kalınlığında kaspaz 3 ve kaspaz 9 için ayrı ayrı kreostat kesitler alındı. Postfiksasyon için, kesitler üzerine dokuyu örtecek şekilde aseton damlatıldı ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında tekrar aseton damlatılarak 5-10 dakika bekletildi. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandıktan sonra %0,1 PBS/Triton X-100'den damlatılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitlere nonspesifik ve yalancı pozitif işaretlenmeleri engellemek amacı ile: Goat serum, Tween 20 ve Glisin içeren blok solüsyonu damlatılarak 1-2 saat oda ısısında bekletildi. Bir kez PBS ile yıkandı ve üzerine kaspaz 3 için alınan kesite goat anti rabbit anti-kaspaz 3 ve kaspaz 9 için alınan

kesite goat anti rabbit anti-kaspaz 9 primer antikoru damlatılarak 1 gece +4°C'de bekletildi.

Ertesi gün %0,1 PBS/Tween 20 ile oda ısısında 3 kez 10'ar dakika yıkandı. Lamlara floresan konjuge (Texas Red) antirabbit IgG sekonder antikoru damlatılarak karanlık ortamda 1-2 saat oda ısısında bekletildi. Ardından yine karanlık ortamda 3 kez %0,1 PBS/Tween 20 ile 5'er dakika yıkandı. Lamlar DAPI'lı floresan kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar foto ataçmanlı floresan mikroskopta Texas Red ve UV filtreleri ile incelenip değerlendirmeler yapılarak görüntü alındı.

Histolojik olarak, apoptoz miktarı ya da oranı, apoptotik indeksle ifade edilmektedir. Bu indeks, apoptotik hücre sayısının canlı hücrelere yüzdesel oranı ile bulunmaktadır (Prieto ve ark, 2002). Floresans mikroskopla X40 büyütmede doku kesitlerinin rastgele farklı bölgelerinden hücre sayımı yapıldı. Floresan mikroskopun UV filtresi kullanılarak; çekirdekleri DAPI ile mavi floresan işaretlenen hücreler belirlendi ve sayımı yapıldı. Sayılan 100 hücre içinde Texas Red filtresi ile kırmızı floresan işaretlenen kaspaz 3 ve kaspaz 9 pozitif apoptotik hücre sayımları yapılarak apoptotik indeksleri hesaplandı [Apoptotik İndeks = (Apoptotik hücre sayısı/canlı hücre sayısı)x100].

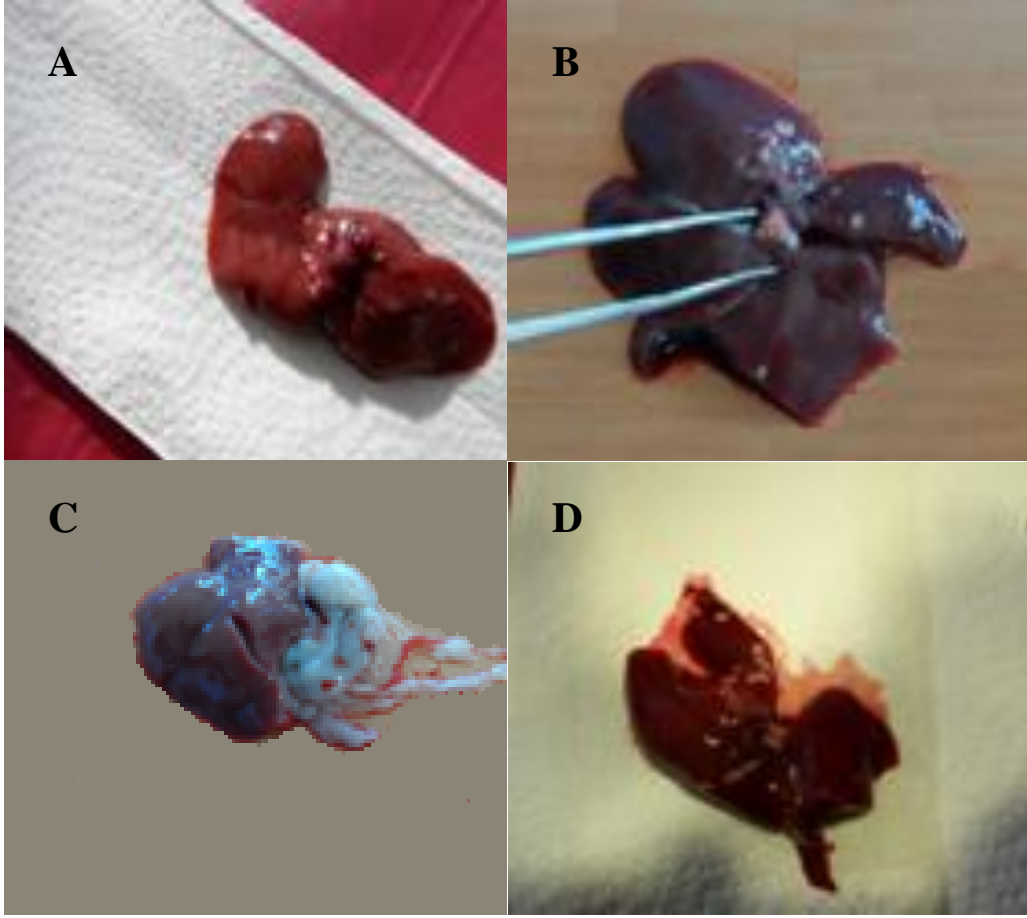
2. 7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Minitab-14 programı ile yapıldı. Normal dağılım Kolmogorov Simirnov testi ile belirlendi. Buna göre M30, 8-OHdG, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 sonuçları normal dağılım göstermedikleri için Non parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi ve farklılığın hangi gruplar arasında olduğu Mann-Whitney U Testi ile Bonferroni düzeltmesi yapılarak bakıldı. AST, ALT, LDH, 3-Nitrotirozin sonuçları ise normal dağılım gösterdikleri için parametrik Anova varyans analizi uygulandı ve Post Hoc Tukey HSD testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ anlamlılık derecesi olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3. 1. Karaciğer Dokusu Morfolojik Bulguları

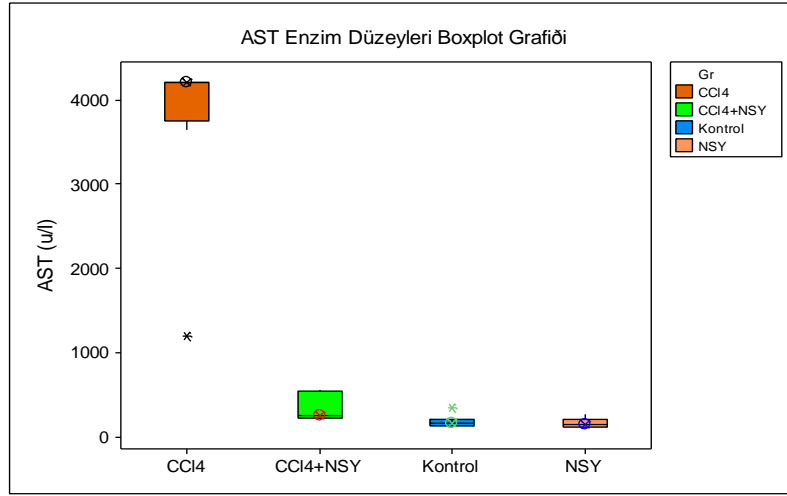
Karaciğer dokularının sakrifikasyondan sonraki makro görüntüleri incelendiğinde, CCl₄ uygulanan grupta belirgin bir dejenerasyon ve yağlanma olduğu, CCl₄ ile birlikte NSY verilen grupta yağlanmanın azaldığı gözlenmiştir. Sadece NSY verilen grupta ise yağlanma başladığı tespit edilmiştir. Grupların karaciğer görüntüleri Şekil 3.1’de verilmiştir.



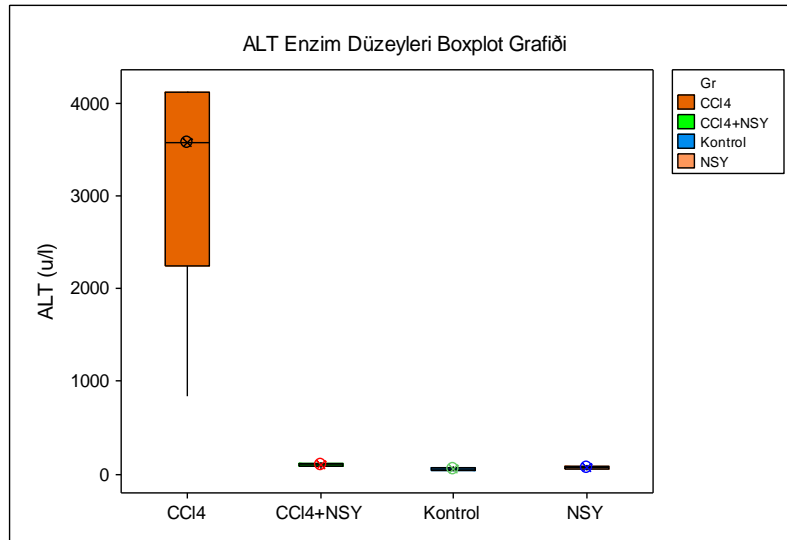
Şekil 3.1. Ratlardan alınan karaciğer dokuları **A:** Kontrol grubu karaciğer dokusu **B:** NSY grubu karaciğer dokusu **C:** CCl₄ grubu karaciğer dokusu **D:** CCl₄+NSY grubu karaciğer dokusu

3. 2. Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sonuçları

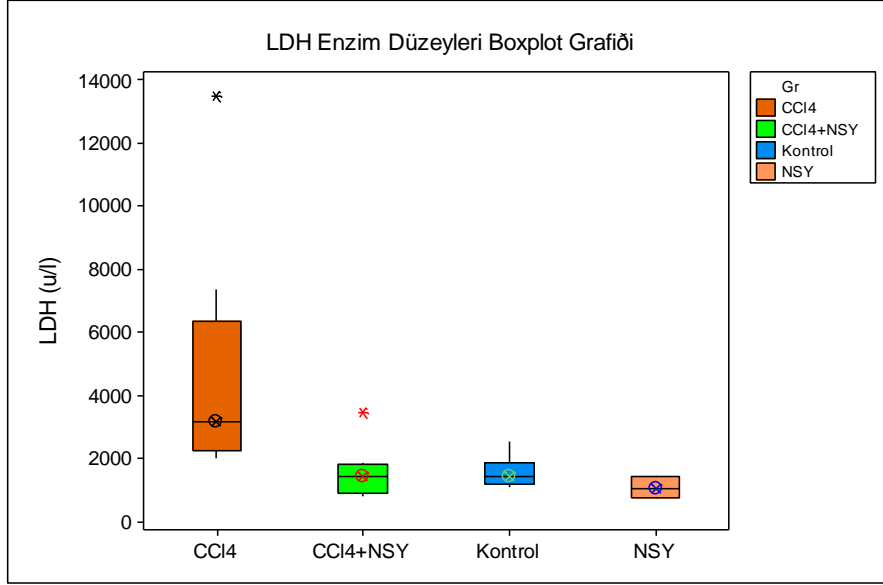
Otoanalizörle ölçülen enzim düzeyleri, CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre AST değerleri yaklaşık 25 kat, ALT değerleri 60 kat, LDH değerleri 2 kat artmış bulundu. CCl₄ ile NSY verilen grupta ise artan bu değerler kontrol grubuna yakın düzeylerde bulundu. Gruplar arası fark istatistiksel anlamlı bulundu. Boxplot grafikleri AST için Şekil 3.2’de, ALT için Şekil 3.3’de, LDH için Şekil 3.4’te, bu enzimlerin düzeyleri ve istatistiksel sonuçları çizelge 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kontrol ve deney gruplarının serum AST değerleri



Şekil 3.3. Kontrol ve deney gruplarının serum ALT değerleri



Şekil 3.4. Kontrol ve deney gruplarının serum LDH değerleri

Çizelge 3.1. AST, ALT ve LDH Sonuçları ve İstatistik

Gruplar	n	AST (U/L) Mean ± SD	ALT (U/L) Mean ± SD	LDH (U/L) Mean ± SD
Kontrol	6	189±81,221	61,83± 17,371	1566,83±539,480
NSY	6	172,33± 58,732 ^c	68,83±20 ^c	1083,33±305,2 ^f
CCl ₄	10	3992,50±373,901 ^{a,b,c}	3484,38± 831,364 ^{a,b,c}	3410±1,689 ^{d,e,f}
CCl ₄ + NSY	10	353,78±151,216 ^b	94,56± 21,755 ^b	1516,44±818,522 ^e

a: Kontrol- CCl₄ : p<0,001

b: CCl₄- CCl₄+ NSY : p<0,001

c: NSY- CCl₄ : p<0,001

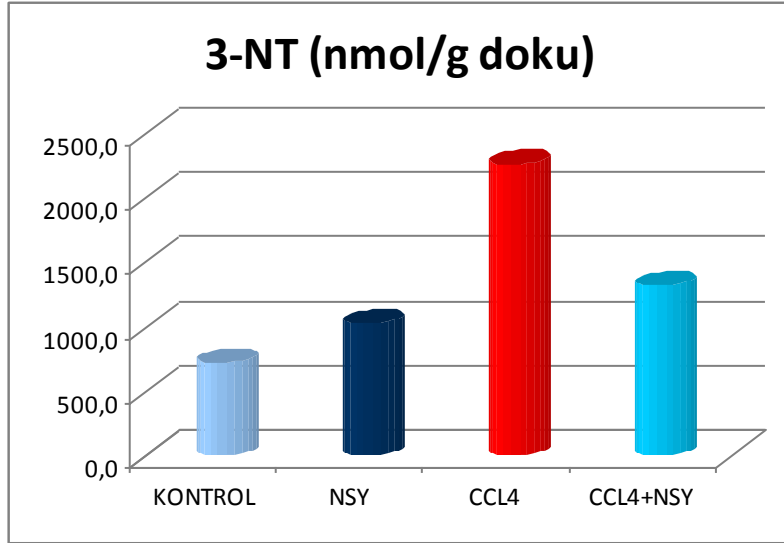
d: Kontrol- CCl₄ : p<0,016

e: : CCl₄- CCl₄+ NSY : p<0,005

f: NSY- CCl₄ : p<0,002

3. 3. 3-Nitrotirozin Sonuçları

HPLC sistemi ile karaciğer dokusunda ölçülen 3-NT sonuçlarının, CCl₄ verilen grupta arttığı görüldü. CCl₄ + NSY verilen grupta ise 3-NT düzeylerindeki artışın çok daha az olduğu saptandı. Gruplar arası fark istatistiksel anlamlı bulundu ($p<0,001$). 3-NT düzeyleri ve istatistiki sonuçlar Çizelge 3.2’de ve Şekil 3.5’te grafik olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. Kontrol ve deney gruplarının 3-Nitrotirozin (3-NT) değerleri

Çizelge 3.2. 3-Nitrotirozin Sonuçları

Gruplar	n	3 NT (nmol/g) Mean ± SD
Kontrol	6	717,5±118,76
NSY	6	1021,83±32,52 ^d
CCl ₄	10	2257,7±696,44 ^{a,c,d}
CCl ₄ + NSY	10	1317,8±211,64 ^{b,c}

a : Kontrol- CCl₄ : $p<0,001$

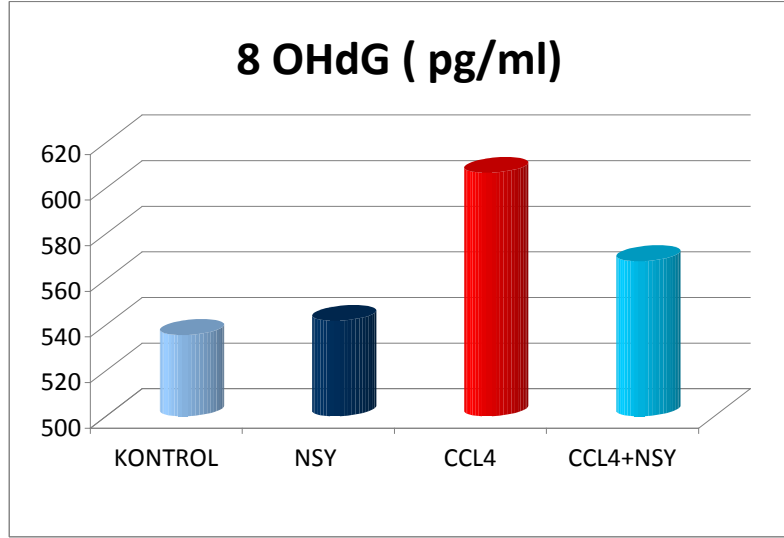
b : Kontrol- CCl₄ + NSY : $p<0,001$

c : CCl₄- CCl₄ + NSY : $p<0,001$

d : CCl₄- NSY : $p<0,001$

3. 4. 8-OHdG Sonuçları ve İstatistik

Karaciğer dokusundan izole edilen DNA örneklerinde, CCl₄ verilen grupta 8-OHdG seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. CCl₄ ile NSY verilen grupta da 8-OHdG düzeyleri artmış olup bu artış CCl₄ grubuna göre daha düşük seviyelerde bulundu. Gruplar arası fark anlamsız bulundu ($p>0,05$). 8-OHdG sonuçları Çizelge 3.3'te ve Şekil 3.6 grafik olarak verilmiştir.



Şekil 3.6.Kontrol ve deney gruplarının 8-OHdG değerleri

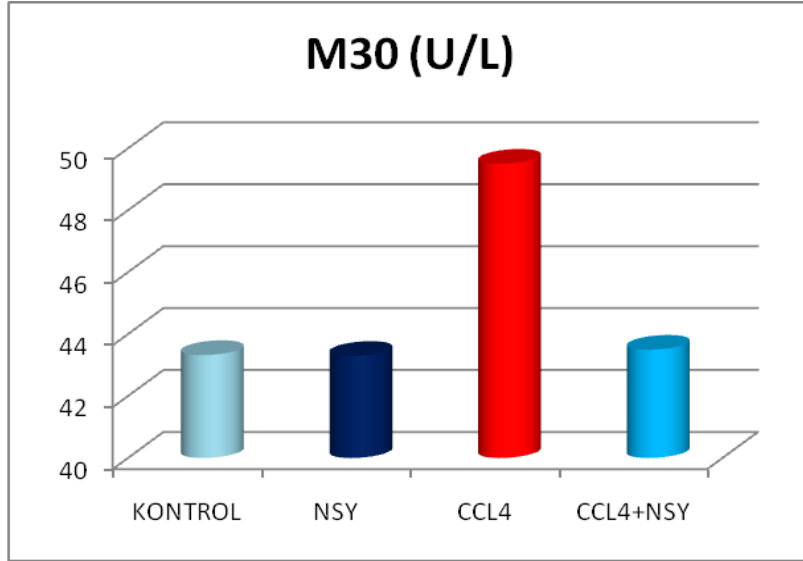
Çizelge 3.3. 8-OHdG Sonuçları

Gruplar	n	8OHdG (pg/ml) Mean ± SD
Kontrol	6	535,6±74,7 ^x
NSY	6	541,8±89,5 ^x
CCl ₄	10	607,3±62,8 ^x
CCl ₄ + NSY	10	568,2±130,7 ^x

$x : p>0,005$

3. 5. M30 Sonuçları

ELISA yöntemiyle belirlenen M30 düzeylerinin, CCl₄ verilen grupta kontrol grubuna göre arttığı görüldü. CCl₄ ile NSY verilen grupta ise M30 düzeyleri CCl₄ grubuna göre daha düşük seviyelerde bulundu. Gruplar arası fark anlamsız bulundu ($p>0,05$). M30 sonuçları grafik olarak Şekil 3.7 de ve düzeyleri ise Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.7. Kontrol ve deney gruplarının M30 değerleri

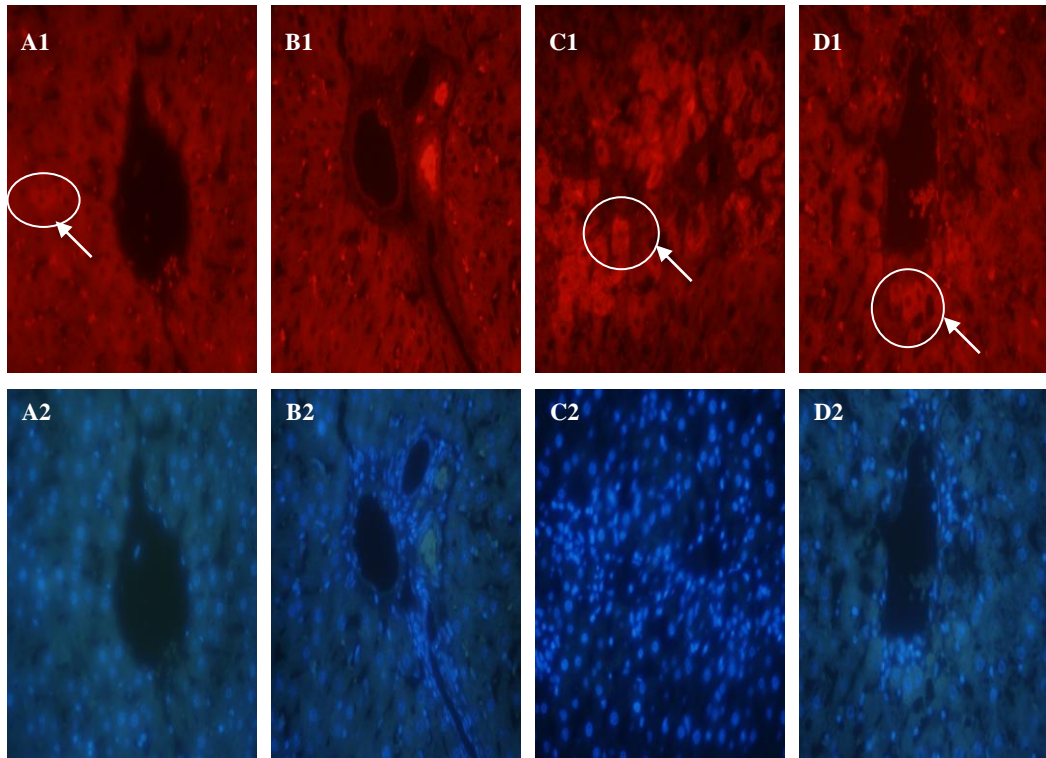
Çizelge 3.4. M30 Sonuçları

Gruplar	n	M30 (U/L) Mean \pm SD
Kontrol	6	43,32 \pm 16,26 ^x
NSY	6	43,29 \pm 8,5 ^x
CCl ₄	10	49,50 \pm 6,7 ^x
CCl ₄ + NSY	10	43,49 \pm 5 ^x

x : $p>0,005$

3. 5. Kaspaz 3 Sonuçları

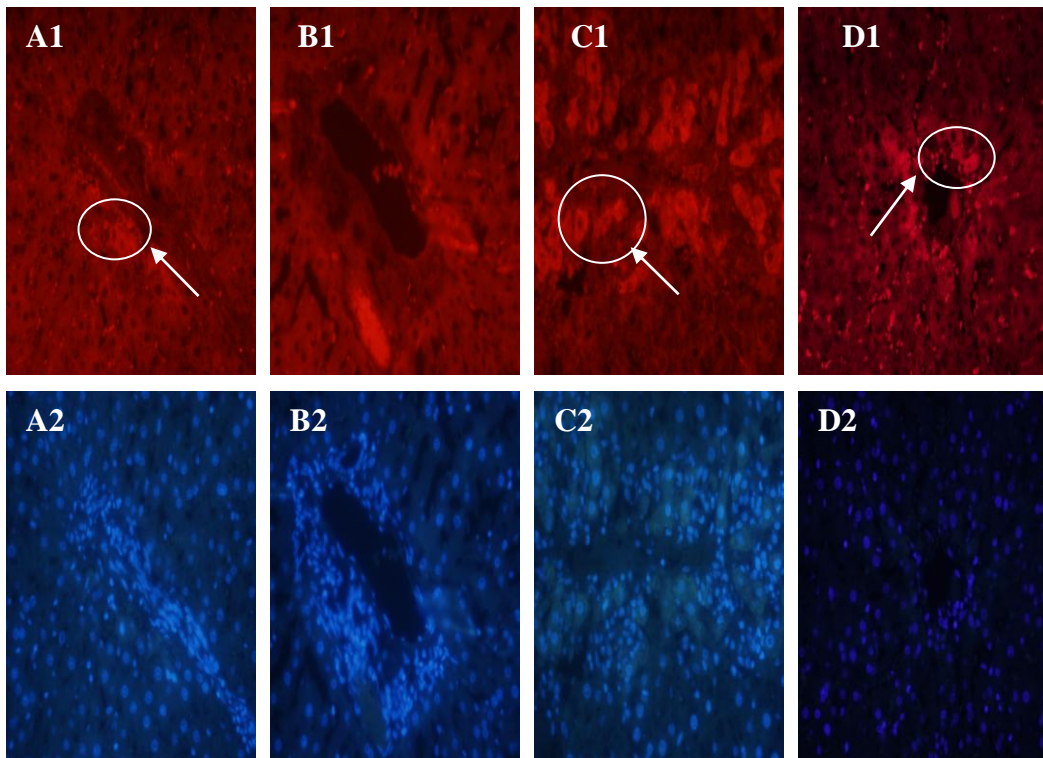
İmmünohistokimyasal yöntemlerle boyanan karaciğer dokularında, CCl₄ verilen grupta Kaspaz 3 ile boyanan apoptotik hücrelerin arttığı, Nigella sativa yağı uygulamasının apoptotik hücre sayısını azalttığı, Kontrol grubu ve sadece Nigella sativa yağı verilen gruplarda ise apoptotik hücrelerin yok denecek kadar az olduğu görüldü. Gruplar arası fark anlamlı bulundu (p=0,001). Hepatositlerdeki kaspaz 3 aktivitelerinin mikroskopik görüntüleri Şekil 3.8 de ve apoptotik indeksler ise Çizelge 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.8. Kaspaz 3 aktivitesi sonuçları; **A1**:Kontrol grubu apoptotik hücreler, **B1**:NSY grubu apoptotik hücreler, **C1**: CCl₄ grubu apoptotik hücreler, **D1**: CCl₄ + NSY grubu apoptotik hücreler, **A2**: Kontrol grubu canlı hücre çekirdekleri, **B2**: NSY grubu canlı hücre çekirdekleri, **C2**: CCl₄ grubu canlı hücre çekirdekleri, **D2**: CCl₄ + NSY grubu canlı hücre çekirdekleri.

3. 6. Kaspaz 9 Sonuçları

İmmünohistokimyasal yöntemlerle boyanan karaciğer dokularında, CCl₄ verilen grupta Kaspaz 9 ile boyanan apoptotik hücrelerin arttığı, Nigella sativa yağı uygulamasının apoptotik hücre sayısını azalttığı, Kontrol grubu ve sadece Nigella sativa yağı verilen gruplarda ise apoptotik hücrelerin 1-2 tane olduğu görüldü. Gruplar arası fark anlamlı bulundu (p=0,001). Hepatositlerdeki kaspaz 9 aktiviteleri mikroskopik görüntüleri Şekil 3.9'da ve Çizelge 3.5'te apoptotik indeksler verilmiştir.



Şekil 3.9. Kaspaz 9 aktivitesi sonuçları; **A1**:Kontrol grubu apoptotik hücreler, **B1**:NSY grubu apoptotik hücreler, **C1**: CCl₄ grubu apoptotik hücreler, **D1**: CCl₄ + NSY grubu apoptotik hücreler, **A2**: Kontrol grubu canlı hücre çekirdekleri, **B2**: NSY grubu canlı hücre çekirdekleri, **C2**: CCl₄ grubu canlı hücre çekirdekleri, **D2**: CCl₄ + NSY grubu canlı hücre çekirdekleri.

İmmünohistokimyasal bulgular değerlendirildiğinde apoptotik hücrelerin kontrol gruplarında yok ya da çok az sayıda olduğu, CCl₄ gruplarında arttığı ve CCl₄ ile birlikte Nigella sativa yağı verilen gruplarda azaldığı görülmüştür.

Çizelge 3.5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Apoptotik indeksi ve istatistik

Gruplar	n	KASPAZ-3 Median (min-max)	KASPAZ-9 Median (min-max)
Kontrol	6	0,25(0-2)	0(0-1)
NSY	6	0,25(0-2) ^{b,d}	1,15(0-2) ^{b,d}
CCl ₄	10	25(20-30) ^{a,b,c}	22,5(19-32) ^{a,b,c}
CCl ₄ + NSY	10	10(7,2-12) ^{c,d,e}	10(7,5-12) ^{c,d,e}

a: Kontrol- CCl₄ :p=0,001

b: NSY- CCl₄ :p=0,001

c: CCl₄ - CCl₄ + NSY :p=0,001

d: NSY- CCl₄ + NSY :p=0,001

e: Kontrol- CCl₄ + NSY :p=0,001

4. TARTIŞMA

Karaciğeri çıkarılan canlının birkaç saat yaşayabilmesi bu organın önemini ortaya koymaktadır. Pekçok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte temel görevleri; sekresyon, ekskresyon, depo, fagositoz, detoksikasyon, konjugasyon, esterleştirme, metabolizma ve hemopoez'dir (Guyton 1991, Çınar ve ark. 1999).

Karaciğer konak savunma mekanizmalarında büyük bir role sahiptir. Bir yandan sepsise neden olan bakterilerin, endotoksinlerin, sepsis sırasında oluşan vazoaaktif maddelerin detoksifikasyonunu sağlamakta, diğer yandan da konak savunmasında yer alan hücrelerin aktivitelerini düzenlemektedir. Karaciğer, enflamatuvar mediyatörlerin kaynağı olmakla birlikte, aynı zamanda bu mediyatörlerden etkilenen hedef organ durumundadır (Mete, 2006).

CCl_4 karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından zararlı bir ara metabolit olan triklorometil radikaline ($CCl_3\bullet$) ve daha sonra oksijen varlığında triklorometilperooksi radikaline ($CCl_3OO\bullet$) dönüştürülür. CCl_4 'ün bu reaktif metabolitleri poliansatüre yağ asitleri ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonunu başlatır ya da kovalent olarak yağlara ve proteinlere bağlanarak hücre zarının bozulmasına ve sonuçta özellikle karaciğer hasarına sebep olur (Sheweita ve ark.2001, Kuş ve ark. 2004).

Son zamanlarda birçok bitkinin karaciğer hasarını önleyici etkileri araştırılmaktadır. Bu alanda *Nigella sativa* tohumu, yağı ve etken maddeleri ile ilgili olarak geniş çaplı araştırmalar sürdürülmektedir. *Nigella sativa* L. tohumları doymamış ve esansiyel yağ asitleri açısından zengindir (Randhawa ve Al-Ghamdi 2002). *Nigella sativa* tohumu %0,38-0,49 oranında uçucu yağ ihtiva etmektedir. *Nigella sativa*'nın aktif bileşeni Timokinon uçucu yağda %27,8-57,0 oranında bulunur (Hosseinzadeh ve Parvardeh 2004). Çeşitli şekillerde antioksidan özellik gösteren TQ'nun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerini süpürücü etki gösterdiği (Badary ve ark. 2003) ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (El-Dakhakhny ve ark 2002).

Türkdoğan ve arkadaşlarının (2003) Nigella sativanın CCl₄ hepatotoksitesine karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada kontrol grubuna sadece CCl₄/zeytinyağı (1:1 i.p.) haftada 2 kez verilmiş. Grup IIA'ya haftada 2 kez Nigella sativa yağı (2 mL/kg i.p.) ve CCl₄/zeytinyağı (1:1 i.p.) , Grup IIB'ye CCl₄/zeytinyağı (1:1 i.p.) ile birlikte Nigella sativa uçucu yağı haftada 3 kez (10 mL/L) verilmiştir. Sadece CCl₄ verilen grupta periasinar bölgelerde (Zon III) koagülasyon nekrozu ve hidropik dejenerasyon ile portal kanallarda fibröz görülmüştür. CCl₄ ile Nigella sativa sabit yağı ve CCl₄ ile Nigella sativa uçucu yağı verilen gruplarda periasinar bölgelerde seyrek nekroz koagülasyonu hariç ciddi histopatolojik bulguların hiçbiri saptanmamıştır.

Mansour ve arkadaşlarının (2001), tek doz (15 µl/kg i.p.) CCl₄ ile oluşturdukları akut karaciğer hasarına karşı Nigella sativanın aktif bileşeni Timokinonun (TQ) etkisini araştırdıkları çalışmada, tek doz CCl₄ uygulanan grupta AST, ALT, LDH değerlerinde anlamlı artış tespit etmişlerdir. Aynı grupta non-protein sülfidril (-SH) konsantrasyonunda önemli düşüş ve lipit peroksidasyonu göstergesi olan MDA değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür. CCl₄ enjeksiyonundan bir saat önce 12,5 mg/kg TQ enjekte edilen grupta ise, serum enzimlerinde ve MDA'da anlamlı bir azalma ile non-protein sülfidril gruplarında anlamlı bir artış olmuştur.

Yurtiçi ve yurtdışında yapılan birçok çalışmada tek doz halinde uygulanan CCl₄ ile oluşturulan akut toksisite sonrası AST, ALT ve LDH değerlerinin 24 saat içinde anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (Yılmaz 2010, Arosio 2000, Yang ve ark. 2007). Yaptığımız çalışmada literatürle uyumlu olarak CCl₄ uygulanan grupta akut hepatotoksisite meydana geldiği görülmüştür. Yalnızca CCl₄ uygulanan grupta AST, ALT ve LDH değerlerinde anlamlı derecede artış meydana gelmiş, CCl₄ verilmeden önce Nigella sativa yağı verilen gruptaki AST, ALT ve LDH değerlerindeki artış çok daha az olmuş ve bu gruptaki değerler kontrol grubundaki değerlere yakın bulunmuştur.

Nigella sativa tohumlarının hem ekstre hem de yağ biçiminde kullanılmasıyla, antioksidan özelliklerinin aracılık ettiği potansiyel antitoksik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Nagi ve ark.1999, Meral ve Kanter 2003).

İlhan ve Seçkin (2005) CCl₄'ün indüklediği karaciğer fibrozisinin engellenmesinde Nigella sativanın rolünü araştırdıkları çalışmalarında, 27 erişkin Wistar-albino rat, 3 grup halinde (kontrol, CCl₄'ün indüklediği hepatotoksisite ve hepatotoksisite + NS tedavisi) ayırmışlardır. Kontrol grubuna müdahale edilmeyip, hepatotoksisite grubuna 4 hafta boyunca haftada 3 kez 0,15ml/100 g CCl₄ subkutanöz olarak verilmiştir. Hepatotoksisite + NS grubuna ise haftada 3 kez 0,15ml/100 g CCl₄ subkutanöz verilmesine ilave 800 mg/kg Nigella sativa ekstraktı 4 hafta boyunca hergün oral olarak verilmiştir. Ortalama plazma AST, ALT ve MDA düzeyleri CCl₄'ün indüklediği hepatotoksik ratlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Ortalama eritrosit GSH-Px ve SOD düzeyleri CCl₄'ün indüklediği grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük bulunmuş ve bu parametrelerin düzeyleri NS tedavisinden sonra anlamlı şekilde arttığı görülmüştür.

Literatürde CCl₄ 'ün oksidatif (Bayram ve ark. 2004, Şener ve ark.2010) ve nitrozatif hasar (Slater 1984, Kadiiska ve ark. 2005, Ghafour-Rashidi ve ark. 2007) oluşumuna sebep olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır. Yaptığımız literatür araştırmasında CCl₄ 'ün sebep olduğu strese karşı Nigella sativanın etkisini karaciğer dokusunda araştıran bizim çalışmamız gibi bir çalışmaya rastlamadık. Literatürde CCl₄ ve farklı ajanlar ile oluşturulan toksisitenin DNA, peroksinitrit düzeyleri ve apoptoz üzerine etkilerini farklı koruyucu maddeler kullanılarak yapılan araştırmalar mevcuttur.

OH radikali, Guanin'in 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomlarıyla reaksiyona girerek DNA ürün reaksiyonlarını oluşturmaktadır. 8-OHdG, OH radikalının DNA bazlarından guaninin 8. karbonunu oksitlemesi ile oluşmaktadır. 8-OHdG oksidatif stresin DNA'da oluşturduğu hasarı yansıtmaktadır.

Nakamoto ve ark. (2003) akut karaciğer toksisitesinde serbest radikal süpürücü antioksidan Edaravone ile yaptıkları çalışmada, Ratları 3 gruba ayırmışlar ve kontrol grubuna sadece zeytinyağı, diğer gruba CCl₄ (2ml/kg i.p.) ve son gruba CCl₄ (2ml/kg i.p.) uyguladıktan 3 saat sonra Edaravone intravenöz uygulanmış farklı saatlerde kanlar alınarak ratlar sakrifiye edilmiştir. ALT ve LDH değerleri CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış, CCl₄ + Edaravone grubunda

anlamli düzeyde azalmiştir. CCl₄ grubunda IL-6 6.saatte artmiş, TNF- α 12.saatte artmiştir. CCl₄ + Edaravone grubunda ise, IL-6 ve TNF- α değerleri her iki zaman diliminde de CCl₄ grubuna göre azalmiş bulunmuştur. Aynı alışmada CCl₄ grubunda MDA 24 saat sonra anlamli derecede artış göstermiş, CCl₄ + Edaravone grubunda ise, 24.saatte anlamli düzeyde düşük bulunmuştur. CCl₄ grubunda 24 saat sonra yağlı dejenerasyon ve Zon III'te nekroz şekillenmiştir. 8-OHdG düzeyleri 48 saat sonra CCl₄ + Edaravone grubunda CCl₄ grubuna göre anlamli ölçüde azalmiş fakat 24. saatte alınan örneklerde iki grup arasında anlamli bir fark bulunmamıştır. Yine 24.saatte bakılan örneklerde Zone II ve III'te TUNEL + hücreler CCl₄ grubunda artmiş, CCl₄+ Edaravone grubunda azalmıştır iki grup arasındaki fark anlamli bulunmuştur.

Akşit (2011), CCl₄ ile oluşturulan deneysel karaciğer intoksikasyonunda bir antioksidan olan N Asetil Sistein (NAS)'in DNA hasarı üzerine koruyucu rolünü araştırdığı çalışmasında, karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla CCl₄, periton içi 2 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde tek doz enjekte edilmiş ve deney gruplarında NAS uygulamasına (periton içi 50 mg/kg/gün) CCl₄ enjeksiyonundan 3 gün önce başlanarak deney süresince devam edilmiştir. CCl₄ enjeksiyonundan 6 ve 72 saat sonra eter anestezisi altında kan ve karaciğer dokusu alınarak deney sonlandırılmıştır. Serum AST, ALT, MDA düzeylerinin, CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre arttığı, 72. saatte artışın olduğu fakat altıncı saate göre azaldığı belirlenmiştir. CCl₄ + NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl₄ gruplarına göre düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Nükleer ekstraktlarda yapılan 8-OHdG analizinde, CCl₄ verilen grupta 6. saatte kontrol grubuna göre 8-OHdG düzeyinin arttığı, 72. saatte de artışın olduğu fakat altıncı saate göre düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. CCl₄ + NAS verilen grupta ise 6. ve 72. saatte kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artışın olduğu fakat CCl₄ grubuna göre düzeyinin azaldığı saptanmıştır.

Kadiiska ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada ratları 3 gruba ayırmışlar ve düşük doz (120 mg/kg CCl₄ i.p.), yüksek doz (1200 mg/kg CCl₄ i.p.) ve kontrol grubu oluşturmuşlardır. CCl₄ enjeksiyonundan 2, 7 ve 16 saat sonra kan alarak analiz yapmışlardır. MDA, her iki CCl₄ grubunda 2 saat sonra kontrol grubuna göre yüksek, 7 saat sonra sadece yüksek doz CCl₄ grubunda yüksek, diğer CCl₄ grubunda

azalmaya başladığı 16 saat sonra ise düzeylerin her iki grupta da kontrol grubuna göre yüksek fakat 2. saate göre düşük olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada yapılan 8-OHdG analizinde, yüksek doz CCl₄ grubunda 7. saatte kontrol grubuna göre yaklaşık 6 kat, düşük doz CCl₄ grubunda ise yaklaşık 2 kat artma, 16. saatte ise 8-OHdG düzeyi CCl₄ grubunda kontrol grubuna göre yüksek fakat 7. saate göre düşük olduğu tespit edilmiştir. 3-NT düzeylerinde ise, farklı doz CCl₄ gruplarında ve farklı saatlerde alınan örneklerde istatistiksel anlamlı bir artış görülmemiştir.

Kadiiska ve arkadaşlarının ve Akşitin çalışmalarından anlaşıldığına göre 8-OHdG düzeyleri verilen CCl₄ dozuna ve toksisite için beklenen süreye bağlı olarak, CCl₄ uygulanmasından sonra belli bir zaman diliminde pik yapmakta daha sonra bu düzeyler düşmektedir. Nakamoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise CCl₄ uygulamasından 24 saat sonra gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ratlara CCl₄ (1ml/kg i.p.) uygulandıktan 24 saat sonra kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edilmiş ve karaciğer dokuları alınmıştır. CCl₄ verilen grupta karaciğer dokularında 8-OHdG seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. CCl₄ + NSY verilen grupta da 8-OHdG düzeyleri artmış olup bu artış CCl₄ grubuna göre daha düşük seviyelerde kalmıştır. Gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Ratlara verilen (1ml/kg i.p.) CCl₄ dozu 24 saat sonunda oksidatif stresi, 8-OHdG parametreleri açısından yansıtmamaktadır.

Reaktif Nitrojen Türleri (RNT) reaksiyonlarının bazı amino asit kalıntılarının nitrasyonu veya proteinlerin parçalanması sonuçları vardır (Lushchak 2007). 3-nitrotirozin ise nitrozatif hasarın sık kullanılan bir göstergesidir. Soleimani ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, CCl₄'ün nitrozatif stresi indüklediğini toksik grupta artan protein oksidasyonu, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), NO radikalleri ve azalan total antioksidan kapasite (TAS) ve total tiol molekülleri (TTM) ile kanıtlamışlardır.

Taysi ve arkadaşları (2014) Nigella sativa yağının lenslerde iyonize radyasyonun indüklediği katarakta karşı antioksidan ve radyoprotektif etkilerini araştırmışlardır. Ratlar altı gruba ayrılarak; İyonize Radyasyon (IR) + NSY grubuna tek doz 5 gray IR verilerek 10 gün boyunca NSY (1 g kg⁻¹ d⁻¹) oral verilmiş, IR +

TQ grubuna IR verilerek 10 gün boyunca her gün TQ (50 mgkg⁻¹ d⁻¹) (i.p.) verilmiş, IR grubuna tek doz 5 gray IR ve 1 ml serum fizyolojik verilmiş, kontrol gruplarından birincisine sadece 1 ml serum fizyolojik verilmiş, ikincisine dimetil sülfoksit verilmiş son gruba ise herhangi bir muamele yapılmamıştır. Onuncu gün IR grubundaki ratların %80'inde katarakt gelişmiş, bu oran NSY verilen grupta %20'ye, TQ verilen grupta ise %50'ye düşmüş olup grade 1 ve grade 2 ile sınırlı kalmıştır. Nitrozatif stres parametresi olarak ölçülen Nitrik oksit sentaz aktivitesi, Nitrik oksit ve peroksinitrit düzeyleri diğer gruplara göre radyoterapi grubunda artmıştır. Nitrozatif stres parametreleri NSY ve TQ verilen gruplarda IR grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Peroksinitrit miktarının indirek belirteci olarak ölçtüğümüz 3-NT seviyeleri yalnızca CCl₄ uygulanan grupta artmış CCl₄ verilmeden önce Nigella sativa yağı verilen grupta ise 3-NT seviyelerinin artışı baskılanmıştır. Gruplar arası fark istatistiksel anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Literatüre uygun olarak CCl₄ karaciğerde nitrozatif hasar oluşturmuştur. Nigella sativa yağı ise antioksidan etkisi ile peroksinitrit artışını inhibe ederek hücreleri hasara karşı korumuştur.

Artan peroksinitrit miktarı hücrel hasar oluşturacak düzeye ulaştığında hasar tamir edilememekte ve hücre apoptoz veya nekrozla ölüme yönelmektedir (Erdal ve ark. 2008).

Seruma salınan sitokeratinler, hücre ölümünün sonuçlanmasından sonraki evreyi yansıtmaktadır. M30 düzeyleri karaciğere spesifik olmayıp tüm dolaşımdaki apoptozu göstermektedir. Çalışmamızda dolaşımda apoptoz belirteci olan serum M30 düzeyleri, CCl₄ grubunda kontrol gruplarına göre artmış, CCl₄ ile birlikte NSY verilen grupta ise azalmış olmakla birlikte deney grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Fizyolojik ortamda ya da hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptoz organizmada homeostazın devamı için önemlidir. Apoptoz ile diğer dokularda olduğu gibi karaciğerde de hasar görmüş hücreler çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılır.

Apoptoz, hücre dışı ya da hücre içi sinyaller ile tetiklenebilmektedir. Dokularda kaspaz 8 ve kaspaz 9 antijenler için belirlenen apoptotik indekslerle, apoptozun reseptör aracılı ekstrinsik ya da mitokondri aracılı intrinsik olarak indüklendiği yorumlanabilmektedir. Kaspaz 3 ise bu iki yolağın kesişim noktasıdır.

Kanter (2010) formaldehite (FA) maruz bırakılan sıçanların frontal kortekslerindeki nöronal hasara karşı *Nigella sativa*'nın (NS) muhtemel koruyucu etkilerini arştırdığı çalışmasında, kontrol grubu, FA uygulanan grup ve FA+NS uygulanan grup olarak üç grup oluşturmuştur. FA, 10 gün boyunca hergün 10 mg/kg intraperitoneal uygulanmıştır. NS uygulanan gruptaki ratlara, 400 mg/kg NS 10 gün boyunca ağızdan günde bir kez, FA uygulanmasından hemen sonra verilmiştir. FA uygulanan gruba ait frontal korteksteki piknotik ve dejenere olmuş nükleuslara sahip nöronların oldukça koyu görümlü olduğu görülmüş, FA ile birlikte NS tedavisi uygulanan gruptaki nöronların morfolojilerinin kontrol grubundaki nöronlar kadar olmasa da iyi korundukları tespit edilmiştir. FA uygulanan grubun frontal korteksindeki apoptotik nöron sayısı kontrol ve FA ile birlikte NS tedavisi uygulanan gruptakilere oranla daha fazla bulunmuştur. FA uygulanmasından sonra frontal korteksteki dejenere olmuş nöronlarda kaspaz 3 immunreaktivitesinin arttığı görülmüştür. NS ile tedavinin FA uygulanmasından sonra oluşan dejenere nöronlardaki immunreaktivitenin belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

CCl₄'ün karaciğerde Kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (Sun ve ark. 2001). Çalışmamızda karaciğer dokusunda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktivasyonu incelenmiştir. Kontrol gruplarında apoptozun yok denecek kadar az olduğu, CCl₄ grubunda apoptozun önemli oranda arttığı ve CCl₄ ile birlikte *Nigella sativa* yağı verilen gruplarda azaldığı görülmüştür. *Nigella sativa* yağının hücreleri hasara karşı koruyarak apoptozu inhibe ettiği düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

CCl₄ ile karaciğerde tek doz ile oluşturulan akut hasar üzerine *Nigella sativa* yağının antioksidatif ve apoptotik yönleriyle koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla yapılan bu tez çalışmasında;

- Deneysel gruplarında CCl₄ ile karaciğer toksikasyonu oluşturuldu. Artan serum AST ve ALT değerleri karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kabul edildi. CCl₄ 'den önce *Nigella sativa* yağı verilen grupta serum AST, ALT ve LDH değerleri CCl₄ grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ve sonuçlar kontrol grubuyla yakınlık gösterdi. Bu gruplardaki karaciğer hasarının CCl₄ grubuna göre daha az olduğu belirlendi. *Nigella sativa*'nın CCl₄'e karşı karaciğerde hepatotoksisite gelişmesini önlediği gözlemlendi.
- CCl₄'ün karaciğer dokusunda nitrozatif hasar oluşturduğu saptandı. Karaciğer dokularında nitrozatif stres parametresi olarak ölçülen 3-NT seviyeleri CCl₄'den önce *Nigella sativa* yağı verilen grupta, CCl₄ grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. *Nigella sativa*'nın, CCl₄'ün oluşturduğu nitrozatif hasara karşı karaciğeri koruduğu belirlendi.
- Hepatosit DNA'sındaki oksidatif stres belirteci olarak ölçülen 8-OHdG düzeyleri için gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu.
- Dolaşımda apoptozun belirteci olan M30 düzeylerinin gruplar arasındaki farkı anlamsız bulundu. Hepatositlerde CCl₄ grubunda artan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonu CCl₄'ün apoptozu intrinsek yoldan tetiklediğini ve hepatositlerde CCl₄ + NSY grubunda azalan kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonu ile *Nigella sativa*'nın hücreyi hasara karşı koruyarak apoptozu engellediği gözlemlendi.

Bu alanda daha önce yapılmış çalışmalar daha çok lipid peroksidasyonu odaklı olmuştur. Bu çalışmada nitrozatif stres ve DNA hasarlanması dikkate alınarak hepatositlerde apoptozun tetiklenmesi incelenmiştir. Sonuç olarak; Nigella sativa yağı nitrozatif stresi baskılayarak apoptozu önlemiş ve toksisitenin sebep olduğu hasara karşı karaciğeri korumuştur.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nigella sativanın ratlarda deneysel karbontetraklorür hepatotoksitesisi modelinde koruyucu etkilerinin araştırılması

Nurcan Evliyaoğlu

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Bu çalışmada, ratlarda, CCl₄'ün indüklediği akut karaciğer toksisitesine karşı Nigella sativa yağının koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Karbon tetraklorür (CCl₄) özellikle karaciğerde, doku hasarına yol açan organik bir kimyasal ajandır.

Çalışmada ağırlığı 200-300 gram arasında değişen, 32 adet Wistar cinsi sağlıklı ratlar kullanılarak 4 grup oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki ratlara 14 gün boyunca her gün günde bir kez 0,4 mL/kg zeytinyağı (i.p.) uygulanmıştır. Nigella sativa yağ grubundaki ratlara 14 gün boyunca her gün günde bir kez 0,4 mL/kg Nigella sativa yağ (i.p.) uygulanmıştır. CCl₄ grubundaki ratlara 14 gün boyunca her gün günde bir kez 0,4 mL/kg zeytinyağı (i.p.) uygulanıp 14. gün uygulamadan 1 saat sonra karbontetraklorür 1 mL/kg (ip.) uygulanmıştır. CCl₄+Nigella sativa yağ grubundaki ratlara 14 gün süreyle Nigella sativa yağ 0,4 ml/kg i.p olarak uygulanıp 14. gün 1saat sonra CCl₄ 1 mL/kg (ip.) uygulanmıştır. Deney bitiminden 24 saat sonra ketamin anestezisi ile ratların kalplerinden kan örnekleri alınmıştır. Daha sonra ratlar ketamin anestezisi ile sakrifiye edilerek karaciğer dokuları alınmıştır. Serumda aspartat aminotransferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktiviteleri spektrofotometrik metodlarla belirlenmiştir. Sitokeratin-18 (M 30) ELISA metoduyla, karaciğer doku homojenatlarında da 3 Nitrotirozin (3-NT) HPLC metoduyla ölçülmüştür. DNA hasarını göstermek için DNA izolasyonu sonucu elde edilen nükleer ekstraktlarda 8 Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) ölçümleri ELISA metoduyla yapılmıştır. Karaciğer dokularında kaspaz 3 ve kaspaz 9 antijen düzeyleri immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle belirlenerek apoptotik indeksler hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmada serumda CCl₄'ün uygulandığı grupta enzimatik olarak hasar oluştuğu gösterilmiştir. M 30 ve 8OHdG düzeylerinde gruplar arası istatistiki fark görülmemiştir. CCl₄'ün nitrozatif hasar oluşturduğu görülmüştür. CCl₄+NSY grubunda apoptotik indeks ve 3-NT düzeyleri CCl₄ grubundakine göre istatistiksel fark oluşacak şekilde (p=0,001) daha az belirlenmiştir.

Sonuç olarak, CCl₄ ile karaciğerde nitrozatif stres oluştuğu ve hücrelerin apoptoza yöneldiği tespit edilmiştir. Nigella sativa yağının hücreleri nitrozatif hasara karşı koruyarak apoptoza inhibe ettiği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hepatotoksitesite; Karbontetraklorür; Nigella Sativa, 3-NT, 8-OHdG, M 30

7. SUMMARY

Protective effects of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity model in rats

The potential protective effects of *Nigella sativa* oil on carbontetrachloride-induced acute liver injury in rats was investigated in this work. Carbontetrachloride (CCl₄) is an organic chemical, which causes tissue damage, especially to the liver.

32 healthy Wistar rats were divided into 4 groups which 200-300 grams of weight, in the study. The rats in the control group were received 0,4 mL/kg olive oil intraperitoneally for 14 days. The rats in the *Nigella sativa* oil group were received 0,4 mL/kg *Nigella sativa* oil intraperitoneally for 14 days. The rats in the CCl₄ group were received 0,4 mL/kg olive oil intraperitoneally for 14 days. On 14th day one hour after treatment CCl₄ 1 mL/kg (ip.) performed to rats. The rats in the CCl₄+ *Nigella sativa* oil group were received 0,4 mL/kg *Nigella sativa* oil intraperitoneally for 14 days. On 14th day, one hour after the treatment CCl₄ 1 mL/kg (ip.) was performed to rats. 24 hour after end of the experiment, blood samples were obtained from the animals under ketamine anesthesia. Then the rats were sacrificed with ketamine anesthesia and liver tissues were taken. AST, ALT and LDH activities were measured in the blood serum with spectrophotometric method. Citokeratin-18 (M 30) were measured with ELISA method, 3 Nitrotyrosine (3-NT) were measured with HPLC method in tissue homogenates 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) analysis in nuclear extract with ELISA. Caspase-3 and Caspase-9 activity were determined with immunohistochemical methods in liver tissues.

This study has shown that damage occurs enzymatically in the CCl₄ group. For M 30 and 8-OHdG levels there wasn't found significance. CCl₄ was caused nitrosative damage. It was obtained that apoptotic indexes and 3-NT levels in group CCl₄+NSY were lower than group CCl₄. This decrease was found significantly (p=0,001).

Consequently, It was determined that cells towards apoptosis as a result of CCl₄ induced nitrosative damage. *Nigella sativa* oil has been found to inhibit apoptosis by protecting cells against nitrosative damage.

Key Words: Hepatotoxicity, Carbontetrachloride, *Nigella Sativa*, 3-NT, 8-OHdG, M 30

8.KAYNAKLAR

- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyo-patolojik Etkileri. Konya. Mimoza Yayınları.1995:3-13
- Akşit H. Deneysel karaciğer intoksikasyonunda DNA hasarının belirlenmesi Ve N Asetil Sisteinin rolü Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi
- Al Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sohaibani MO, Al-Yahya MA, Rafatullah S, Shaik SA. Gastroprotective Effect of an Aqueous Suspension of Black Cumin on Necrotizing Agents- Induced Gastric Injury in Experimental Animals. Saudi J Gastroenterol. 2008; 14(3):128-34.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001;357(3):593-615.
- Al-Naggar TB, Gomez-Serranillas M P, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of Nigella sativa L. extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2003;88:63-8.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong W. Human ICE/CED 3 protease nomenclature. Cell. 1996; 87(2):171
- Altuntaş İ. Otoimmün tiroid hastalığının tanı ve takibinde oksidatif DNA hasar belirleyicisi 8-ohdg'nin önemi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara 2007. sayfa 26.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci. 1993;90(17):7915-22.
- Arıcı S. Toksik Hepatit Pamukkale Tıp Dergisi. 2008;1(2):113-19.
- Arıcıoğlu A. Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. Doktor.1994;2(3):238-42.
- Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, De Castri D, Moscheni C, Annoni G. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. Pharmacol Toxicol. 2000;87(5):229-33.
- Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromotografik yöntemlerle tespit edilmesi. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi. 2009;20(2):79-83.
- Atmaca G, Mert S. Nitrik Oksit'in kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri. Trakya Üniversitesi Tıp fakültesi Dergisi.2001;18(3):255-64.
- Aydın A, Sayal A ve İşimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı.2001.
- Badary O, Abdel-Naeem A, Abdel-Wahab M, Hamada F. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. Toxicol. 2001;143:219-26.
- Bayram İ, Özbek H, Uğraş S, Tuncer İ, Reçber D. Askorbik asit ve alfa-tokoferolün karbondioksit ile oluşturulmuş akut karaciğer toksisitesi modelinde karaciğeri koruyucu etkisi Van Tıp Dergisi 2004; 11 (2):32-38.
- Barrett LF, Mesquita B & Gendron M. (2011). Emotion perception in context. Current Directions in Psychological Science. 2011;20: 286-290.
- Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul. İ.Ü. Yayınları. 1984;3255.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev. 1998;78(2):547-81.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J.Biol. Chem.1997; 15;272(33):20313-6

- Bissel DM, Maher JJ. Hepatik Fibrosis and Cirrhosis, Zakim D, Boyer TD (Ed.) A Textbook of Liver Disease. Philadelphia. W.B.Sounders Company. 1996:506.
- Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJG. Implications of nitric oxide synthases isoforms in the pathophysiology of peyronies disease. *Int. J. Imp.* 2002;14:345-52.
- Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther.* 1994;8(4):601-10.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany.* 2010;76:210-16.
- Bouwens L, Baekeland M, Wisse E. Cytokinetic analysis of the expanding kupffer-cell population in rat liver. *Cell Tissue Kinet.* 1986;19:217-26.
- Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.* 2004;35:159-69.
- Bütüner BD, Kantarcı G. Mutasyon , DNA hasarı ,onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi *Ankara Ecz. Fak. Derg.*2006; 35 :(2) 149 - 170.
- Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom.* 2001;13:102-7.
- Büyükgüzel E. Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi.* 2013;3(1):40-51.
- Ceylan A. Tıbbi bitkiler (I. Genel bölüm). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi ofset basımevi, Bornova – İzmir. 1983;312:83.
- Chakarvarti N. Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Ann. Allergy.* 1993;70(3): 237-42.
- Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993;49(3):481-93.
- Chun H, Shin DH, Hong BS, Cho WD, Cho HY, Yang HC. Biochemical properties of polysaccharides from black pepper. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1203- 8.
- Cohen JJ. Apoptosis to be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I).* 1998;1:1-19.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *Faseb J.* 2003;17(10):1195- 214.
- Cooper GM. Programmed cell death. *The cell.* Washington:ASM Pres.1994;14:592-96.
- Cormarck D. *Essential Histology.* 2nd Ed. Canada. Lippincott Williams and Wilkins. 2001:328.
- Çanakcı CF, Çicek Y, Çanakcı V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases, *Biocemstry (Moscow).*2005;70(6):619-28.
- Çınar A, Yörük M, Meral İ, Kılıçalp D, Koç A, Ertekin A. Karbon tetraklorür (CCl4) ile tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan akut ve kronik intoksikasyonun karaciğerin histolojik yapısına, bazı hematolojik değerlere ve elektrokardiyogram üzerine etkileri *Tr. J. of Veterinary and Animal Sicences.* 1999;23: 235-42.
- D'Angelica M, Fong Y. The Liver. In. Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, et al. (Eds) *Sabiston Textbook of Surgery.* 17. edition. Philedelphia: Elsevier Saunders. 2004:1513-69.
- De Martinis BS, De Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. *Pharmacol Res.*2002;46 (2): 129-31.

- De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26(1):202-26.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J*. 1997;324(1):1-18.
- Dinçer Y, Akcay T, Saygılı ED, Ersoy EY, Tortum O. Helicobacter pylori ile enfekte vakalarda Clarithromycine+amoxicilline tedavisinin oksidatif DNA hasarı üzerine etkisi. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*.2007;17(4):204-8.
- Dizdaroglu M, Jaruga. *Free Radic. Res*. 2012;46:382-419.
- Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res*. 1998;29(6):551-63.
- Doğanyığıt Z. Propolis ve karaciğere koruyucu etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi.U. Bee J*.2013;13 (2): 70-8.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med*. 1998;19:4(5):221-357.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med*. 1998;19:4(5):221-357.
- Eken A. Rat Kan Ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, Küçük Deney Hayvanlarından Rat. Yücel O, Genç O. (Eds). Ankara. Derman Tıbbi Yayıncılık. 2012:69-73.
- Ekici L,Sadıç O. Serbest radikaller ve antioksidan gıdalarla inhibisyonu. *Gıda*. 2008; 33 (5) : 251-260
- El-Abhar H, Abd-Allah D, Saleh S. Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J. Ethnopharmacol*. 2003; (84): 251-258.
- El-Dakhkhny M, Barakat M, Abdel-Halim M, Aly SM. Short communication effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanolinduced ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72:299-304.
- El-Kadi A, Kandil O. Effect of Nigella sativa (the black seed) on immunity. *Bull Islamic Med*. 1986;(4):344-48.
- El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2002;2:1603-11.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*. 2007;35(4): 495-516.
- El-Tahir K, Ashour M, Al-Harbi M. The respiratory effects of the volatile oil of black seed (Nigella sativa) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen. Pharmacol*. 1993;24 (5):1115-22.
- Erbengi T. *Histoloji 2*. Ankara. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 1985:99-121.
- Ercan E, Tengiz İ, Çekmen MB. Kardiyovasküler sistemde nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz: fizyolojik ve patofizyolojik özellikleri. *İÜ Kardiyol Enst Derg*. 2003;2(6):36-41.
- Erdal N, Gürgül S, Tamer L ve Ayaz L. Effect of long-term exposure of extremely low frequency magnetic field on oxidative/nitrosative stres in rat liver. *J. Rdiat. Res*.2008;49:181-7

- Erdoğan E, Kaya A, Rağbetli MÇ, Özbek H, Cengiz N. Anason (*Pimpinella anisum*) ekstresinin deneysel akut karaciğer hasarında karaciğer koruyucu etkisi var mı? *Van Tıp Dergisi*. 2004;11(3):69-74.
- Eren M, Temizel İ, Koçak N. İlaça bağlı hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2004;47:222-27.
- Eu JP, Liu L, Zeng M, and Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*. 2000;39:1040-1047.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, *Mutat. Res.* 2004;567:1-61.
- Fantel AG. 1996. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and Hypothesis. *Teratology*. 1996;53:96-217.
- Fararh KM, Atoju Y, Shimizu Y, Shina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. 2004; 77:123-129
- Farnsworth NR, Akerev O, Bingel AS. *The Bulletin of WHO*. 1985;63:9865-71.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi*. 2011;11(1): 52 – 67.
- Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*. 1994;78(4):539-42.
- Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography* 2008;14:144-9.
- Frenkel K, Goldstein MS, Teebor GW. Identification of the cis-thymine glycol moiety in chemically oxidized and gamma-irradiated deoxyribonucleic acid by high-pressure liquid chromatography analysis. *Biochemistry*. 1981;26:7566-71.
- Friedberg EC. DNA Repair. Freeman WH and Company, New York. 1984;1-2.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992;119:493-501.
- Ghafour-Rashidi Z, Dermenaki-Farahani D, Aliahmadi A, Esmaily H, Mohammadirad A, Ostad SN and Abdollahi M. Protection by cAMP and cGMP phosphodiesterase inhibitors of diazinon-induced hyperglycemia and oxidative/nitrosative stress in rat Langerhans islets cells: molecular evidence for involvement of non-cholinergic mechanisms. *Pest. Biochem. Physiol.* 2007; 87:261-70.
- Gilani A, Jabeen Q, Khan M. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan. J. of Biol. Sci.* 2004;7(4):441-51.
- Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol*. 1998;274:112-8.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology. The liver as an organ*. 9. edition, Philadelphia: WB Saunders company. 1996: 883-88.
- Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. Eighth Edit., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991.
- Gülbahar Ö. Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. *Turk. J. Geriatrics*. 2007;10(1):43-8.
- Gülçen B, Karaca Ö, Kuş MA, Çolakoğlu S, Ögetürk M, Kuş İ. Deneysel karbon tetraklorür zehirlenmesinde akciğer doku hasarı ve melatonin hormonunun koruyucu rolü: ışık mikroskopik ve biyokimyasal bir çalışma. *Düzce Tıp Dergisi* 2012; 14(3): 37-42

- Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;2:73-8.
- Gümüştaş K, Atukeren P. Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklarla ilişkisi türkiye’de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar. Sempozyum Dizisi. 2008;62:329-40.
- Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors. 1998; 8:1-5.
- Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol. 1999; 21:283 – 95.
- Hautekeete ML, Geerts A, Seynaeve C, Lazou JM, Kloppel G, Wisse E. Contributions of light and transmission electron microscopy the study of the human fat-storing cell. Eur J Morphol.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. Methods Enzymol. 1999; 300:156-66.
- Hermes-Lima M, Storey JM. and Storey KB. Antioxidant Defenses and Animal Adaptation to Oxygen Availability During Environmental Stress. In: Storey K.B., Storey J.M. (Eds), Cell and Molecular Responses to Stress,. Elsevier Press, Amsterdam. 2001:263-287.
- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice. Phytomedicine 2004;11(1):56-64
- <http://okulsel.net/docs/index11629.html>.
- <http://www.webmd.com/digestive-disorders/picture-of-the-liver>.
- İlhan N, Seçkin D. Protective effect of nigella sativa seeds on ccl4-induced hepatotoxicity. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2005, 19(3), 175-179
- Illarion VT, Ferid M. Protein nitration in cardiovascular diseases. Pharmacol Rev. 2002;54:619–34.
- Illarion VT. ve Murad F. Protein Nitration in Cardiovascular Diseases Pharmacol Rev 2002;54:619–634.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. Arch Biochem Biohys. 1992;298:438-45.
- Israels LG, Israels ED. Apoptosis. The Oncologist. 1999;4:332-9.
- İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları. Cilt I. Ankara Güneş Kitapevi. 1996:1077-167.
- Jones AL, Spring-Mills E. The Liver and gallbladder, cell and tissue. Biology A Textbook of Histology’de, 6.Ed., Ed. Weiss L. München, Urban&Schwarzenberg Inc, 1988; 696.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology: 7th Ed, Appleton & Lange, İstanbul 1993; 380-394.
- Junqueira, LC., Carneiro, J., Kelley, RO. Temel Histoloji; Barış Kitapçılık. 1998;15:307-319.
- Kadiiska MB at al. Biomarkers of oxidative stress study; are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CC14 poisoning? Free Radic. Biol. Med. 2005;38:698–710.
- Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H. Effect of Nigella sativa (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. Phytotherapy Research. 2003; 17:1209-14.

- Kanter M. Protective effects of *Nigella sativa* on formaldehyde-induced neuronal injury in frontal cortex *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 2010 ; 8 (1) :1- 8
- Karaca Ö, Pekmez H, Kuş MA, Akpolat N, Ögetürk M, Kuş İ. Deneysel karbon tetraklorür toksisitesi sonucu karaciğerdeki İŞP70 immünoreaksiyon artışı üzerine melatonin hormonunun etkisi *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.* 2011; 25 (2): 73 – 76.
- Karaöz E. Sindirim Sistemi Histolojisi, In: Karaöz E. (ed) Özel Histoloji. Isparta. SDÜ Basımevi 2002.
- Kaya N, Gürsel V, Bakan N, Ağbaş A. Karaciğer ve pankreas hastalıklarında lösin amino peptidaz, Laktat dehidrogenaz ve Alkalen fosfatazin Serumdaki aktivite seviyeleri arasındaki ilişki Atatürk Üniversitesi tıp Fakültesi.1988;20(1);87-93.
- Kaya ve ark. "Çörek Otu (*Nigella sativa*) Tohumunun İnsan Hücresel Bağışıklık Sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ Hücreleri ve Toplam Lökosit Sayısı Üzerine Etkileri", *Genel Tıp Derg.* 2003;13:109-112.
- Kayalı, R., Çakatay, U. 2004. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*.2004; 35 (2): 83-89.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi- Patolojiye Giriş. (Editor: Ramazan Demir). Ankara.Palme Yayıncılık. 2006.
- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin.*1998;18:482-91.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-50.
- Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta.* 2006;364:61-6.
- Kuş İ, Ögetürk M, Öner H, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-74.
- Kuş İN, Çolakoğlu H, Pekmez D,Seçkin M, Ögetürk and M. Sarsılmaz. Protective effect of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem.* 2004;106:289-97.
- Kuwano K. Epithelial Cell Apoptosis and Lung Remodeling. *Cellular & Molecular Immunology.* 2007;6:419-29.
- Laura C, Veronica D, Veronica T, Rtoro O, Radı R. Mitochondrial protein tyrosine nitration *Informa Healthcare :Free Radical Research.* 2011;45(1):37–52.
- Loscalzo J. Nitric oxide:biologic and medical implications. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 14th ed. Vol 1. 1998:442-4.
- Lushchak VI. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry.* 2007;72:809–27.
- M De Falco R, Penta V, Laforgia L, Cobellis L. Apoptosis and human placenta:expression of proteins belonging to different apoptotic pathways during pregnancy. *J.Exp.Clin.Cancer.* 2005;24(1):25-33.

- Mahfouz M, El-dakhkhny M. Isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* L. Seeds. *J. Pharmaco. Sci. U.A.R.*1960; 1:1.
- Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol.*2002;79:1–11.
- Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbontetrachloride mode of action: A review. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews.* 2007;25:185-209.
- Mansour M.A, Ginawi O. T, El-Hadiyah T, El-Khatib A.S, Al-Shabanah O.A, Al-Sawaf H.A. Effects of volatile oil constituents of *nigella sativa* on carbon tetrachloride -induced hepatotoxicity in mice: Evidence For Antioxidant Effects Of Thymoquinone Res. *Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*2001;110: (3&4); 239-251.
- Mansour MA. Protective effects of Thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sciences.* 2000;66:2583-91.
- Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Ziad A. Anti-tumor properties of blackseed(*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*2007; 40: 839-47.
- McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J , Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in long-evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact.* 2005;152 (2-3): 107-17.
- Meral I, Kanter M. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. *Biol Trace Elem Res* 2003;96(1-3):263-70.
- Mete B. Sepsiste böbrek ve karaciğer. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Güncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyumu Bildirisi.2006; 51: 35-43.
- Meydani M. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mechanisms of Aging and Development.* 1999;111:123-32.
- Miyazaki T, Bouscarel B, Ikegami T, Honda A, Matsuzaki Y. The protective effect of taurine against hepatic damage in a model of liver disease and hepatic stellate cells. 2009;643:293-303.
- Mohamed A, Shoker F, Bendjelloul A, Mare M, Alzrigh H, Benghuzzi, Desin T. Improvement of Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone, an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci. Instrum.* 2003;39:440-5.
- Moore KL and Agur AMR. In: Alaittin Elhan, editörs. *Temel Klinik Anatomi, İkinci Baskı*, Ankara, Güneş Kitabevi; 2006 :168-76.
- Mruk Dd, Silvestrini B, Meng-Yun Mo. And Cheng Cy. Antioxidant Superoxide Dismutase -a Review: Its Function, Regulation in the Testis, and Role in Male Fertility. *Contraception.*2002; 65, 305-311.
- Murray RK, Mayes PA, Granner DK and Radwell VW. *Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Prof. Dr. Gülriiz Menten, Prof.Dr. Biltan Ersöz. Baris Kitabevi.*1993
- Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbontetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47(1):153-9.
- Nakamoto N, Tada S, Kameyamak, Kitamura K, Kurita S, Saito Y, Saito H, And Ishii H. A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury. *Free Radical Research.*2003; Volume 37 Number 8:2003, pp. 849–859.

- Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. *Chest*1997;112:1358-62.
- Nelson SD, Pearson PG. Covalent and non-covalent interaction in acute lethal cell injury caused by chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990;30:169–95.
- Nergiz C, Ötleş S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. Seeds. *Food Chem.*1993; 48:259-61.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch.* 2003;58:629–31.
- Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol. Med.* 2001;31:1287–312.
- Olas B, and Wachowicz B. Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets.* 2007;23:1–11.
- Omar A, Ghosheh S, Abdulghani A, Houdi A, Crookscor PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*L. Nigella sativa*). *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 19:757–62.
- Onat T, Emerk K., Sözmén E. (Eds): *İnsan Biyokimyası*, 2. Baskı. Ankara. Palme Yayıncılık. 2006.
- Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2009;7(2):61-70.
- Ökten A. Karaciğerin Fonksiyonel Anatomisi Gastroenterohepatoloji. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. 2001:311-14.
- Önür N. D. ve Beyler A. R. Safra asitleri metabolizması ankara üniversitesi tıp fakültesi mecmuası. 2001;54(1):65-76.
- Özkan A, Fışkın K. Free radicals, carcinogenesis and antioxidant enzymes. *Tr. J. Hem. Oncol.* 2004;14:52-60.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007;87:315–24.
- Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress detection: What for? Part I. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2006;10:291-317.
- Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) *Moleküler Biyoloji*. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Eds). Ankara. Nobel Yayınevi 2007:423-68.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stres. *Molecular Aspects Of*
- Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García Suárez J, Reyes E, Monserrat J, San Antonio E, Melero D, Hera A, Orfao A, Álvarez Mon-Soto M, Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the occurrence of apoptosis in cell culture. *Cytometry* 2002; 48: 185–93.
- Pushpavalli G, Veeramani C, Pugalendi KV. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48:1654–59.
- Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmacotherapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res* 2002;41(2):77-83.
- Randhawa M, Al-Ghamdi MA. Review of phamaco–therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J. Med. Res.* 2002; 41(2): 1–10.

- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
- Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist.* 1994;16:3-6.
- Rouhou SC, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H. *Nigella Sativa L.*: Chemical Composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem.* 2007;101: 673-81.
- Royall JA, Beckman JS, Kooy NW. Peroxynitrite and other nitric oxide-derived oxidants. In: Zapol WM, Bloch KD, editors, *Nitric Oxide and the Lung*, New York, Marcel Dekker Inc., 1997:223-46.
- Salama RHM. Clinical and therapeutic trials of *Nigella Sativa*. *TAF Prev Med Bull.* 2010; 9(5):513-22.
- Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. *International immunopharmacology.* 2005;5:1749-70.
- Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. *International immunopharmacology* 2005;5:1749-1770
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. *Int immunopharmacol.* 2005;5:1749-770.
- Salomi N, Nair SC, Jayawaharanan KK and Varghese CD. Antitumor principles from *Nigella sativa* seeds. *Johns Hopkins Al. Mag.* 1992; 63: 33-6
- Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Pros Natl Acad Sci.* 1989;86: 6328-32.
- Sampson JB, Rosen H, Beckman JS. Peroxynitrite-dependent tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase, myeloperoxidase, and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol* 1996;269:210-8.
- Sancar A, Lindsey BLA, Ünsal KK, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85.
- Schulman H. Nitric oxide a spatial second messenger. *Mol Psychiatry.* 1997;2:296-9.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Genişletilmiş 6. Baskı. E. Ü. Fen Fak. Kitaplar Serisi. 2000;116:394.
- Sheweita SA, Abd El-Gabar M. and Bastawy M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: Role of antioxidants. *Toxicology.* 2001;165:217-24.
- Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ, Çeviri: Seven R, Yatlı T, Erbil Y, Değerli Ü. *Cerrahi Anatomi ve Teknik.* Karaciğer. 2. baskı, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 2000:531-72.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 1984;222:1-15.
- Soleimani H, Ranjbar A, Baeri M, Mohammadirad A, Khorasani R, Yasa N and Abdollahi M. Rat Plasma Oxidation Status After *Nigella Sativa L.* Botanical Treatment in CCL4-Treated Rats *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2008;18:725-731.
- Song O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality?. *C.R. Biologies.* 2004;327:649-62.
- Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann. N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208

- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*. 1992;257:1220-24.
- Strassburg CP. Gastrointestinal disorders of the critically ill Shock liver. *Best Praact Res Clin Gastroenterol*.2003;17: 369-81.
- Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*. 1997;43-8(B):1512–26.
- Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, ve ark. Evaluation of oxidative stres during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochimica at Biophysica Acta*, 2001;1535:186-191.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett*. 2003;140:105-12.
- Szabo´ C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2007;6:662–80.
- Şener A, Ayşegül Gümüş A, Bahar Göker B, Arbak S, Özsavcı D, Yurtsever E. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) Tohumu Ekstresinin Hepatoprotektif ve Antioksidatif Etkileri. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg*. 2010; 24 (3): 167 - 172
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Yayınları 2007; 197: 202.
- Taysi S, Abdulrahman ZK, Okumuş S, Demir E, Demir T, Akan M, Sarıçicek E, Sarıçicek V, Aksoy A, and Tarakcioğlu M. The radioprotective effect of *Nigella sativa* on nitrosative stress in lens tissue in radiation-induced cataract in rat *Cutan Ocul Toxicol*.2014;Early Online:1–6.
- Tekelioğlu M. *Özel Histoloji*. Ankara.ANTIP A.Ş. Yayınları. 2002;3:53-54.
- Thomas M. The Role of Free Radicals and Antioxidants: How do We Know that they are Working. *Critical Rev. Food Sci. Nutr*. 1995;35 (1), 21-39.
- Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 60: 531-48.
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol*. 1997;25:82–8.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria? *Genes Cell*. 1998;3:697-707.
- Türkdoğan MK, Özbek H, Yener Z, Tuncer I, Uygan I, Ceylan E. The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2003;17(8):942-6.
- Türker L, Bayrak A. Çörek Otu (*Nigella sativa* L)'nun Sabit ve Uçucu Yağ Kompozisyonunun Araştırılması. *Standart*. 1997;430:128-37.
- Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *The Biochemist*.1994;16(5):15-22.
- Uygun A ve Polat Z. Viral hepatit dışı serum transaminaz düzeyinde artışa neden olan hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji*. 2009;13(4):211-24.
- Uysal, M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. İçinde F. Gürdöl, E. Ademoglu (Eds.), *Biyokimya* (2nd ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.2010:647-52.

- Valko M, Leibfritz D, Monocol J, Corinin M, Mazur M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44-84.
- Van VA, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol*. 1996;269:175-84.
- Van VA, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1-9.
- Vatansev H, Çiftçi H, Özkaya A, Öztürk B, Evliyaoğlu N, Kıyıcı A. Chemical Composition of *Nigella sativa* L. Seeds Used as a Medical Aromatic Plant from East Anatolia Region, Turkey. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 25, No. 10 (2013), 5490-5492.
- Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol*. 2000;12:719-24.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96:245-54.
- Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*. 2006;13:151-62.
- Wass C, Archer T, Palsson E. Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: Nitric oxide-dependent mechanisms. *Behav Brain Res*. 2006;1:147-53.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(2):105-36.
- Winston GW. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. *Comp. Biochem. Physiol*. 1991; 100: 173-176.
- Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;32(3): 283-92.
- Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med*. 1998;25:4(5):434-56.
- Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Res. Health*. 2003;27(4):277-84.
- Yaman H. Doku ve Plazma 3-Nitrotirozin Düzeylerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Ölçümü. Uzmanlık Tezi. GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD.(2000)
- Yaman H, Ünlü A, Karabıçak U, Çimen B, Balabanlı B, Erbil MK, Türközkan N. Measurement of 3-nitrotyrosine by high performance liquid chromatography. *T. Klin. J. Med*. 2000;18:26-30.
- Yaman İ, Balıkcı E. Protective effects of *Nigella sativa* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp. Toxicol Pathol*. 2010;Mar;62(2):183-90.
- Yang Y, Ahn T, Lee J, et al. Protective effects of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in sprague-dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2007.
- Yıldırım M. İnsan Anatomisi. Altıncı Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 2003;177-80
- Yılmaz T. Sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarına *amaranthus lividus* (a. blitum) bitkisinin antioksidan ve hepatoprotektif etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2010.
- Yokuş B, Çakır DÜ. In vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci*. 2002;22:535-543.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen Species. *Physiol. Rev.* 1994;74(1):139-61.


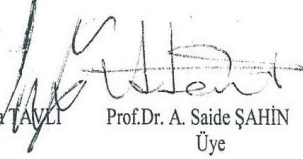
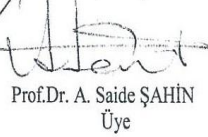



Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois M, Settaf A, Amrouch H, Hassar M. Diuretic and hypotensive effects *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie.* 2000; 55(3):379-82.

Zaoui A, Cherrah Y, Mahassine N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine.* 2002;9:69–74.

(<https://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter>)

9.EKLER
Ek A. Etik Kurul Raporu

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI

Karar Sayısı: 2012-090	Karar Tarihi: 05.12.2012		
<p>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D.'den Yrd.Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV, Nurcan EVLİAYOĞLU ve Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.'den Prof.Dr. Ender ERDOĞAN tarafından sunulan <i>“Nigella sativa'nın ratlarda deneysel karbontetraklorür hepatotoksitesi modelinde koruyucu etkilerinin araştırılması”</i> başlıklı Tez projesi 6 üyenin katılımı ile değerlendirildi.</p> <p>Projede toplam 4 grupta 32 sıçanın kullanılacağı; sıçanların Ketamin anestezisi sonrası eter verilerek sakrifiye edileceği bildirilmiştir.</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen “Etik Kurallara Uygunluk Esası” dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde “Başvuru Sahibinin Sorumlulukları” başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6’da belirtilen “Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler” saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında “Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna”, çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına” sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından “Uygun” olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.</p>			
 Prof.Dr. K. Esra NURULLAHOĞLU ATALIK Başkan	 Prof.Dr. Lema TAVLİ Üye	 Prof.Dr. A. Saide ŞAHİN Üye	 Doç.Dr. Mehmet GÜL Üye
 Dr. M. Metin SENER Üye	 Mustafa ŞİRİN Üye		

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurcan EVLİYAOĞLU

Doğum Yeri: Afyonkarahisar

Doğum Tarihi: 14/04/1979

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim

Lise : Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji

Anabilim Dalı