



**İSKEMİ REPERFÜZYONLA İNDÜKLENEN
RAT OVER HASARI ÜZERİNE TİMOKİNONUN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

Özge Nur TÜRKERİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nuri BAKAN**

Doktora Tezi - 2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSKEMİ REPERFÜZYONLA İNDÜKLENEN
RAT OVER HASARI ÜZERİNE TİMOKİNONUN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

Özge Nur TÜRKERİ

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nuri BAKAN**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İSKEMİ REPERFÜZYONLA İNDÜKLENEN
RAT OVER HASARI ÜZERİNE TİMOKİNONUN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK ETKİSİ**

Özge Nur TÜRKERİ

Tez Savunma Tarihi : 14.06.2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri BAKAN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Taha Abdulkadir ÇOBAN (Binali Yıldırım Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhammet Fevzi POLAT (Bozok Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Overler	3
2.1.1. Overlerin Anatomi	3
2.1.2. Over Histolojisi.....	4
2.2. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu	4
2.3. İskemi Reperfüzyon (I/R)	4
2.3.1. İskemi.....	4
2.3.2. Reperfüzyon.....	6
2.3.2.1. İnflamatuvar Yanıt	7
2.3.2.1.1. Nötrofil-Endotel Etkileşim	7
2.3.2.1.2. Kompleman Sistem Aktivasyonu	9
2.3.2.1.3. Sitokinler ve Diğer Faktörlerin Rolü	9
2.3.2.2. Serbest Radikaller	11
2.4. Antioksidan Sistemler.....	17
2.4.1. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Sistemi	18
2.4.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)	18
2.4.3. Katalaz (CAT).....	19
2.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	19
2.4.5. Ksantin Oksidaz.....	20

2.5. Apoptozis: Programlı Hücre Ölümü	21
2.5.1. Apoptotik Marker Kaspaz-3	22
2.6. Nükleer Faktör Kappa B (NF- K β)	23
2.7. Otofaji	24
2.8. Çörek Otu ve Timokinon	26
2.8.1. Timokinonun Kimyasal Yapısı	27
2.8.2. Timokinonun Metabolizması ve Görevleri	27
2.8.3. Timokinonun Klinik Kullanımı	28
2.8.3.1. Timokinonun Antioksidan Etkisi	30
2.8.3.2. Timokinonun Antiinflamatuvar Etkisi	31
2.8.3.3. Timokinonun İmmunolojik Etkisi	32
2.8.3.4. Timokinonun Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi	32
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Etik Kurul Onayı	34
3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikler	34
3.1.3. Çalışmadaki Deney Grupları	34
3.1.4. Cerrahi İşlemler	34
3.1.5. Kimyasallar, Cihazlar ve Ekipmanlar	36
3.2. Metot	38
3.2.1. Biyokimyasal Analizler	38
3.2.1.1. Tampon Hazırlama	38
3.2.1.2. Protein Ölçümü	39
3.2.1.3. Malondialdehit (MDA) Tayini	40
3.2.1.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini	42

3.2.1.5. Glutasyon (GSH) Tayini	44
3.2.1.6. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini	45
3.2.1.7. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayini	46
3.2.1.8. Rat IL-1 β (Interlökin 1 Beta) ELISA Tayini	48
3.2.1.9. Rat TNF- α (Tümör Nekroz alfa) ELISA Tayini	50
3.2.2. İmmunohistokimyasal Analiz	52
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR.....	54
4.1. Biyokimyasal Bulgular	54
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	61
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	71
EKLER	96
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	96
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BAYAN FORMU ONAY FORMU.....	97
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	98

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü yardımını, desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Nuri BAKAN' a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm hocalarım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ebubekir BAKAN' a, Prof. Dr. F. Zuhâl UMUDUM' a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ' a, Dr. Öğr. Üyesi Zafer Bayraktutan' a ve Anabilim Dalımız emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN' e çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Betül Özgeriş' e, Dr. Nezahat Kurt' a, Arş. Gör. Mehmet Ali GÜL' e ve Dr. Elif POLAT' a, tez çalışmamda büyük yardımları olan Dr. Öğr. Üyesi Ayhan Tanyeli' ye ve Temel Tıp Bilimleri bölümü ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı sekreteri Keriman ERDEN'e, tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Araştırma ve uygulama merkezi Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.

Özge Nur TÜRKERİ

ÖZET

İskemi Reperfüzyonla İndüklenen Rat Over Hasarı Üzerine Timokinonun Biyokimyasal ve Histopatolojik Etkisi

Amaç: Çalışmamızda timokinonun, iskemi reperfüzyon oluşturulan rat overlerinde meydana gelen hasara karşı koruyucu etkinliği olup olmadığını saptamak amacıyla over dokusunda otofaji yolakları, oksidan-antioksidan ve inflamasyon belirteçlerine bakıldı.

Materyal ve Metot: Rastgele 5 gruba bölünen ve overlerinde iskemi reperfüzyon oluşturulan ratlara belirlenen dozlarda timokinon uygulandı. Cerrahi işlem ile elde edilen over dokularından SOD, GSH, TAS, TOS, MDA, IL-1 β ve TNF- α gibi belirteçler spektrofotometrik olarak tayin edildi. Histopatolojik olarak Caspase-3, LC3B ve NF-K β 1 antikolları ile yapılan immunohistokimyasal boyamalardan sonra ışık mikroskobu altında incelenen dokular immunpozitiflik açısından değerlendirildi.

Bulgular: İskemi/reperfüzyon gruplarında doku MDA, TOS ve OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekken uygulanan TQ ile MDA, TOS ve OSİ düzeyleri anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.05$). Doku GSH, SOD ve TAS düzeyleri I/R grubunda anlamlı derecede düşükken tedavi sonrası anlamlı derecede yükselmiştir ($p<0.05$). Doku IL-1 β ve TNF- α I/R gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekken tedavi sonrasında anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.05$). Caspase 3 ve NF-K β 1 immunpozitifliği Sham ve deneme gruplarında tespit edilemezken LC3B immunpozitifliği açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.05$) belirlenmiştir.

Sonuç: Uygulanan timokinonun I/R hasarı ile düşen TAS, GSH, SOD seviyelerinde anlamlı bir artışa ve I/R hasarı yükselen MDA, IL-1 β , TNF- α seviyelerinde anlamlı bir düşüşe sebep olarak dokuları iskemik hasardan koruduğu kanaatine varılmıştır. Histopatolojik sonuçlarda Caspase 3 ve NF-K β 1 immunpozitifliği açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemezken otofajinin belirteci olan LC3B immunpozitifliği açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon, Oksidatif stres, Timokinon

ABSTRACT

Biochemical and Histopathological Effects of Timokinone on Ischemia-Reperfusion-Induced Rat Ovarian Injury

Aim: In our study, the autophagy pathways, oxidant-antioxidant and inflammation markers of ovarian tissue were investigated in order to determine whether thymokinone has a protective effect against experimentally induced ischemia-reperfusion in rat ovaries.

Material and Method: The rats, which randomly divided into 5 groups and were experimentally induced ischemia-reperfusion in their ovaries, were administered timokinon at the determined doses. The markers such as SOD, GSH, TAS, TOS, MDA, IL-1 β and TNF- α were determined spectrophotometrically from ovarian tissues obtained by surgical procedure., Tissues examined histopathologically under light microscopy were evaluated for immunopositivity after immunohistochemical staining with Caspase-3, LC3B and NF-K β 1 antibodies.

Results: While MDA, TOS and OSI levels in tissue were significantly higher in ischemia/reperfusion groups compared to the control group, TQ and MDA, TOS and OSI levels were significantly decreased ($p < 0.05$). GSH, SOD and TAS levels in tissue were significantly lower in the I/R group but after treatment they increased significantly ($p < 0.05$) IL-1 β and TNF- α in tissue were significantly higher in I/R groups than control group but after treatment they decreased significantly ($p < 0.05$). While Caspase 3 and NF-K β 1 immunopositivity could not be detected in Sham and experimental groups, statistically significant difference ($p < 0.05$) was determined between the groups in terms of LC3B immunopositivity.

Conclusion: It was concluded that thymokinone protected the tissues from ischemic damage by causing significant increase in TAS, GSH and SOD levels that were decreased by I/R injury and significant decrease in elevated levels of MDA, IL-1 β and TNF- α that were increased by I/R injury. As a histopathological result, while there was no statistically significant difference between the groups in terms of the immunopositivity of Caspase3 and NF-K β 1, a statistically significant difference was found between the groups in terms of the immunopositivity of LC3B which is a marker of autophagy.

Keywords: Ischemia Reperfusion, Oxidative stress, Timokinon

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATADEM	:	Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
ATP	:	Adenozin Trifosfat
Ca	:	Kalsiyum
CAT	:	Katalaz
GSH	:	Glutasyon
GSH-Px	:	Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
I/R	:	İskemi Reperfüzyon
K	:	Potasyum
MDA	:	Malondialdehit
Na	:	Sodyum
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κβ	:	Nükleer faktör-kappa β
NS	:	Nigella Sativa
O₂^{•-}	:	Süperoksit Radikali
OH[•]	:	Hidroksil Radikali
PI3K	:	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKC	:	Protein Kinaz C
PMNL	:	Polimorf Nüveli Lökositler
PUFA	:	Poliansatüre Yağ Asitleri
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SOR	:	Serbest Oksijen Radikali
TAS	:	Total Antioksidan Statüsü
TNF-α	:	Tümör Nekroz Faktör

TOS	:	Total Oksidan Statüsü
TQ	:	Timokinon
XO	:	Ksantin Oksidaz
Cu	:	Bakır
Zn	:	Çinko



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Uterus-Vajina-Tubalar-Overler-Ligamentler	3
Şekil 2.2. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik Ca ⁺² artışının sebep ve sonuçları.....	6
Şekil 2.3. İskeminin şematik olarak tarif edilmesi	7
Şekil 2.4. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri	15
Şekil 2.5. Apoptoza uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları.....	21
Şekil 2.6. Kaspaz aktivasyon mekanizması	23
Şekil 2.7. Otofaji mekanizma aşamaları	25
Şekil 2.8. Nigella sativa.....	26
Şekil 2.9. TQ ve türevleri	27
Şekil 2.10. Timokinonun etki mekanizması	28
Şekil 2.11. Timokinon hedefleri	29
Şekil 2.12. TQ ve antiinflamatuvar aktivite ilişkisi.....	32
Şekil 3.1. Deneysel olarak İskemi Oluşturulan Ratlar.....	35
Şekil.3.2. IL-1β Deney Prosedürü	49
Şekil 3.3. TNF- α Deney Prosedürü	51
Şekil 4.1. Over Dokusu SOD Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı	55
Şekil 4.2. Over Dokusu MDA Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı.....	56
Şekil 4.3. Over Dokusu GSH Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı	57
Şekil 4.4. Over Dokusu OSİ Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı	58
Şekil 4.5. Over Dokusu TNF-α Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı	59
Şekil 4.6. Over Dokusu IL1-β Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı.....	60
Şekil 4.7. Caspase 3 boyamad immunnegatiflik.....	62
Şekil 4.8. NF- Kβ 1 boyamada immunnegatiflik.....	62

Şekil 4.9. LC3B boyamada immunpozitiflik..... 63



TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Ürünleri.....	12
Tablo 2.2. Hücrede Serbest Radikal Kaynakları.....	17
Tablo 3.1. Kimyasal ve Kitler.....	37
Tablo 3.2. Cihazlar ve ekipmanlar.....	38
Tablo 3.3. Protein Tayini.....	40
Tablo 3.4. MDA Tayini.....	41
Tablo 3.5. SOD Tayini.....	43
Tablo 3.6. GSH Tayini.....	45
Tablo 3.7. TAS Tayini.....	46
Tablo 3.8. TOS Tayini.....	47
Tablo 4.1. Over dokusundaki analit düzeyleri.....	54
Tablo 4.2. Over dokusundaki SOD' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu... 55	55
Tablo 4.3. Over dokusundaki MDA' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu.. 56	56
Tablo 4.4. Over dokusundaki GSH' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu... 57	57
Tablo 4.5. Over dokusundaki OSİ' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu..... 58	58
Tablo 4.6. Over dokusundaki TNF- α ' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu.59	59
Tablo 4.7. Over dokusundaki IL1- β ' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu.. 60	60
Tablo 4.8. Caspase 3, LC3B ve NF- K β 1 Antikorları İle Yapılan Boyamalar Sonucu Elde Edilen Veriler.....	61

1. GİRİŞ

Kadınlarda over torsiyonu, gerek çocuklukta gerekse ergenlikte overlerdeki kan dolaşımını engelleyerek oofektomi (overlerin çıkarılması) ile sonuçlandırılan jinekolojik bir sendromdur.¹ Torsiyonun erken fark edilmesi durumunda, infarktüse gidişin önüne geçilebilir. Bu durumda kan akımını yeniden sağlamak amacı ile over detorsiyonu yapılır.^{2,3} Fakat over torsiyonunda, kan akımı düzeltilmesine rağmen iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı oluşabilir. Bu durumda organizmada çeşitli problemler ortaya çıkabilir.⁴ Hasara sebep olan mekanizma tam olarak aydınlatılmamakla beraber yapılan çalışmalar I/R hasarında, polimorf nüveli lökosit (PMNL)'lerin ürettiği serbest oksijen radikallerinin (SOR), sitokinlerin ve kompleman aktivasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir.^{5,6}

Over, testis, beyin, böbrek, miyokard ve diğer organlarda meydana gelen I/R hasarı sonucu hidroksil radikalleri (OH^{*}), hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit radikalleri (O₂^{*}), vb. reaktif oksijen moleküllerinde önemli derecede bir artış gözlenmektedir.^{7,8} Artan reaktif oksijen molekülleri ve bu moleküllerin ürünleri hücre membranlarında hasara sebep olurlar.⁹ Reperfüzyon ile oluşan doku hasarının diğer bir patogenezi ise serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin salınımına sebep olan aktive olmuş nötrofil birikimidir. Dokularda oluşan I/R hasarını önlemek amacı ile genellikle antiinflamatuvar ve antioksidan savunma sistemleri etkin rol oynamaktadır.^{10,11}

Bu önemli savunma sistemlerini harekete geçiren antioksidanların başında folik asit (Folat), α -tokoferol (Vitamin E) ve askorbik asit (Vitamin C) vb. vitaminlerin yanı sıra katalaz 1 (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ayrıca hemoglobin, melatonin, transferin, miyoglobin, ferritin, bilirubin gibi organik bileşikler yer almaktadır.¹²

'Nigella sativa (NS)' yani çörek otu 2000 yılı aşkın süredir orta ve yakın doğu ülkelerinde pek çok hastalığın tedavisi için kullanılmış önemli bir bitki türüdür. NS tohumlarının temel bileşenlerinden biri olan timokinon (TQ) bir monoterpendir. Birçok çalışmada TQ' nun antibakteriyel, antitümör, antioksidan, antineoplastik, antifungal, antiinflamatuvar, antiülser, antialerjik ve antikanserojen etkileri gösterilmiştir. Ayrıca TQ' nun santral sinir sistemi (SSS) üzerine olumlu etkilerini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Tüm bunların yanı sıra TQ' nun hücre döngüsü, bağışıklık sistemi ve apoptozisde önemli etkileri olduğu bilinmektedir.^{13,17}

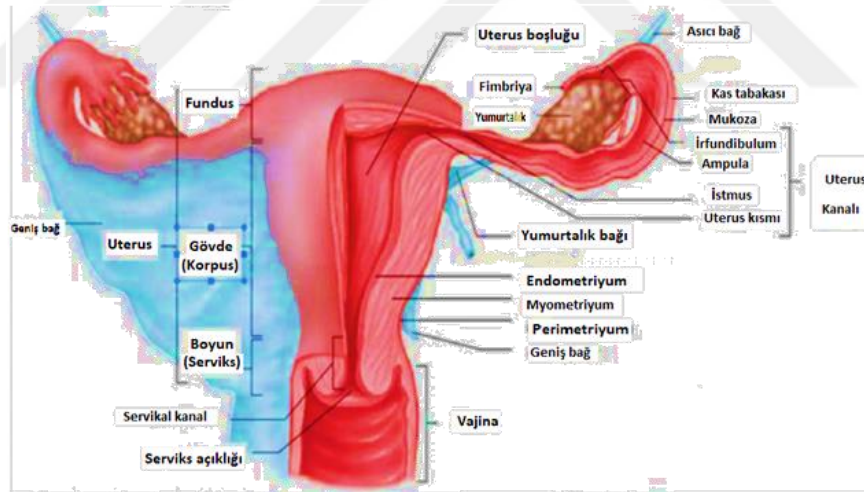
Antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri ile bilinen TQ' nun over I/R hasarı üzerine etkisinin olup olmadığı ile ilgili herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada rat overlerinde deneysel olarak I/R ile oluşan hasarın önlenmesinde TQ' nun etkinliğinin olup olmadığı araştırmayı amaçladık. Bu sebeple, over I/R sonrası, over doku örneklerinde IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinleri, malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH), total oksidan statusü (TAS), total antioksidan statusü (TOS) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi oksidatif stres parametreleri düzeylerinin ölçümü yapıldı. Histopatolojik olarak doku örnekleri Caspase 3, LC3B ve NF κ B1 antikorları ile yapılan immunohistokimyasal boyamalardan sonra ışık mikroskobu altında incelenerek immunpozitiflik değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Overler

2.1.1. Overlerin Anatomi

Kadın üreme sistemindeki en temel organların başında gelen overler erkek üreme sistemindeki testislerin karşılığını oluşturur. Overler, uterusun hem sağına hem de soluna yerleşmiş olup iki adettir.¹⁸ Erişkinlik dönemine ulaşmış dişilerde overlerin şekli ovoid şeklinde olup genişliği 1,5-2 cm, kalınlığı 1 cm ve uzunluğu 3-4 cm aralığında değişmektedir. Ağırlıkları 45 g.' a kadar çıkmaktadır ve yaşla beraber atrofiye uğrayan overlerin ağırlıkları 23 g.' a kadar düşebilir.¹⁹ Overler pelvik boşluğunda suspensoriyum (ovaryan) ve infundibulo-pelvik (asıcı) bağlarıyla bağlıdır. Suspensoriyum bağ ovaryumun uterusu tutunmasını sağlarken, infundibulo-pelvik bağlar ise sahip olduğu damar ve sinirler sayesinde ovaryumun beslenmesini sağlamaktadır.^{20,21}



Şekil 2.1. Uterus-Vajina-Tubalar-Overler-Ligamentler²²

Abdominal aortanın bir dalı olan ovaryan arterler, overlere kan getiren esas damardır ve birinci lumbal vertebra aracılığı ile renal arterin alt kısmından aortadan ayrılır. Overin venleri, ovaryan arterler ile yükselir ve pampiniform pleksusu oluşturur. Karın boşluğunda sağ ovaryan ven inferiyor vena kavaya, sol ovaryan ven sol renal vene açılır.²³

2.1.2. Over Histolojisi

Overler makroskobik olarak dışta korteks (kabuk) ve ite medulla (öz) bölgelerinden oluşur. Korteks dışta medullayı çevreleyen ve follikülleri içeren hücrelerce zengin, asellüler kollajenöz bağ dokudan oluşan kısımdır. Damarlarca zengin gevşek fibroelastik bağ dokunun oluşturduğu kısım ise medulla bölgesidir. Histolojik özellikleri bakımında oldukça farklılık gösteren bu iki kısım arasında keskin bir sınır bulunmamaktadır.^{24,25}

2.2. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu

Overlerin beklenmeyen nedenler sonucunda dönmesi ile kan akımının kesilmesi over torsiyonu ya da adneksiyel torsiyon olarak bilinmektedir. Sık görülmemekle beraber akut abdominal ağrının önemli bir nedeni olarak gösterilmekte ve ağır morbiditeye sebep olmaktadır.²⁶

Over torsiyonun etiyojisi kesin olarak bilinmemekle beraber olguların büyük bir kısmında overde kitleye rastlanmaktadır. Overlerde meydana gelen torsiyon normal şartlarda nadir görülen bir durumdur. Polikistik overler ya da benign kistik teratom gibi ağır ovaryen kitlelere sahip overler torsiyona eğilim göstermektedir. Bunun yanında gebelik de risk faktörlerinden birisi sayılmaktadır.^{24,28}

Destekleyici bağlar, suspensoriyum ve infundibulo-pelvik bağların hareketliliği de over torsiyonuna sebep olabilmektedir. Torsiyon durumunda her iki bağda birbiri etrafına döner ve sonuç olarak kan akımına neden olur. Öncelikle venöz kan akımı kesilir, arteriyel kan akımı durur. Bu durumu takiben dokusal hasar, ödem, renk değişikliği, iskemi ve son olarakta nekroz oluşur.²⁹

2.3. İskemi Reperfüzyon (I/R)

2.3.1. İskemi

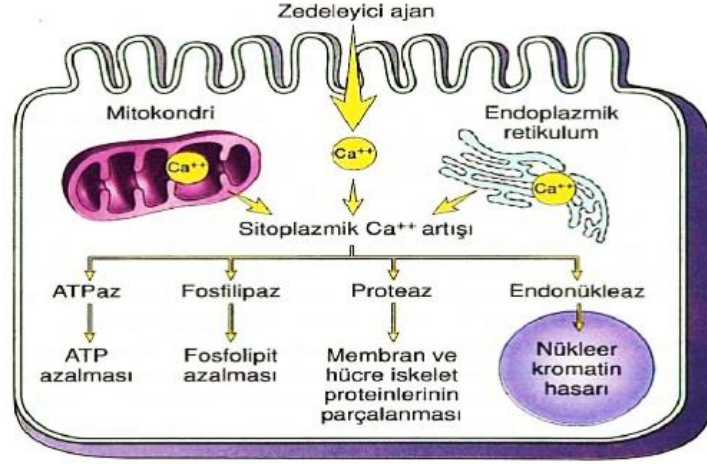
İskemi kelimesi, Yunancadan köken alıp engelleme anlamına gelen “iskho” ve kan

anlamına gelen “hàima” kelimelerinin birleşmesi sonucu oluşmuştur. İskemi, dokulara veya organlara giden damarların pıhtı, mekanik etkenler vb. nedenlerle tıkanması ile dokunun oksijen ve yaşamı için gerekli besinleri alamaması anlamına gelmektedir.^{30,31} İskemi sonrası doku ve organların reperfüzyonu paradoksal olarak organ ve doku hasarını arttırmaktadır ki bu olay iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı olarak adlandırılmaktadır. I/R hasarında iskemideki hipoperfüzyona ek olarak iltihabi cevap ve birçok organda disfonksiyon sendromları ortaya çıkmaktadır.³²

İskemi, hipoksinin en sık görülme durumudur. Hücrelerin fonksiyonlarını düzgün bir şekilde sürdürmeleri için oksijen olmazsa olmazlarıdır. İskemi sırasında dokulara yeterince oksijen taşınmaz. Böylece hipoksi ile birlikte hücre fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi kimyasal olay meydana gelir. İskeminin yoğunluğu, süresi, hücre ve organ tiplerinin metabolik gereksinimleri iskemi hasarının şiddetini belirler.³³

İskemiden dolayı hipoksiye maruz kalan hücrelerde oksidatif fosforilasyona bağlı olarak ATP üretimi yavaşlar ya da durur. Fakat hücreler tarafından ATP tüketilmeye devam eder ve ATP, AMP ve adenezine parçalanır.³⁴ Adenezin hücre dışına diffüze olur. Sonuçta inozin ve hipoksantin oluşur. Hipoksik durumda ksantin dehidrogenaz enzimi aktifleşemez, dolayısıyla hipoksantin ksantin oksidaz (XO) ile metabolize olur ve ksantin oluşur. Tüm bu reaksiyonlar sonucunda ortaya serbest oksijen radikalleri çıkar.^{35,37} Sodyum- potasyum (Na-K) pompaları da ATP sentezinin bozulması ile durur. Böylece hücrenin elektrolit dengeside bozulmuş olur ve hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının akışı başlar. Hücre içi Ca^{+2} artışı proteolitik enzim ve fosfolipazların aktive olmasını sağlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşumu ile sonuçlanır. Araşidonik asit direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunda artışa sebep olur.^{38,39} İskeminin erken safhasında, dokuda bu metabolik olaylar sonucu

konjesyon kanama ve ödem görülür.⁴⁰



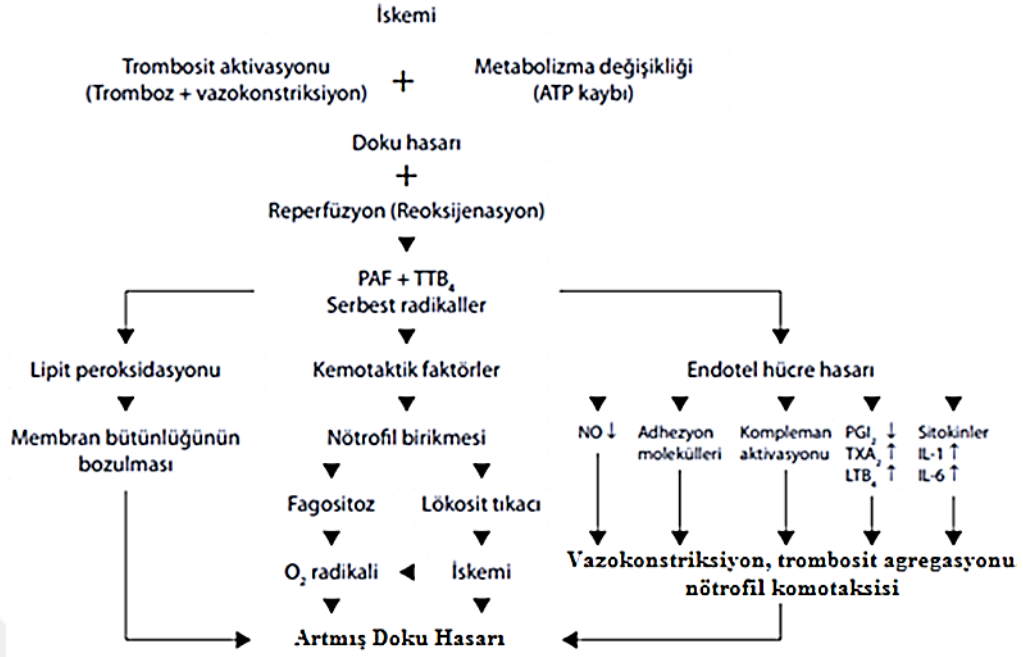
Şekil 2.2. Hücre zedelenmesi sonucu sitoplazmadaki Ca^{+2} artışının sebep ve sonuçları⁴¹

2.3.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye önlemek ve kan akımını yeniden sağlamak amacı ile iskemi sonrası dokunun geliştirdiği mekanizmalar sonucu dokudaki oksijen miktarının artması olarak tanımlanır.^{30,32}

Reperfüzyon sonucunda dokuda serbest oksijen radikalleri artar, endotel hücreleri hasarlanır, kompleman sistemi aktifleşir, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) göçü başlar ve meydana gelen bu faktörler aslında dokuda iskemi hasarından daha fazla hasara yol açar.^{42,44}

Reperfüzyon hasarında, serbest oksijen radikallerinin ve nitrik oksit sentaz enzim düzeylerinin artması, lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesi, lökositlerdeki integrinlerin olaya karışması, endoteldeki selektin ekspresyonunun görülmesi, Na-K pompasının bozulması, intraselüler Ca^{+2} iyonunun artışı, protein kinaz C' nin (PKC) aktivasyonu, fosfotidil inositol 3 kinaz-protein kinaz B (PI3K-Akt) ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) vb. hücre sinyal yollarının çalışması gibi henüz netliğe kavuşmamış çeşitli mekanizmalar sonucu hücrede nekroz ya da programlı hücre ölümü ile sonuçlanan patolojik durum ortaya çıkar.^{45,49}



Şekil 2.3. İskeminin şematik olarak tarif edilmesi⁵⁰

Reperfüzyon hasarından sorumlu başlıca iki mekanizma vardır. Bunlar;

A. İnflamatuvar Yanıt

- Nötrofil- Endotel Etkileşimi
- Kompleman Sistem Aktivasyonu
- Sitokinler ve Diğer Faktörlerin Rolü

B. Serbest Oksijen Radikal Oluşumu' dur.

2.3.2.1. İnflamatuvar Yanıt

Reperfüzyon sonrasında meydana gelen inflamatuvar yanıt kompleman sistem ve PMNL-endotel aktivasyonu şeklinde gözlenir. İnflamatuvar cevabın reperfüzyonla ilişkili vücudun bir bölgesini veya temel bir organını etkilemesi durumunda çok sayıda sitokin, kemokin ve proinflamatuvar metabolitler dolaşıma geçer ve bu durumda inflamasyon bütün vücuda yayılabilir.

Başlangıçtaki inflamasyonun şiddetine göre proinflamatuvar sonuçları değişebilir ve bu durum organdan organa farklılık gösterebilir.⁵¹

2.3.2.1.1. Nötrofil-Endotel Etkileşim

Nötrofiller inflamatuvar yanıtın ve reperfüzyonla ilişkili lezyonların oluşumunda

ciddi bir role sahiptir.⁵¹ Nötrofiller doku hasarından sorumlu ve I/R da ilk aktive olan hücrelerdir. Nötrofillerin inflamasyon bölgesine göç işlemi üç aşamalı bir şekilde meydana gelir. Bu aşamalar nötrofillerin endotele zayıf adhezyonu, nötrofillerin endotele sıkı adhezyonu ve nötrofil göçü şeklinde olmaktadır.

Endotele nötrofillerin zayıf adhezyonu ile endotel yüzeyindeki H- selektin ve P- selektin ile PMNL yüzeyindeki P-selektin glikoprotein-1 (PSGL_1) etkileşerek lökositin endotele yapışması gerçekleşir. Bu yapışmayı endotele nötrofillerin sıkı adhezyonu takip eder. Reperfüzyon ile oluşan inflamatuvar yanıt ile integrin ve reseptör oluşumu uyarılır. Endotelial interselüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) reseptörleri ile lökositlerin üzerindeki β_2 integrinler arasındaki etkileşim ile endotel-lökosit adhezyonu gerçekleşir.^{52,53} Son basamak olan nötrofil göçünde endotelial hücreler arasından lökositler geçer ve inflamasyon bölgesine trans-migrasyon olayı başlar. İmmunoglobulin süper familyasından PECAM-1 ve kemotaktik ajanların bu göç olayında etkili bir rol üstlendiği bilinmektedir.

I/R hasarında PMNL'ye bağlı olan doku hasarı, nötrofil sitoplazma granüllerinden proteaz, elastaz lipooksijenaz ve fosfolipaz kollajenaz gibi proteolitik enzimler salınır. Bunun yanında doku hasarına, NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) oksidasyonu sonucunda oluşan SOR ve kapiller düzeyde lökosit tıkaçlarının oluşmasında yol açmaktadır. Bütün bunlar iskemik dokuda hasarın artmasında PMNL nin rolü olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, dokunun reperfüze olması nötrofil aktivasyonunu ve göçünü uyararak, kısır bir döngü oluşturup doku hasarına sebep olmaktadır.^{54,58}

TNF- α ve IL-1 moleküllerinin, makrofaj hücreleri ile mast hücrelerinden ve aktive olmuş nötrofiller tarafından sentezlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{59,60} TNF- α ve IL-1 reseptör ekspresyonundaki artış ICAM-1' in ekspresyonunu ve NADPH oksidazı uyararak nötrofil adhezyonunu ve degranülasyonunu artırır.⁶¹

2.3.2.1.2. Kompleman Sistem Aktivasyonu

Yaklaşık 30 proteinden meydana gelen kompleman sistem vücutta doğal bağışıklık sistemi üzerinde önemli rol oynar. Kan plazmasında inaktif bir şekilde bulunan enzimler sırayla etkileşir ve inflamasyona bağlı kompleman sistem aktifleşir. Aktive olan proteinler, inflamasyon bölgesinde vazodilatasyona, vasküler permeabilitenin artmasına ve fagositlerin endotele yapışmasında uyarıcı bir etkiye sahiptirler.⁶²

Kompleman sisteminin aktivasyonu ile C3a, C5a, iC3b ve C5b-9 gibi önemli proinflamatuvar komponentler oluşur. Anaflatoksinlerden C3a ve C5a lökositleri aktive eder. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarıcı C5a ayrıca makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, IL-1, IL-6 ve TNF- α üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır.⁶³

Bunun yanı sıra kompleman sistemdeki bu aktivasyon birçok sitokinin sentezini ve salınımını uyararak inflamatuvar cevapta artışa sebep olmasına rağmen hala kompleman sistemin I/R hasarındaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.3.2.1.3. Sitokinler ve Diğer Faktörlerin Rolü

Hücreler arası iletişimde rol oynayan sitokinler, birçok biyolojik fonksiyonları düzenleyen hormon benzeri moleküllerdir. Sitokinler, oldukça düşük molekül ağırlığına sahip protein veya glikoprotein yapısındadır. Özellikle makrofajlar ve aktive olmuş lenfositler ile pek çok hücre tarafından sentezlenmektedir.^{64,65}

Sitokinler, ilk olarak Cohen ve arkadaşları tarafından başta immun sistem hücreleri olmak üzere pek çok hücre tarafından salgılanan, doku tamiri, bağışıklık, hücre gelişmesi, hücre çoğalması gibi birçok görevi olan polipeptitler olarak tanımlanmıştır.⁶⁶ Sitokinler ilk başlarda salgılandığı yere göre farklı isimler ile anılmıştır. Bunlardan lenfositler tarafından salgılanan sitokinlere lenfokin, monositler tarafından salgılanan sitokinlere monokin, lökositler tarafından salgılanan sitokinlere interlökin denilmiştir.⁶⁷

Çalışmalar yapıldıkça birçok farklı hücre tarafından benzer sitokinlerin salgılandığı tespit edilmiş ve sitokinlerin hücreler üzerinde yaptığı etkiler göz önüne alınarak kemotaktik sitokinler, proinflamatuvar sitokinler, antiinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörü sitokinler ve immun düzenleyici sitokinler olmak üzere 5 ana grupta toplanmıştır.⁶⁸

Hormonlara pek çok yönden benzeyen sitokinler, hormonlar gibi özelleşmiş bir dokudan değil de, farklı hücreler tarafından sentezlendiği için hormon sınıfında kabul edilmezler.⁶⁹

Sitokinler salgılandıkları hücreye etki ediyorsa otokrin, yakınındaki bir hücreye etki ediyorsa parakrin, uzaktaki bir hücreye etki ediyorsa endokrin etki olarak tanımlanır.⁷⁰ Sitokinler birbirlerinin fonksiyonlarını etkileyerek antagonist veya sinerjistik etki de gösterebilirler.⁷¹

TNF- α , IL-1 β ve IL-6 doğal immüniteye aracılık eden başlıca sitokinlerdir. Özellikle TNF- α I/R' da inflamatuvar yanıtın oluşmasında önemli rol oynar.⁷²

TNF- α hücre yüzeylerindeki reseptörler aracılığı ile hücresel etkinlik gösterirler. Özellikle enflamasyonda PMNL' e karşı endotel hücrelerin yüzeylerini ICAM-I, NCAM-I, ELAM-I gibi adhezyon molekülleri varlığında daha yapışkan olmasını sağlar. Bunun yanı sıra nötrofiller üzerine de etki ederek endotel hücrelerin yapışkan özelliklerini artırır. Yani TNF- α ' nın PMNL' e bağlı hasarda rol oynamaktadır.⁷³

Tek çekirdekli fagositik hücre ve damar endotel hücrelerine etki eden TNF- α , IL-1 β ve IL-6' nın dolaşıma salınmasını uyarır.⁷⁴

Yüksek konsantrasyonlarda TNF- α , damar düz kaslarını gevşetir, kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Bu özelliği ile düz kas hücrelerini doğrudan etkileyip damar genişletici moleküller olan NO, prostasiklini uyararak dolaylı yoldan öldürücü etkilere sebep olabilir. Temel kaynağı aktive mononükleer fagositler olan IL-1 β , TNF- α ile yakın biyolojik etkilere sahiptir. IL-1 β ' nın etkinliği dolaşımdaki sitokin miktarına bağlıdır.

Düşük konsantrasyonda bölgesel inflamatuvar yanıtta aracılık eden IL-1 β ' nin mononükleer fagositlere ve damar endoteline etkisi ile daha sonraki kendi sentezini arttırır. Bunun yanı sıra IL-6' nin sentezini de tetiklediği bilinmektedir. Aslında IL-1 β doğrudan doğruya doku hasarı oluşturmaz fakat TNF- α ' ın neden olduğu doku hasarını potansiyelize eder.⁷⁵

2.3.2.2. Serbest Radikaller

Biyokimyasal redoks tepkimeleri sonucu ortaya çıkan, son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran ve bu sebeple kolayca elektron alıp verebilen organik ya da inorganik kaynaklı atom ya da moleküllere serbest radikaller denir. Son derecede reaktif olan bu moleküller diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girme eğilimindedirler. Aerobik metabolizma süresince hücre içerisinde devamlı olarak oluşan bu radikallerin bazı patolojik durumlarda üretimleri de hızla artmaktadır.⁷⁶

Canlılarda endojen ve eksojen kaynaklı olarak üretilen serbest radikallerden endojen kaynaklı olanlar, mitokondrial elektron taşıma sistemi, lipooksijenaz, fagositik hücreler, otooksidasyon, yaşlanma, oksidan enzimler vb. nedenler sonucu oluşurlar.⁷⁷

Bunun yanı sıra, indirgenme-yükseltgenme (redoks) ürünleri, radyasyon, alkol, uyuşturucu, sigara, ilaç oksidasyonları ve ağır metaller eksojen radikal kaynakları olarak bilinirler⁷⁸.

a. Serbest Oksijen Radikalleri

Organizmada oksidasyon reaksiyonları, moleküler oksijene tek bir elektron transferiyle sonucunda oluşur. Moleküler oksijen ise oldukça yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturmaya meyillidir.⁶²

Oksijene 1 elektron transferiyle süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), 2 elektron transferiyle H_2O_2 meydana gelir.⁷⁹ İki den fazla elektron alabilen ve oldukça güçlü oksidan olan H_2O_2 sitotoksik ürünlere dönüşebilir.⁸⁰ Ferro demir (Fe^{+2}) üçüncü elektronunu hidrojen

perokside transfer ederse O-O bağı kırılarak, su (H₂O) ve hidroksil (OH[•]) radikali meydana gelir. En güçlü radikal olarak bilinen serbest radikal OH[•] radikalidir.⁸¹ Oluşan tüm reaktif ara ürünlerin hepsi radikal olmayıp Tablo 2.1.' de radikal ve radikal olmayan gruplar gösterilmiştir

Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Ürünleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Hidrojen Peroksid (H ₂ O ₂)
Hidroksil (OH [•])	Singlet Oksijen (¹ O ₂)
Hidroperoksil (HO ₂ [•])	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkoksil (RO [•])	Peroksinitrit (ONOO ⁻)
ROO [•] Peroksil	Ozon (O ₃)
Nitrik Oksit (NO [•])	Lipid Hidroperoksid (LOOH)
Azot Dioksit (NO ₂ [•])	

- **Süperoksit Radikali (O₂^{•-})**

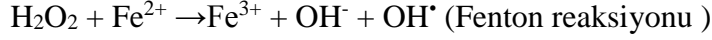
Hücrede redükte olmuş elektron taşıyıcıları otooksidasyon ile süperoksit radikali (O₂^{•-}) ni oluşturur. Haber-Weiss reaksiyonu bu reaksiyonların en önemlisini oluşturur. Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda demir varlığında etkileşen O₂ ve H₂O₂ güçlü bir reaktif olan HO[•] radikaline dönüşür. Bu güçlü reaktif molekülü özellikle DNA gibi yapılarla etkileşerek ciddi hasarlara sebep olabilmektedir.

Süperoksit radikallerinin yarılanma ömürleri oldukça kısadır ve dismutasyon reaksiyonları ile O₂ ve H₂O₂ meydana getirirler. Kendiliğinden meydana gelen bu reaksiyonu katalizleyen enzim süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir.⁸²

Reaktif oksijen türü olan ONOO⁻, süperoksit radikalının nitrik oksit (NO[•]) ile reaksiyona girmesi ile meydana gelir. Peroksinitrit, nitrat (NO³⁻) ve nitrit (NO²⁻) meydana getirmek üzere metabolize olur. Ayrıca nitronyum iyonu (NO²⁺), azot dioksit (NO^{2•}), hidroksil radikali(OH[•]), gibi toksik ürünlere çevrilebilen peroksinitrit, nitrik oksitin (NO[•]) zararlı etkilerinden sorumludur.^{79,80}

- **Hidrojen Peroksit (H₂O₂)**

Fenton reaksiyonu ile Fe²⁺ veya diğere geçiş metallerinin ve süperoksit radikalinin (O₂^{•-}) varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) en güçlü radikal olan OH[•] oluşturur.



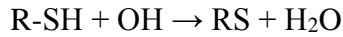
Süperoksit radikalinden farklı olarak H₂O₂ olarak lipofilik olduğundan oluştuğu yerin uzağında bulunan ve Fe²⁺ barındıran hücrel membranlarda da hasar oluşturabilir.^{83,84}

- **Hidroksil Radikaller (OH[•])**

Yarılanma ömürleri oldukça kısa olan (9-10 sn) ve son derece reaktif olan (OH[•]) radikalleri H₂O' un hidrolizi ve H₂O₂ in geçiş metallerinin indirgenmesi sırasında oluşabilir.



Hidroksil radikali, tioller gibi birçok biyolojik molekülden hidrojen atomunu koparabilir.⁸⁵



Bu reaksiyonla oluşan sülfür radikali O₂ ile birleşerek sülfenil ve tiyol peroksil vb. oksisülfür radikallerini oluşturur. Oluşan radikaller biyolojik sistemlerde molekül bazında hasar yapıcı etkiye sahip olup OH[•] nin lipid peroksidasyonunu arttırması en iyi bilinen biyolojik hasarıdır.

- **Nitrik Oksit (NO)**

L -argininden nitrik oksit sentaz enzimi ile üretilen nitrik oksit, azot monoksit veya nitrojen monoksit olarak da bilinmektedir. NO' deki oksijen eşlenmemiş bir elektron içerdiği için süperoksit radikalleri ve geçiş metalleriyle kolayca reaksiyona girme eğilimindedir. NO' nun yarı ömrü oldukça kısadır. NO radikali, O₂^{•-} ya da H₂O₂ ile

reaksiyona girerek, onlardan daha oksidan bir molekül olan (ONOOH⁻) oluşturur. Peroksinitrit bir radikal olmamasına rağmen ileri derecede reaktif olan OH[•] radikali oluşumuna yol açmaktadır.⁸⁶

b. Serbest Radikallerin Hücresel Komponentler Üzerine Etkisi

Organ ve sistemleri önemli ölçüde etkileyen birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan serbest oksijen radikalleri hücrede fazla miktarda olmadıkça patolojik etkileri başlamaz.⁸⁷ Yaşlanma, radyasyon, enflamasyon, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO₂), azot dioksit (NO₂[•]) ve ozon (O₃), ilaçlar ve kimyasal maddeler gibi çeşitli uyarıcı etkileri ile reaktif oksijen ürünlerinin arttığı bilinmektedir. Hücre zarındaki protein, lipitler, karbonhidrat ayrıca DNA, plazma lipoproteinleri gibi önemli bileşikleri ile tepkimeye girip hücrede fonksiyon bozukluğu yaparlar.⁸¹

• Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin doğrudan hedefi olan proteinlerin içerdikleri amino asitlerin disülfid bağı miktarı onların serbest radikal harabiyetinden ne kadar etkileneceğini belirler. Yüksek miktarlarda disülfid bağına sahip ekstraselüler proteinler serbest radikallerle yüksek derecede reaktifliğe sahip olduklarından (IgG, Albumin gibi) peroksil ve hidroksil radikal saldırılarına karşı oldukça hassastırlar. Bunun yanı sıra doğadaki oksitlenmiş proteinlerin çoğu, işlevsel olarak inaktiftir ve bunlar hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Uzaklaştırılmayan ve zamanla aşamalı olarak biriken oksitlenmiş proteinler bazı hastalıklara ve yaşlılık ile ilişkili hasarlara da sebep olur.⁸⁸

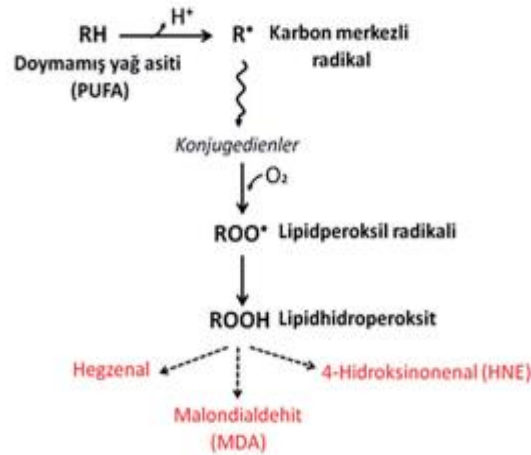
• Lipidler Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki glikoliplerin, fosfolipidlerin, poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikallerince alkol, peroksit, aldehid, etan, hidroksi yağ asitleri, pentan gibi zararlı ürünlere dönüşmesidir.⁸⁹

Lipid peroksidasyonunun sonlanması, lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) aldehid

ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile olmaktadır. Linolenik asit, araşidonik asit gibi üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu meydana gelen malondialdehid (MDA) membranlarda polimerizasyona ve çapraz bağlanmalara sebep olarak enzim aktivitesinde bozukluklar, esneklik kaybı, iyon transportu ve hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi patolojik durumlara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonu membran akışkanlığını ve permeabilitesini düşürerek zar bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Bu durum hidrolitik enzimlerin salınması ve hücre içi sindirimle sonuçlanır.^{81,90}

Doku ve kandaki MDA düzeyleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak en çok kullanılan parametreler arasında yer almakta olup oldukça mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir. Bu nedenle de hücre için çok toksik bir bileşiktir.⁹¹



Şekil 2.4. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri⁹²

- **Karbonhidratlar Üzerine Etkileri**

Otooksidasyon sonucu monosakkaridler H₂O₂, okzoaldehid ve peroksitleri meydana getirir. Bu ürünlerin kanser, diyabet gibi kronik hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlerle kolayca etkileşip, aralarında çapraz bağlar oluşturabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde de antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynadıkları

bilinmektedir.⁹³ Poliansatüre yağ asitleri (PUFA) ve karbonhidratların oksidasyonu ile glyoksalin oluşur ve çalışmalarda bu ürünün hücre bölünmesini inhibe ettiği gösterilmiştir.⁸¹

- **Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri**

Mitokondrial ve nükleer DNA, serbest radikallerin önemli hedeflerindedir. Fakat çalışmalar nükleer DNA' nın mitokondriyal DNA'ya göre çok daha fazla seri onarım reaksiyonuna tabi tutulduğunu göstermiştir. Serbest radikallere maruz kalan mitokondrinin işlevini yitirmesi ile hücre enerji kaynaklarını kaybeder. Bu durum yaşlanma ve ölüm ile sonuçlanır.⁸⁹ Nükleotidlerin serbest radikallere maruz kalması ile DNA zincirindeki tek veya çift dal kırıkları hücrede mutasyon ve ölümlere sebep olabilmektedir.⁸⁸

- c. **Hücredeki Başlıca Serbest Radikal Kaynakları**

Hücrenin normal metabolizması sırasında meydana gelen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sonucu oluşan serbest radikallerin yanı sıra ilaç, sigara, güneş ışınları vs. gibi çeşitli dış kaynaklar da bu reaktif moleküllerin oluşumuna sebep olabilmektedir. Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.⁹⁴

Tablo 2.2. Hücrede Serbest Radikal Kaynakları

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
Mitokondrial elektron transport zinciri	Redoks siklusu (paraquat, doksorubisin)
Mikrozomal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları
Oksidan enzimler	Sigara
Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin dioksijenaz	Isı şoku
Galaktoz oksidaz	
Siklooksijenaz	
Lipoksijenaz	
Monoamin oksidaz	
Fagositik hücreler	
Nötrofiller	
Monosit ve makrofajlar	
Eozinofiller	
Endotelyal hücreler	
Otooksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺²)	

2.4. Antioksidan Sistemler

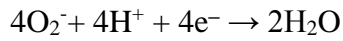
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, bunların oluşturduğu hasarları önlemek amacıyla vücutta antioksidan savunma sistemler olarak adlandırılan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Oksidatif strese karşı hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı sayesinde korunurlar. Savunma sistemlerinin başında enzim sistemi ve serbest radikal tutucular etkili olmaktadır. Serbest radikaller eğer ki nötralize edilmezler ise organizmada ciddi hasarlara neden olabilirler.⁸¹

Antioksidanlar, oksidatif hasarın yayılmasını engelleyen moleküllerdir. Organizmanın farklı hücre, organ ve hücre organellerinde bulunan ve ROT' lara karşı savunmada rol oynayan çeşitli antioksidanlar bulunmaktadır.⁹⁵ Bu savunma mekanizmaları etkilerini çeşitli şekillerde gösterebilirler. Örneğin bazıları hasarlı hedef moleküllerin yerini alıp ROT oluşumunu minimize ederken, bazıları hasarlı hedef

molekülleri onarıp metal iyonlarını bağlayabilir.⁹⁶ Antioksidanlar farklı şekillerde gruplandırılabilirler. Bunlar yerleşimlerine göre intrasellüler, ekstrasellüler; yapılarına göre enzim olanlar, enzim olmayanlar; kaynaklarına göre endojen ve ekzojen olanlar; çözünürlüklerine göre suda çözünen ve yağda çözünen şeklindedir.

2.4.1. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Sistemi

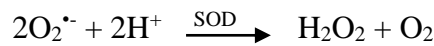
Sitokrom oksidaz solunum zincirinin son enzimidir. Aşağıda verilen reaksiyonla da süperoksidin detoksifikasyonu sağlanır.



Verilen reaksiyon devamlı olarak işlemektedir ve böylece besin maddelerinin oksidasyonu tamamlanmış olmaktadır. Sonuç olarak yüksek miktarda enerji üretimi sağlanmaktadır. Fakat süperoksitlerin inaktive edilmesinde bu enzim yetersiz kalmaktadır. Bu durumda da devreye diğer antioksidan sistemler girmektedir.

2.4.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Süperoksid Dismutaz (SOD) enzimi serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma sistemi olup süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüğü reaksiyonu katalizler. Bir metalloprotein olan SOD, süperoksit radikallerinden H_2O_2 üretimini sağlar. Bu sayede reaktif oksijen moleküllerinden daha çok zararlı ve toksik etkili olan $\bullet\text{OH}$ radikalinin ortamda birikmesini engeller.⁹⁷ SOD enzimi 1939 senesinde izole edilmiş ve antioksidan aktivitesi 1969' da Fridovich ve McCord tarafından belirlenmiştir⁹⁸.



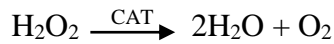
İlk olarak reaksiyonda süperoksid anyonu enzimde bulunan arjininin guanido grubuna bağlanarak bir elektronunu Cu^{+2} a verir. Bu durumda Cu^{+2} , Cu^{+1} e, kendisinde moleküler oksijene dönüşür. Diğer süperoksid anyonu da ortamda bulunan protanları ve bakıra verilen elektronu alır. Böylece H_2O_2 oluşmuş ve dismutasyon tepkimeside

tamamlanmış olur.⁹⁹

SOD' nin, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre dört ayrı formu bulunmaktadır. Bunlar Cu/Zn içeren dinükleer veya Mn, Fe ve Ni içeren mononükleer süperoksit dismutaz enzim formlarıdır.¹⁰⁰ Cu/Zn SOD çoğunlukla ökaryotik hücrelerin sitozolünde, mitokondrilerinin zarlar arası bölgelerinde, nükleer membranlarında ve bazı prokaryotlarda bulunur.⁹⁹ Mangan içeren Mn-SOD' un prokaryotlardaki formunda her bir alt biriminde bir mangan atomu içeren birbirinin aynı iki alt birim bulunur. Ökaryotlardaki mitokondri dismutazı ise tetramer yapısındadır.¹⁰⁰ Birtakım aerob ve anaerob bakteriler, bazı bitkiler Fe-SOD içerirken, Ni-SOD ise çoğunlukla Streptomyces gibi bakterilerde tespit edilmiştir.¹⁰¹

2.4.3. Katalaz (CAT)

Hücre içinde peroksizomlarda bulunan ve peroksizomların birincil karakteristik enzimi olan katalaz (CAT) hidrojen peroksiti, H₂O ve moleküler oksijene çevirir. CAT, dört adet Hem grubu ihtiva eden hemoproteindir. Ayrıca CAT her bir alt birimine sıkıca bağlanmış bir molekül NADPH bulundurur. Katalaz karaciğer, eritrositlerde ve böbreklerde yüksek aktivite gösterir.⁹⁸

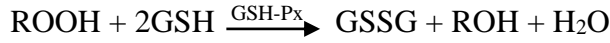
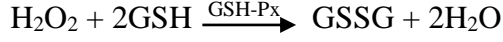


CAT' ın Km' sı oldukça yüksektir ve substratı olan H₂O₂' nin düşük konsantrasyonlarında aktiviteside bu durumda düşük olur. H₂O₂ konsantrasyonu arttıkça lineer olarak katalazın aktivitesi de artar. Bu durum oksidatif strese karşı korunmada olağanüstü bir olanak sağlar.⁹⁸ CAT' ın aktivitesinde meydana gelen aksamalar ile ortamda H₂O₂ artar ve daha reaktif olan hidroksil radikalinin oluşmasına sebep olur.¹⁰²

2.4.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit, lipid peroksit ve hidroperoksitleri indirgeyen, selenyum içeren hidroperoksidazdır.¹⁰³ Hücrenin sitoplazmasında yer alır.

Eritrositlerde ve diğer dokularda redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasında rol alarak membran lipitlerini ve hemoglobini peroksitler aracılığıyla oluşabilecek oksidasyona karşı korur. GSH-Px' ın iki substratı olan peroksitler alkolle indirgenirken diğer substrat olan glutayon (GSH) yükseltgenir ve sonuçta yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ortaya çıkar.⁸¹



2.4.5. Ksantin Oksidaz

Ksantin oksidaz (XO), süperoksit anyon radikallerinin birincil enzimatik kaynaklarından. XO bütün çekirdekli hücrelerde yer alan metaloflavoprotein ailesindedir. XO pürin nükleotid metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olarak ksantin ve hipoksantin, ürik aside dönüşmesini katalizler ve O₂ üreten enzimin aktivitesi ksantin dehidrojenazın XO' ya proteolitik dönüşümü ile oldukça yüksek miktarlarda O₂ üretebilir.¹⁰⁴

Pek çok enzim gibi ksantin oksidaz da katalitik döngüsü sırasında serbest radikal oluşturur. Hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak varlığını sürdüren XO pürinlerin yıkım yolağında hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşturma basamaklarında elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden çok NAD⁺ kullanır. İskemik durum olarak adlandırılan oksijensizliğe bağlı olarak ADP' nin ATP' ye fosforilasyonunun düştüğü durumlarda, ADP yıkılır. Pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. XO' ın bir oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken O₂ kullanılmakta, moleküler oksijen H₂O₂' e indirgenmektedir.¹⁰⁵

İskemik şartlarda O₂ seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Fakat reperfüzyon sırasında O₂ seviyesi normale döndüğünde iskemi yerinde ksantin oksidaz

etkisiyle fazla miktarda H₂O₂ ve süperoksit radikali oluşur. Bu durumun sonucunda da iskemi- reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar.¹⁰⁵

2.5. Apoptozis: Programlı Hücre Ölümü

Çok hücreli canlıların hücre bölünmesiyle artan hücre sayıları hücre ölümlü ile dengelenir. Organizma artık gereksinim duymadığı hücreleri hücre içi haberci sistemleri ile o hücrenin intihar sürecini başlatılır. Böylece yunanca yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ya da programlı hücre ölümü gerçekleşir.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸



Şekil 2.5. Programlı hücre ölüm aşamaları¹⁰⁹

Apoptoz organizma için fizyolojik bir olaydır ve gelişim, dokuda hücre popülasyonunun korunması, yaşlanma gibi homeostatik dengenin korunmasına katkı sağlar. Ayrıca hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler dejenere olduğunda ya da immun reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak apoptoz ortaya çıkar.^{110,111} Hücrelerde apoptoz sinyali alındıktan sonra fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Bu durumda hücreler küçülüp ve kondanase olur, hücre iskeletleri dağılarak çekirdek zarında erimeler görülür ve DNA parçalara ayrılır.¹¹²

Sistein proteaz grubu enzimleri olan kaspazlar, programlı hücre ölümü sırasında

kritik rol oynayan multigen ailesinden oluşmaktadır. Kaspazlar hücre sitoplazmasında bulunurlar. Başlatıcı ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere apoptoz ile ilgili iki ayrı enzim grubundan oluşmaktadırlar. İnsan endotel ve kan hücrelerindeki veziküller 'kaspaz-3' ihtiva etmektedir. Kaspaz-3' ü barındıran bu veziküllerin salınım ve inhibisyonu, apoptozun indüksiyonunu önleyebilmektedir. Bunun yanı sıra DNA polimerazı inaktive ederek hücreyi apoptoza göndermektedir.¹¹³

2.5.1. Apoptotik Marker Kaspaz-3

Açılımı "Cysteine Aspartate Specific Proteases-CASPASE" olan kaspazlar, sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar apoptotik hücre ölümünde rol oynayan multigen ailesindedir.

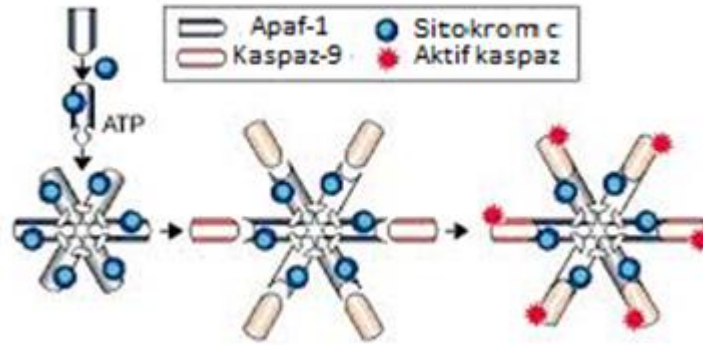
CPP32- Yama- apopain olarak bilinen kaspaz-3, 17 kDa ve 12 kDa altbirimlerine bölünen 32 kDa zimogeninden oluşur.^{114,115} Kaspaz-3, insanda kan ve endotel hücrelerinde bulunan veziküller içerisinde yer alır. Kaspaz-3 içeren bu veziküllerin salınımı ve inhibisyonu apoptozun indüksiyonunu önleyebilmektedir ve bunun yanı sıra DNA polimeraz aktivitesini baskılayıp hücreyi apoptozise yönlendirmektedir.¹¹³

Apoptotik hücrede, hem ekstrinsik hem de intrinsik yollarla aktive edilen kaspaz-3 zimojen özelliğindedir. Bunun nedeni; kaspaz aktivitesinin hücreleri herhangi bir ayırım gözetmeksizin öldürmesidir.^{116,117}

Kaspaz-3, öldürücü kaspazdır ve zimojen apoptotik sinyal olayları olduktan sonra bir öncü kaspaz tarafından bölünene kadar inaktiftir.¹¹⁸ Bu tarz bir sinyal, olayı başlatan kaspazları aktive eden granzyme B' nin öldürücü T hücreleri tarafından apoptoz için hedeflenen hücreler içinde bulunur.^{119,120}

Bu ekstrinsik aktivasyon, daha sonrasında kaspaz-3' ün etkin bir rol oynadığı apoptotik olayların önemli kaspaz kaskadlarını tetikler.¹²¹ İntrinsik aktivasyonda ise, mitokondriyumdaki sitokrom c, prokaspaz-3' ü işlemek için kaspaz-9, apoptoz aktivasyon

faktörü 1 (Apaf-1) ve ATP ile koordineli bir şekilde iş görür. ^{119,122,123}



Şekil 2.6. Kaspaz aktivasyon mekanizması¹²⁴

İn vitro şartlarda bu moleküller kaspaz-3 ü aktive edebilmek için yeterlidir. Diğer düzenleyici proteinler ise in vivo olarak gereklidir. ¹²²

2.6. Nükleer Faktör Kappa B (NF- K β)

Nükleer faktör kappa B (NF- K β), çok sayıda gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. NF- K β özellikle hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptozis ve inflamasyon gibi olaylardan sorumludur. ¹²⁵ İlk defa 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından B lenfositlerin çekirdeklerinde bulunan ve immunglobulin kappa hafif zincir genine bağlanıp ekspresyon düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. ¹²⁶ İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda NF- K β ' nın pek çok organizma ve hücre tipinde bulunan, çok sayıda genin ekspresyonu için önemi olan düzenleyici bir protein olduğu vurgulanmıştır. ¹²⁷ NF- K β ' nın memeli hücrelerinde, NF- K β 1, NF- K β 2, Rel A, Rel B ve c-Rel olmak üzere 5 alt ünitesi bulunmaktadır. ¹²⁸

Hücrelerin sitoplazmasında inaktif bir halde bulunan NF- K β sadece aktive edildiğinde nükleusa geçer. ¹²⁹ DNA ya bağlanır. Burada 150 den daha fazla genin ekspresyonunu düzenler. ¹³⁰ 2005 yılında yapılan bir çalışmada NF- k β ' nın apoptoz, inflamasyon, kanser, gelişimsel işlemler ve bazı gen ekspresyonlarını içeren çok sayıda fizyolojik işlemler ile ilişkisi bulunmuştur. ¹³¹ Serbest radikaller, sitokinler, mikrobial

ajanlar ve iyonize radyasyon vb. faktörler NF- K β ' nın uyarılmasına sebep olur.¹³² Yine yapılan çalışmalar NF- K β ' nın normal olmayan aktivasyonunun, kanser, akciğer fibrozisi, astım, septik şok, AIDS gibi inflamasyon ile ilgili hastalıklar ve patolojik durumlarla ilişkili olduğunu göstermektedir.¹³³ NF- K β ' nın sürekli inaktive durumlarında ise apoptoz ve gecikmeli hücre büyümesi görülmektedir.¹³⁴

2.7. Otofaji

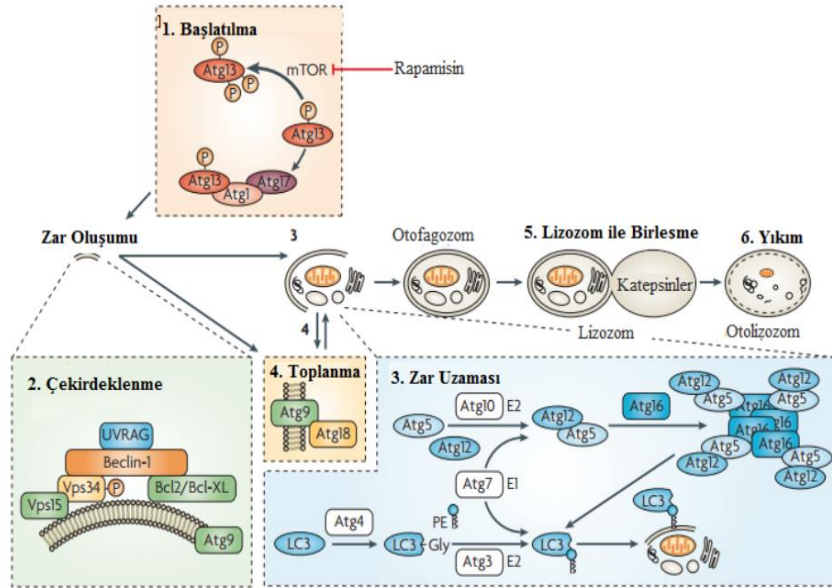
Yunancada 'kendini (auto) yeme (phagy)' anlamına gelen 'otofaji' ilk olarak 1963' de Christian de Duve tarafından sıçanların karaciğer epitel hücrelerinde keşfedilmiştir.¹³⁵ Otofaji, hasarlı hücre proteinlerini ve organelleri ortadan kaldıran bir süreçtir.¹³⁶ Otofajide, fizyolojik şartlar altında organellerin ve hücre içi moleküllerin döngüsüyle homeostazi korunmaktadır. Ayrıca artan hücre stresi anında hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır.^{137,138} Hücre içeriğinin parçalanıp, geri dönüştürülmesinin başlıca yolu olan otofaji uyarıldığında bozunuma uğrayan sitoplazma ve organeller vezikül içerisine alınıp memelilerde lizozoma, mayalarda ise vakuole gönderilir.¹³⁹

Son yıllarda yapılan çalışmalarda otofajinin morfogenez, farklılaşma, metabolizma, yaşlanma, bağışıklık sistemi ve hücre ölümünde de rol oynadığı göstermiştir.^{140,141}

Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılıklı otofaji olmak üzere 3 değişik otofaji mekanizması olmasına rağmen otofaji dendiğinde kastedilen makrootofajidir. İlk olarak otofaji ile bağlantılı proteinler (autophagy related proteins) kısaca ATG ler mayalarda yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Günümüzde 30' dan fazla ATG geni bulunmaktadır. Bu proteinlerin bir kısmının otofajik kesecikler yani izolasyon membranında ve otofagozom oluşumunda rol almaktadır. Memeli hücrelerinde mayalarda bulunan ATG proteinlerinin analogları bulunmaktadır. Bu analog proteinler memelilerde otofaji basamaklarının düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlamaktadır.¹⁴²

Otofaji mekanizması özetle 5 basamakta toplanabilir;

1. Başlatılma Evresi, ATG/ULK (unc5- benzeri kinaz) bileşeni sorumludur.
2. Çekirdeklenme Evresi, Beklin-1/sınıf III PI3K (fosfotidilinositol-3 kinaz) bileşenleri,
3. Zar Uzama Evresi, ATG12 ve ATG8/LC3 iki ubiquitin benzeri birleşmiş sistemler,
4. Toplanma Basamağı Evresi, Transmembran ATG9 ve fagofor oluşumu için diğer ATG proteinler,
5. Lizozom ile birleşme ve Yıkım Evresi, otofagozom ve lizozomun birleşmesi, LAMP2 ve RAB7 proteinler görevlidir. Sonuçta lizozomal hidroliz olur ve yıkım gerçekleşir.¹⁴³



Şekil 2.7. Otofaji mekanizma aşamaları¹⁴⁴

Fosfotidilinositol 3-fosfat, otofaji mekanizmasındaki keseciğin meydana gelmesinde yer alan protein gruplarını otofaji oluşum merkezine yönlendirir. Sonuçta artık çekirdeği oluşan otofagozomda membran uzaması ve kesecik oluşumu gerçekleşir.

Bu işlem iki ubiquitinleme merkezi sistem tarafından kontrol edilir. İlk olarak ATG12

proteini ATG5 proteinine bağlanması gerçekleştirilir. Birleşen ATG12-ATG5, ATG16 ile birleşerek izolasyon membranının dış kısmına bağlanır. Diğer übikitin benzeri sistemde ATG8 proteini fosfotidiletalamin (FE)' e kovalent olarak bağlanır ki buradaki ATG8 proteini memelilerde kısaca LC3 olarak bilinen MAP-LC3 (mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3-II) proteinidir. FE' e LC3' ün bağlanması için ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi gerekli olup LC3' ün FE' e bağlanması otofaji sırasında zarın taşınması ayrıca zarın uzaması için gerekli bir olaydır. Atg4 proteini ise artık işlevi biten LC3 proteinlerini FE' den ayırarak tekrar kullanılmasını sağlar.¹⁴⁵

2.8. Çörek Otu ve Timokinon

Özellikle Akdeniz ülkeleri olmak üzere pek çok ülkede ve Türkiye'de oldukça yaygın olarak yetişen ve timokinon, alkaloidler, antosiyaninler şeklinde kimyasallar içeren çörek otu ya da siyah tohum olarak bilinen *Nigella sativa*, L. Ranunculaceae (düğün çiçeğigiller) familyasına aittir.¹⁴⁶



Şekil 2.8. *Nigella sativa*¹⁴⁷

Hasat mevsimine, yetiştirildiği iklime ve çeşidine göre bitkinin kimyasal bileşimi değişkenlik gösterir.

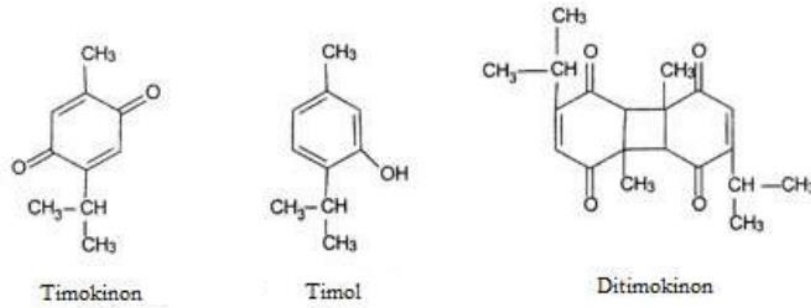
Çörek otunun tohumları, % 33,9 karbonhidrat, % 32-40 sabit yağ, % 16-19,9 protein, % 5,5 lif , % 1.79-3.44 mineral (Fe, Ca, Na, Cu, Zn, P, K), askorbik asit(C), tiamin (B1), niasin (PP), pridoksin (B6), folik asit (B9) % 0.4-2,5 uçucu yağ (nigellon,

trans anetol, p-cymene, d-limonen, α , β -pinen ve karvakrol) lizin lösün, arjinin, glutamik asit, treonin, trosin, metionin ve prolin gibi aminoasitler, tanenler alkaloidler, saponinler, ve su (%6) içermektedir.^{148,149}

Bunun yanı sıra % 0.4-2,5 uçucu yağda bulunan farmakolojik aktif bileşenler timokinon, timohidrokinon, ditimokinon, ve timol'dür.^{150,151}

2.8.1. Timokinonun Kimyasal Yapısı

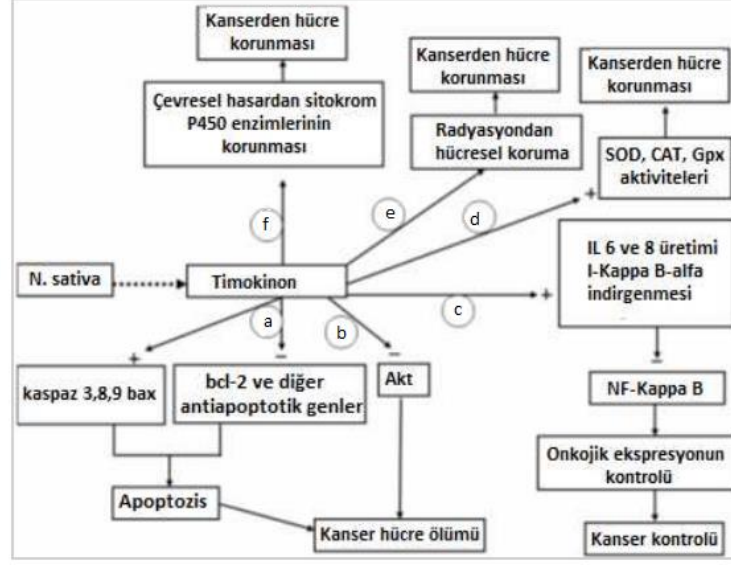
Kimyasal formülü 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon ($C_{10}H_{12}O_2$) olan TQ' nun molekül ağırlığı 164,201 g/mol' dür. Uçucu bir monoterpen kinon olan TQ koyu sarı renkli kristallere sahiptir. Çörek otu ile ilgili yapılan çalışmalar çörek otu yağının aktif bileşeni olan TQ' na ilaveten, ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timolünde varlığını göstermektedir.¹⁵² Bitkide tanımlanan bu bileşikler arasından TQ, toplam bileşimde %30–48 oranıyla en bol bulunandır ki bu oran TQ' i Nigella Sativa' da farmakolojik olarak en potansiyel aktif bileşik yapar.¹⁵³



Şekil 2.9. TQ ve türevleri¹⁵⁴

2.8.2. Timokinonun Metabolizması ve Görevleri

Birçok bitki ve çiçekteki esans yağların bileşimine bakıldığında terpen veya terpenoidler çıkmaktadır. TQ nun yapısına bakıldığında bir monoterpen olduğu görülmektedir. Demirci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada monoterpenlerin hücre düzeyinde enerji metabolizması üzerine etki ettikleri gösterilmiştir.¹⁵⁵



Şekil 2.10. Timokinonun etki mekanizması¹⁵⁶

Şekil 2.10' dan yola çıkarak timokinon:

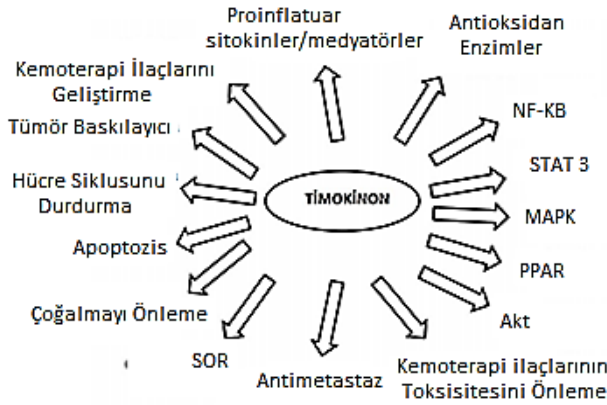
- Bax ve kaspaz gibi apoptotik gen ekspresyonunu artırır. Bunun yanı sıra bcl-2 antiapoptotik gen ekspresyonunu azaltır ve sonuçta kanserli dokularda apoptotik hücre ölümünü uyarır.
- Defosforilasyon ile Akt (serin treonin protein kinaz B) aktivasyonunu baskılayıp, kanserli hücrelerin hayatta kalmasını bloklar.
- Sitokinleri uyarır ve NF- K β yolağını deaktif eder. Böylelikle onkojenik ekspresyonu kontrol etmiş olur.
- Antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak hücreleri kansere karşı korur.
- Kanser tedavisi sırasında alınan iyonize radyasyonun sebep olduğu harabiyete karşı normal hücreleri korur.
- Çevresel hasarlara karşı sitokrom p450 enzimini korur.¹⁵⁶

2.8.3. Timokinonun Klinik Kullanımı

Eski zamanlardan bu yana çörek otu bitkisi orta ve uzak doğuda halk arasında, burun tıkanıklığında, astımda, hipertansiyonda, bağırsak kurtlarının tedavisinde, baş

ağrısında kullanılmıştır. Ayrıca bu bitki kadınlar tarafından süt artırıcı olarakta kullanılmıştır.^{157,158}

Kardiyovasküler hastalıklar, kanser, hormonal bozukluklar, diyabet ve hipertansiyon gibi yaşamı olumsuz yönde etkileyen sorunların çözümünde çeşitli bitkilerden elde edilen terpenler, izoflavonlar, kumarinler, polifenoller, izotiyosiyanatlar, fitatlar, flavonoidler, likopenler, indoller, karotenoidler, fenolik asit, ellagik asit, sülfidler gibi fitokimyasallar kullanılmaktadır.¹⁵⁹ TQ ile yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle yumutalık, göğüs¹⁶⁰, prostat¹⁶¹, kemik¹⁶², kalın bağırsak¹⁶³ gibi birçok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra TQ'nun antioksidan¹⁶⁴, antihistaminik^{165,154}, antiinflamatuvar¹⁶⁶, gastroprotektif^{167,168}, antidiyabetik^{169,170}, hepatoprotektif^{171,172} ve immün sistemi güçlendirici^{173,158} etkileri yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır.



Şekil 2.11. Timokinon hedefleri¹⁷⁴

Şekil 2.11 den yola çıkarak TQ'nun etkilerini sıralayacak olursak;

1. Antioksidan ve antiinflamatuvar olarak etkileri
 - Serbest radikal süpürücüsü
 - Antioksidan enzimlere modülasyon

- Bağışıklık sistemi hastalıklarına karşı koruyucu
 - Nükleer faktör kappa B (NF- K β) ve STAT3 (signal transducer and activator of transcription) transkripsiyon faktörleri üzerine etkisi
 - Proinflamatuvar etkisi
2. Antikanser olarak etkileri
- Kanser hücrelerinin hızla çoğalmasını engelleme
 - Kanser hücreleri üzerinde hücre siklusunu durdurma ve tümörü baskılama özelliği
 - SOR üretimi; Akt (serin treonin protein kinaz B)
 - Toksikiteyi azaltma adına kemoterapik ilaçların yan etkisine karşı koruyuculuk
 - Metastazı engelleme
 - Antianjiyogenez (damar genişlemesini) sağlar
 - MAPK (mitogen activated protein kinase: mitojen aktiviteli protein kinaz) ve diğer PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptors gamma: peroksisom çoğalmasını aktive eden reseptör gama) potansiyel geçitlere etkisi
3. Toksik ilaçlar üzerine koruyucu etkisi.¹⁷⁴

2.8.3.1. Timokinonun Antioksidan Etkisi

Özellikle kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın altında yatan neden, ortaklanmamış elektronları sebebiyle kararsız bir yapıda olan serbest radikallerin biyolojik yapılarda oluşturdukları oksitleyici hasarlar olarak gösterilmektedir. Bu kararsız yapılar elektriksel olarak yüklü olup, hücrelere nüfuz ederek, proteinler, enzimler, lipidler, nükleik asitlerle reaksiyona girerler ve sonuçta hücrede harabiyet ve yıkım meydana gelir.¹⁵⁸

Woo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TQ' nun, serbest radikallerden süperoksit radikalinin yakalayıcısı gibi davrandığı göstermişler. Ayrıca, TQ' nun glutatyon-S-transferaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin de

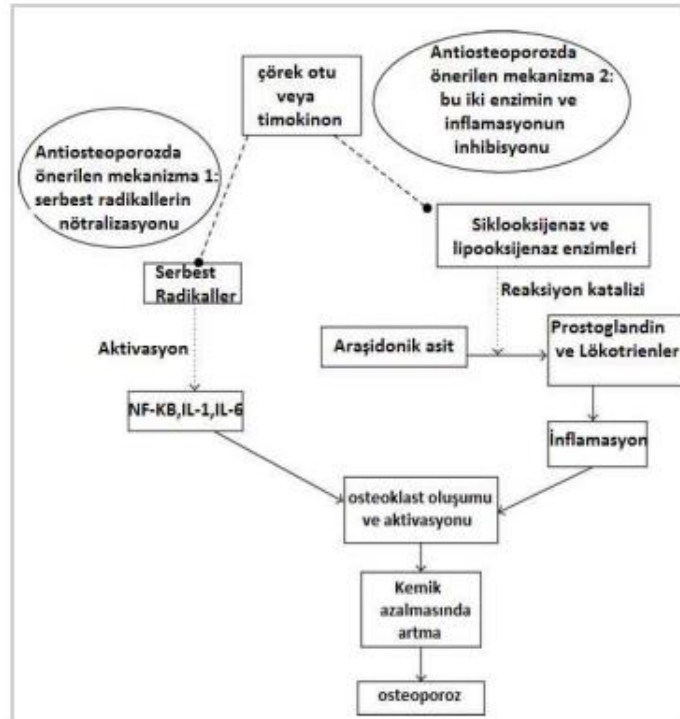
aktivitelerini koruduğunu tespit etmişler.¹⁷⁴

Rat hipokampusde yapılan bir çalışmada geçici önbeyin iskemisine karşı TQ' nun nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Çalışmada iskemik ratlara TQ verilmiş ve yüksek MDA seviyesinde azalma, normal seviyelerde bulunan GSH, SOD ve katalaz aktivitelerinde ise artma görülmüştür. TQ' nun koruyuculuğu oksidatif strese dayanıklılığı artıran metabolit içeriğinden gelmektedir. Bunun yanı sıra TQ non-enzimatik lipit peroksidasyonunu da inhibe etmektedir.¹⁷⁵

Başka bir çalışma, TQ'nun rat kası periferel iskemi reperfüzyon hasarlarında oksidatif stresi önemli derecede azalttığını göstermiştir. Kas iskemik yaralara karşı da koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır.¹⁷⁶

2.8.3.2. Timokinonun Antiinflamatuvar Etkisi

Lipooksijenaz (LO) ve siklooksijenaz (COX) inflamasyonun düzenleyici iki enzimidir. Prostaglandinler COX yolunda, alerji ve inflamasyonda görev alan lökotrienler ise lipooksijenaz yolunda sentezlenmektedir.¹⁷⁷



Şekil 2.12. TQ ve antiinflamatuvar aktivite ilişkisi¹⁵³

TQ'nun apoptozisi uyardığı, pankreatik kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bilinmektedir. NFκB'nin sitozolden çekirdeğe taşınmasını azaltan TQ, ayrıca pankreatik kanserli hücrelerde NF- Kβ 'nın TNF-α aracılı aktivasyonunun inhibisyonunu sağlar. Yine pankreatik kanserle hücrelerde TQ interlökin (IL)-1β, TNF-α, Cox-2 ve MCP-1' in sentezini azaltır.¹⁷⁸

2.8.3.3. Timokinonun İmmunolojik Etkisi

In-vitro şartlarda yapılan çalışmalar, akrep ve yılan sokmalarında TQ' nun zehirlenmeden kaynaklı hemolitik etkiyi önlediği ayrıca proteinleri denatürasyondan, eritrositleri lipid peroksidasyonundan, H₂O₂' in sebep olduğu artan ozmotik kırılmalardan koruduğu ve laringeal karsinoma hücrelerini, kortisol veya lipopolisakkaritlerce indüklenen apoptosisten koruduğu gösterilmiştir.¹⁵⁴ Birbaşka çalışmada TQ'nun immün etkiyi pozitif yönde etkilediği, oksidatif stresi azalttığı böylece insektisit toksisitesinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir.¹⁷⁹

TQ' nun, Th2 sitokinlerinin inhibisyonu ile alerjik havayolundan bulaşan inflamasyonu ve havadaki eozinofil infiltrasyonunu azalttığı ileri sürülmektedir ki bu durum TQ' nun akciğerlerdeki alerjik cevap sırasındaki potansiyel antiinflamatuvar rolünü göstermektedir.¹⁸⁰

2.8.3.4. Timokinonun Antitümöral ve Antikanserojenik Etkisi

TQ'nun antikanser etkisi çeşitli kanser türleriyle yapılan çalışmada incelenmiş ve kanser hücrelerinde apoptosisi başlattığı, hızla çoğalmayı engellediği, hücre siklusunu durdurduğu, metastazı önlediği gözlenmiştir. Bunun yanısıra p53 yolaklarında apoptozisi uyardığı bilinen TQ' nun, PTEN (phosphatase and tensin homolog: fosfataz ve tensin homolog), PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptors: peroksisom çoğalmasını aktive eden reseptör), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3: sinyal iletici ve transkripsiyon 3 aktivatörü), ROS (reactive oxygen

species: reaktif oksijen türleri), p73, p53 üretimini içeren çoklu moleküler hedefleri geçişi ile kansere karşı olumlu yönde aktivite sergilediği bulunmuştur.¹⁷⁴

Akciğer karsinomu, prostat kanseri, fibrosarkomada¹⁶¹, göğüs ve yumurtalık adenokarsinomunda¹⁶⁰, neoplastik keratinositlerde¹⁸¹, kolorektal kanserde¹⁶³ TQ' nun hücrelerin proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Etik Kurul Onayı

‘İskemi Reperfüzyonla İndüklenen Rat Over Hasarı Üzerine Timokinonun Biyokimyasal Ve Histopatolojik Etkisi’ isimli çalışma, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının, 2018–29 sayılı kararıyla, etik kurallara uygun bir çalışma olduğuna karar verilmiştir.

3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikler

Çalışmada kullanılan 12-16 haftalık, ortalama 200-250 gram ağırlığında 40 *Wistar albino* cinsi dişi sıçan, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden (ATADEM) temin edilerek kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmadaki Deney Grupları

Çalışmada 5 farklı grup oluşturulmuştur. Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır;

1.Grup (8 hayvan): Sham Operasyonu

2.Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi

3.Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + Timokinon 4 mg/kg (intraperitoneal)

4.Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + Timokinon 8 mg/kg (intraperitoneal)

5.Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + Timokinon 25 mg/kg (intraperitoneal)

3.1.4. Cerrahi İşlemler

Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından alınan 12-16 haftalık 200-250 g. ağırlığındaki *Wistar albino* dişi sıçanlar iskemi ve reperfüzyon deneyleri için bir gece önce aç bırakıldı, ancak serbestçe suya ulaşmaları sağlandı. Sıçanlara intraperitoneal olarak ketamine (75 mg/kg) ve xylazine (8 mg/kg) anestezisi uygulandı. Hayvanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba bölündü.

Grup I (Sham Kontrol): Deney hayvanlarına alt karın bölgelerinden 1-2 cm' lik insizyon yapılarak peritona ulaşıldı. Başka bir işlem uygulanmadan geri kapatıldı.

Grup II (İskemi-reperfüzyon): Deney hayvanlarına alt karın bölgelerinden 1-2 cm'lik insizyon yapılarak peritona ulaşıldı. Over dokusu 3 saat iskemiye klemp yardımıyla maruz bırakıldı ve iskemi sonunda klemp çıkarılarak reperfüzyon başlatıldı. Bu sırada insizyon hattı 3-0 ipek suture ile kapatılarak 3 saatlik reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon tamamlandıktan sonra sıçanların over dokuları alındı.

Grup III (İskemi-reperfüzyon + 4 mg/kg Timokinon): Grup II' deki cerrahi işlemler uygulandı. Reperfüzyondan 30 dakika önce 4 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup IV (İskemi-reperfüzyon + 8 mg/kg Timokinon): Grup II' deki cerrahi işlemler uygulandı. Reperfüzyondan 30 dakika önce 8 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup V (İskemi-reperfüzyon + 25 mg/kg Timokinon): Grup II' deki cerrahi işlemler uygulandı. Reperfüzyondan 30 dakika önce 25 mg/kg timokinon intraperitoneal olarak uygulandı.



Şekil 3.1. Deneysel olarak İskemi Oluşturulan Ratlar

Reperfüzyon tamamlandıktan sonra sıçanların over dokuları alındı ve sakrifiye edildi. Daha sonra sakrifiye edilen sıçanlardan alınan dokular histopatolojik işlemler için % 10 formaldehit solüsyona konuldu, biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -80 °C’ de saklandı. ELISA ve immunohistokimyasal teknikler kullanılarak biyokimyasal ve histopatolojik veriler elde edildi.

3.1.5. Kimyasallar, Cihazlar ve Ekipmanlar

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar, kitler ve alındığı firmalar Tablo 3.1’ de, gerekli olan cihaz ve aletler bilgisi ise Tablo 3.2’de gösterilmiştir.



Tablo 3.1. Kimyasal ve Kitler

Kimyasallar ve Kitler	Firma
Xanthine (C ₅ H ₄ N ₄ O ₂)	Sigma®
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma®
Nitroblue tetrazolium (NBT, C ₄₀ H ₃₀ C ₁₂ N ₁₀ O ₆)	Sigma®
Thymoquinone	Sigma®
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	Merck
Bovine serum albümin (BSA)	Sigma®
Xanthine oksidaz (XO, EC 1,1,3,22)	Sigma®
Amonyum Sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Sigma®
Thiobarbutirik asit (TBA)	Sigma®
Tetraethoxypropane (C ₁₁ H ₂₄ O ₄)	Sigma®
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
n-Butanol(C ₄ H ₉ OH)	Sigma®
Tris- HCl	Merck
Piridin (C ₅ H ₅ N)	Merck
Coomassie Brilliant Blue (CBB, C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂)	Merck
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Merck
Potasyum fosfat dibazik (K ₂ HPO ₄)	Merck
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Merck
Potasyum fosfat monobazik (KH ₂ PO ₄)	Merck
5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Sigma®
TAS (Total Antioxidant Status)	Rel Assay Diagnostics
TOS (Total Oxidant Status)	Rel Assay Diagnostics
Rat TNF- α (Tumor Factor Alpha) ELISA Kit	Elabscience (Kat. No: E-EL-R0019)
Caspase 3	Novusbio (Kat. No. NB-66036)
Anti-LC3B antibody	Abcam (Kat. No. ab48394)
Anti-NF-k β 1 antibody	Abcam (Kat. No. ab7971)

Tablo 3.2. Cihazlar ve ekipmanlar

Cihaz/Alet	Firma
Santrifüj	Beckman
Derin dondurucu (-80°C)	Sanyo
Mikroskop ve kamera sistemi	Olympus BX51-DP72
Pipetler (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Ependorf
Tissue system	Shandon Citadel 2000
Rotary Microtome	Leica RM 2255
Mikrosantrifüj	Thermo Fisher Scientific, Germany
Hassas terazi	Denver Instrument, Germany
Homojenizatör	IKA T18 digital ULTRA TURRAX
Distile su cihazı	Mes mp Minipure Su Arıtma Sistemleri,
Magnetik karıştırıcı	Yellowline MSH basic, Germany Leica
pH Metre	inoLab pH 720
Spektrofotometre mikropate okuyucu	Bio-Tek PowerWave XS, USA

3.2. Metot

3.2.1. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analiz işlemlerinin tümü, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Tampon Hazırlama

Doku homojenizasyonu için $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ tamponu kullanıldı. 50 Mm, pH: 7.2, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ tamponu için 6,6185 g. KH_2PO_4 , 1,633 g. K_2HPO_4 tartılıp saf suda çözülüp, hacim 1 litreye tamamlandı ve son olarak pH 7.2' ye ayarlandı.

0,1 mg olarak tartılan over dokuları cam tüplere koyulup 2 mL fosfat tamponu ile soğuk su veya buz içinde homojenize edildi. Homojenize dokular 5000 rpm de 20 dakika +4 derecede santrifüj edilerek üst faz dikkatli bir şekilde ependorflara ayrıldı.

3.2.1.2. Protein Ölçümü

Deney Prensipleri:

Protein konsantrasyonunu tesbit etmek için kullanılan metod, negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)' nin proteinler üzerindeki pozitif yüklere bağlanması ile oluşan mavi renkli kompleksin oluşumuna dayanmaktadır. Oluşan mavi renkli kompleksin absorpsansı 595 nm dalga boyunda ölçülmektedir.¹⁸¹

Reaktiflerin Hazırlanışı:

Commassia Brilliant Blue G-250 renk reaktifi: Kantitatif olarak proteinleri tayin etmek için kullanılan bir çözüldür. 0,100 g. Commassia Brilliant Blue G-250, 50 mL %95 lik etanolde çözülür ve çözeltiye %85 lik 100 mL orto fosforik asit ilave edilir. Son olarak hazırlanan çözeltinin hacmi distile su ile 1 L ye tamamlanır.

Standart Çözeltisi: BSA' dan 100 mg/dL konsantrasyonunda stok standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok standart çözeltisinden seri dilüsyonlar yapıldı ve değişik konsantrasyonlarında BSA çözümleri elde edildi. Bu çözümler standart olarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C' de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C' de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C' de 2800 g' de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanıldı. Tablo 3.3' de gösterilen metod ile protein tayini yapıldı.

Tablo 3.3. Protein Tayini

Reaktifler	Numune tüpü	Kör Tüpü	Standart Tüpü
Numune	0,1 mL	-	-
Standart	-	-	0,1 mL
Distile Su	-	0,1 mL	-
CBB	5 mL	5 mL	5 mL

Tablo 3.3 de belirtilen pipetlemeler yapılarak oda ısısında 10 dakika bekletilen numuneler, spektrofotometre mikropate okuyucunda 595 nm dalga boyunda okutuldu. Sonuçlar g/L olarak belirlendi.

3.2.1.3. Malondialdehit (MDA) Tayini

Deney Prensibi:

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın ölçüm prensibinde MDA ile tiyobarbütirik asitin (TBA) reaksiyonu sonucunda oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm' de absorbanısı ölçülmektedir.¹⁸²

Reaktiflerin Hazırlanışı:

1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%8,1) = 100 mL için 8,1 gr SDS alınarak bir miktar distile suda çözülür ve hacim 100 mL ye tamamlanır.
2. %20 Asetik asit = 500 mL için 100 mL %100 lük asetik asitten alınır ve üzeri 400 mL distile su ile tamamlanarak iyice karıştırılır.
3. %0,9 Thiobarbuturik asit (TBA) = 4,5 g. (TBA) ,tartılır 500 mL distile suda çözülür.
4. n-Butanol/ Piridin (15/1) V/V
5. Standart Çözeltisi: 1.1.3.3 tetraethoxypropane' den 200 µmol/L konsantrasyonunda stok standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok standart çözeltisi kullanılarak seri dilüsyon yapıldı. Elde edilen değişik konsantrasyonlardaki standart çözeltiler deneyin standardı olarak kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C’de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C’de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C’de 2800 g’de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanıldı. Ependorflar kullanılarak Tablo 3.4’ de gösterilen pipetlemeler yapılarak MDA tayin edildi.

Tablo 3.4. MDA Tayini

	Numune	Standart	Kör
SDS %8,1	200 µL	200 µL	200 µL
Asetik Asit %20	1500 µL	1500 µL	1500 µL
TBA %0,9	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Numune	100 µL	-	-
Standart	-	100 µL	-
Distile su	700 µL	700 µL	800 µL
Vortekslendikten sonra 1 saat 95 °C de inkübe edilen tüpler inkübasyondan sonra su altında iyice soğutuldu.			
Distile su	1000 µL	1000 µL	1000 µL
n-Butanol/ Piridin	5 mL	5 mL	5 mL

Tekrar vortekslenen numuneler 10 dakika 4000 rpm de santrifuj edildi. ELİSA Mikroplate de okumak için numune ve standartlardan 200 µL tüm wellere pipetlenerek 532 nm de end point okutuldu. Sonuçlar µmol/L ifade edildi. Doku MDA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak µmol/g protein olarak hesaplandı.

$$\text{Doku MDA } (\mu\text{mol/g protein}) = \text{MDA } (\mu\text{mol/L}) / \text{Doku proteini (g/L)}$$

3.2.1.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

Deney Prensibi:

Süperoksit serbest radikalini ($O_2\cdot^-$) moleküler oksijene (O_2) ve hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzim süperoksit dismutazdır (EC 1.15.1.1, EC-SOD). Ksantin oksidaz enzimi ise ksantinden ürik asit oluşumunu katalizler ve süperoksit ($O_2\cdot^-$) radikali meydana gelir. Oluşan süperoksit, SOD enziminin etkisinin yetersiz kaldığı durumlarda tetrazolyum tuzu ile reaksiyona girip mor renkli formazan boyasını oluşturur. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.¹⁸³

Reaktiflerin Hazırlanışı:

Xanthine(0,3 mM): 0,00913 g. xanthine tartılır hacim 200 mL' ye distile su ile tamamlanır. (Çözmek için 1 M NaOH dan 1 damla çözmek için kullanıldı).

EDTA (0,6 mM): 0,023 g. EDTA disodyum tuzu, 100 mL distile su çözülür.

NBT: Taze olarak hazırlanan Nitroblue tetrazoliumun 0,0123 g.' ı 100 mL distile suda çözülür.

Na_2CO_3 (0,4 M): Taze olarak hazırlanan 0,4 M' lık Na_2CO_3 için 2,544 g. Na_2CO_3 tartılarak 60 mL' ye distile su ile tamamlanır.

1 gr/L Bovine serum albümin (BSA) : 30 mL distile su içinde 0,030 g. BSA çözülür.

Hazırlanan bu beş reaktif +4 °C de saklanarak deneyden kısa bir süre önce renkli bir şişede birleştirilir. Birleştirilen reaktifler iyice karıştırılır.

Xanthine oksidaz (167 U/L): 50µL xanthine oksidaz, 600 µL 2M soğuk olmasına özen gösterilen $(NH_4)_2SO_4$ ile dilüe edilir.

$(NH_4)_2SO_4$ (2M): 2,643 g. $(NH_4)_2SO_4$ tartılır hacim 10 mL' ye distile su ile tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C’de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C’de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C’de 2800 g’de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak Tablo 3.5’ de gösterilen pipetlemeler yapıp SOD tayin edildi.

Tablo 3.5. SOD Tayini

	Numune	Kör
Numune	10 µL	-
Distile su	30 µL	40 µL
Assay reaktifi	200 µL	200 µL
Xanthine oksidaz	10 µL	10 µL

Hafifçe karıştırılan mikroplate 25 °C de 20 dakika inkübe edildikten sonra oluşan mor renkli komplekslerin absorbanları spektrofotometre mikroplate okuyucunda 560 nm dalga boyunda okutuldu. SOD konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak U/mL cinsinden bulundu. Doku SOD konsantrasyonu için sonuçlar protein sonuçlarına bölünerek U/ mg olarak hesaplandı.

1U: % 50 lik NBT inhibisyonu

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

$$\text{SOD (U/mL)} = \% \text{ inhibisyon} / (50 \times 0,01)$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \text{SOD (U/mL)} / \text{Doku proteini (g/L)}$$

3.2.1.5. Glutasyon (GSH) Tayini

Deney Prensibi:

GSH ölçüm prensibi, sülfidril gruplarının spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. GSH' nın sülfidril grupları, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tepkimeye girer. Sonuçta 1 mol -SH grubuna karşılık 1 mol 2-nitro-5-merkaptobenzoik asit meydana gelir. DTNB indirgenir ve nitrobenzoik asit ile beraber oluşan güçlü sarı rengin şiddeti spektrofotometre mikroplate okuyucunda 412 nm dalga boyunda ölçülür.¹⁸⁴

Reaktiflerin Hazırlanışı:

Homojenat Tamponu: 50 mM (pH 7.4) Tris-HCl, 1,514 g. Tris tartılır hacim 200 mL distile su ile çözülür (pH 7.4' e ayarlanarak son hacim distile su ile 250 mL.' ye tamamlanır)

Ölçüm Tamponu: 200 mM pH 8.2 ve 0,2 mM EDTA içeren Tris- HCl (6,05g. Tris ve 0,0146 g. EDTA tartılarak 200 mL. distile suda çözülür. pH 8.2' ye ayarlandıktan sonra hacim 250 mL.' ye distile su yardımıyla tamamlanır.

10 mM DTNB: 0,03963g. DTNB tartılarak 10 mL. metanolda çözülür.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C' de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C' de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C' de 2800 g' de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak Tablo 3.6' da gösterilen pipetlemeler yapıp GSH tayin edildi.

Tablo 3.6. GSH Tayini

	Kör	Numune
Süpernatant	-	50 µL
Ölçüm Tamponu	150 µL	150 µL
DTNB	10 µL	10 µL
Homojenat Tamponu	50 µL	-

Tablo 3.6’ da verilen pipetlemeler yapılarak plate 37 °C’ de 30 dakika inkübasyonun ardından 412 nm. dalga boyunda spektrofotometre mikropate okuyucu kullanılarak ölçüm elde edilir. Standart ölçümlerden elde edilen sonuçlar absorbansa karşılık grafiklenir. Numune ölçümünden elde edilen absorbanslardan grafikteki karşılıkları alınarak GSH miktarı belirlenir.

Çıkan sonuçlar GSH(nmol/mg) protein olarak ifade edilir.

3.2.1.6. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini

Deney Prensipleri:

TAS analiz yöntemi için Rel Assay marka ticari kit kullanıldı. Bu kitin analiz yönteminde kullanılan prensip örneklerdeki tüm antioksidan moleküllerinin renkli bir kompleks olan ABTS (Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit) katyonik radikalini redüklemesi ile renkli radikal antioksidan moleküllerin total konsantrasyonları ile orantılı bir şekilde dekolorize olmasına dayanmaktadır. Kalibratör olarak kullanılan molekül E vitamininin suda çözünmeyen analoglarından biri olan Trolox’ dur. Sonuçlar spektrofotometre mikropate okuyucunda 660 nm dalga boyunda ölçülerek, mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.¹⁸⁵

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C’de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C’de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen

süpernatantlar bir kez daha +4°C’de 2800 g’ de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak Tablo 3.7’ de gösterilen pipetlemeler yapıp TAS tayin edildi.

Tablo 3.7. TAS Tayini

Yapılan İşlemler	Yapılan İşlemler
Dalga boyu	660 nm.
Örnek veya Standart veya H ₂ O	18 µL
Reaktif 1	300 µL
Plate hafifçe karıştırılır ve 30 saniye sonunda 1. absorbans (A1) değeri alınır ve kaydedilir.	
Reaktif 2	45 µL
Plate hafifçe karıştırıldıktan sonra 5 dakika 37 °C de inkübe edilir ve 2. absorbans (A2) değeri alınır ve kaydedilir.	

Tablo 3.7 deki pipetlemeler yapıp A1 ve A2 değerleri kaydedildikten sonra aşağıdaki hesaplamalar yapılarak sonuçlar mmol Trolox equivalent/L olarak bulundu ve doku örnekleri için sonuç proteine bölünerek µmol Trolox Equivalent/mg protein olarak rapor edildi.

$$\text{A2(2. Absorbans)} - \text{A1(1. Absorbans)} = \Delta\text{Abs (standart, numune, H}_2\text{O)}$$
$$[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Numune}]$$
$$\text{Sonuç} = \frac{[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standart}]}$$

3.2.1.7. Total Oksidan Seviyesi (TOS) Tayini

Deneyin Prensibi:

TOS analizi için kullanılan Rel Assay marka kitin ölçüm prensibi numunelerdeki oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerinin ferrik iyona dönüşmesine dayanmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar kromojen yardımıyla renkli bir kompleks meydana getirirler. 530 nm. dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülen rengin şiddeti numunelerdeki oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir. H₂O₂ deney için

kalibratör olarak kullanılır ve sonuçlar ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/L) cinsinden ifade edilir.¹⁸⁶

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C 'de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C , ardından $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha $+4^\circ\text{C}$ 'de 2800 g' de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak Tablo 3.8' de gösterilen pipetlemeler yapıp TOS miktarı tayin edildi.

Tablo 3.8. TOS Tayini

Yapılan İşlemler	Yapılan İşlemler
Dalga boyu	530 nm.
Örnek veya Standart veya H_2O	45 μL
Reaktif 1	300 μL
Plate hafifçe karıştırılır ve 30 saniye sonunda 1. absorbans (A1) değeri alınır ve kaydedilir	
Reaktif 2	15 μL
Plate hafifçe karıştırıldıktan sonra 5 dakika 37°C de inkübe edilir ve 2. absorbans (A2) değeri alınır ve kaydedilir.	

Tablo 3.8 deki pipetlemeler yapıp A1 ve A2 değerleri kaydedildikten sonra aşağıdaki hesaplamalar yapılarak sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/L olarak bulundu. Doku örnekleri için sonuç proteine bölünerek $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/g protein olarak rapor edildi

$$A_2(2. \text{ Absorbans}) - A_1(1. \text{ Absorbans}) = \Delta\text{Abs (standart, numune)}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{\Delta\text{Abs Numune}}{\Delta\text{Abs Standart}} \times 10$$

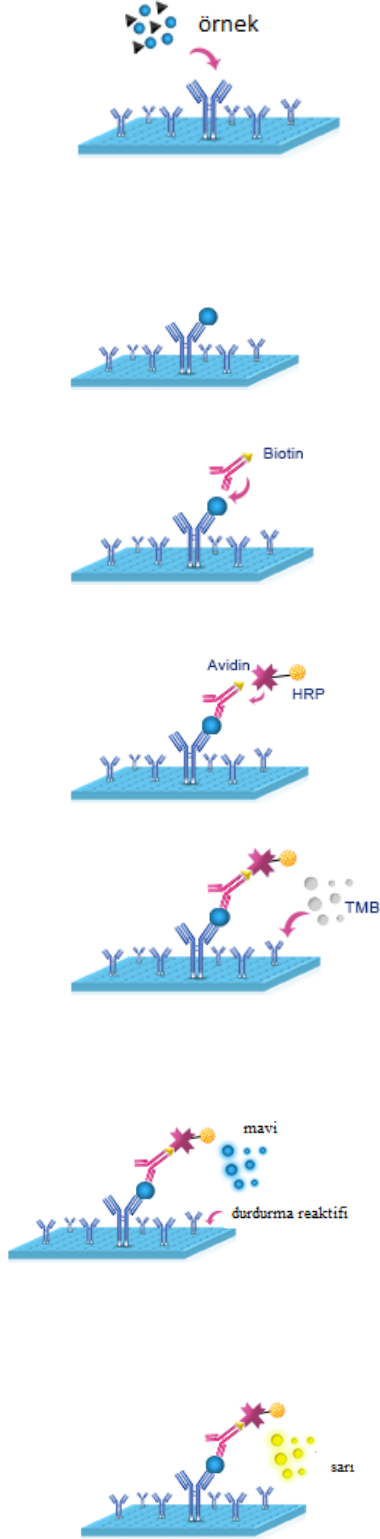
3.2.1.8. Rat IL-1 β (Interlökin 1 Beta) ELISA Tayini

Deneyin Prensibi:

Rat-1 β düzeyleri, doku örneklerinde, Rat IL-1 β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R0012) Elabscience firmasının ticari kiti kullanılarak spektrofotometre mikropate okuyucunda tayin edildi. Bu ELISA kiti, Sandwich-ELISA ilkesini kullanmaktadır. Kitin içinde yer alan mikro ELISA plate Rat IL-1'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler, mikropate oyuklarına ilave edilir ve spesifik antikor ile birleşmesi sağlanır. Daha sonra, rat IL-1 β ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü bir antikor, her bir mikropate art arda eklenir ve inkübe edilir. Mikropate yapışmayanlar yıkanır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenir. Yalnızca rat IL-1 β , biyotin ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu durdurma reaktifi ilave edilerek renk sarıya döner ve deney sonlandırılır. Sonuçlar spektrofotometre mikropate okuyucunda 450 nm dalga boyunda ölçülerek, pg/mL olarak ifade edilir.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C'de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C'de 2800 g' de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak ve üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda aşağıdaki şekilde ölçüm yapıldı.



Şekil.3.2. IL-1 β Deney Prosedürü

3.2.1.9. Rat TNF- α (Tümör Nekroz alfa) ELISA Tayini

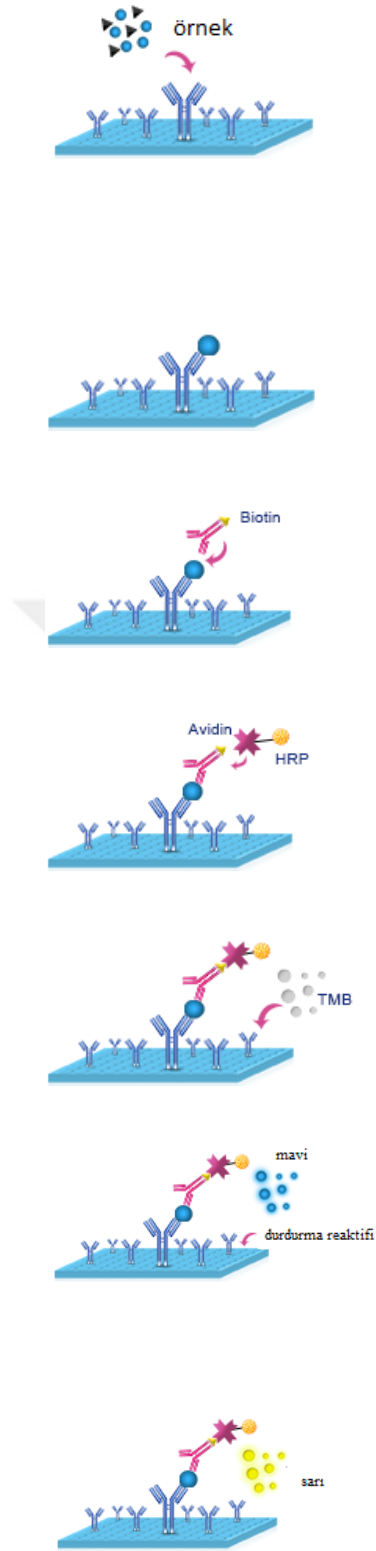
Deneyin Prensibi:

Rat TNF- α düzeyleri, doku örneklerinde, Rat TNF- α (Tümör Nekroz alfa) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R0019) Elabscience firmasının ticari kiti kullanılarak spektrofotometre mikropate okuyucunda tayin edildi.

Bu ELISA kit, Sandwich-ELISA ilkesini kullanır. Kitin içinde yer alan mikro ELISA plate Rat TNF- α ' ya özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler, mikropate oyuklarına ilave edilir ve spesifik antikor ile birleşmesi sağlanır. Daha sonra rat TNF- α ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü bir biyotinlenmiş tespit antikorunu, her bir kuyucuğa art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenir ve sadece Rat TNF- α , biyotin tespit antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renge dönüşecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma reaktifi ilave edilir renk sarıya döner ve deney sonlandırılır.

Deneyin Yapılışı:

Çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edilen doku süpernatantları ilk olarak -20°C, ardından +4°C'de bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Çözülen süpernatantlar bir kez daha +4°C'de 2800 g'de 10 dakika santrifüj edilerek berrak kısım numune olarak kullanılarak ve üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda aşağıdaki şekilde ölçüm yapıldı.



1. Her kuyuya 100 μ L standart veya numune eklenir. 37 ° C'de 90 dakika inkübe edilir



2. Yapışmayanlar mikroplyateden uzaklaştırılır.



3. 100 μ L Biotin Detection Ab eklenir. 37 °C de 1 saat inkübe edilir. 3 kez aspire edilip yıkanır.



4. 100 μ L HRP Konjugat eklenip 37 °C' de 30 dakika inkübe edilir ve ardından 5 kez yıkanır



5. 90 μ L Substrat Reaktifi eklenip, 37 °C' de 15 dakika boyunca inkübe edilir.



6. 50 μ L durdurma reaktifi eklenir.



7. 450 nm dalga boyunda okutulur.



Şekil 3.3. TNF- α Deney Prosedürü

3.2.2. İmmunohistokimyasal Analiz

İmmunohistokimyasal analiz işlemlerinin tümü, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Alınan over dokuları %10' luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Yıkama işleminden sonra rutin alkol ksilol serilerinden geçirilen dokular parafin bloklara yerleştirildi ve polilisini lamlara 5 µm lik kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra mikrodalga fırında 15 dk. 400 watt antigen retrieval solüsyonu ile (pH 6.0) muamele edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla %3' lük H₂O₂ ' da 10 dk. bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler apoptosis için Caspase 3 (Katalog No. NB-66036, sulandırma oranı 1/200, Novusbio), otofaji için LC3B (Katalog No. ab48394, sulandırma oranı 1/200, Abcam) ve yangısal aktivite için NFKB1 (cat no. ab7971, sulandırma oranı 1/200, Abcam) antikorları ile oda ısısında 15 dk. süreyle inkube edildi. PBS ile yıkanan kesitler Expose mouse and rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ile boyandı. Kromojen olarak 3,3' diaminobenzidine (DAP) kullanıldı. Hematoksilen ile yapılan zıt boyamanın ardından alkol ksilol serilerinden geçirilen kesitler ışık mikroskobu altında incelendi. İmmunpozitiflik yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizler için Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 23.0 programı kullanıldı. Çalışmamızın biyokimyasal sonuçları ortalama±standart sapma (X±SD) olarak verildi ve 0.05' in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Verilerin normallik testi Kolmogorov Smirnov ile değerlendirildi. Veriler normal dağılıma uyduğu için gruplar, parametrik test olan one-way ANOVA ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemlilik dereceleri ise Post Hoc Tests Tukey HSD testi ile belirlendi Histopatolojik veriler ise gruplar arası farklılıklar non-parametrik

testlerden Kruskal Wallis ile farklılığı oluşturan grubunda belirlenmesinde ise Mann-Whitney U testi ile kullanıldı ($p<0.05$).



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

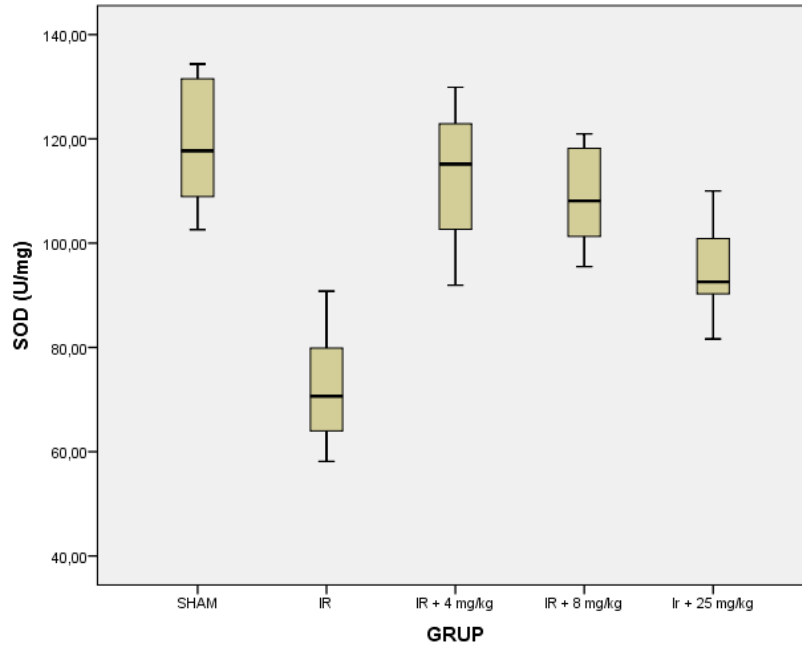
Tüm sonuçlara ait X±SD ve p değerleri Tablo 4.1 de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Over dokusundaki analit düzeyleri

	SHAM X±SD*	IR X±SD*	IR+4 mg/kg TQ X±SD*	IR+8 mg/kg TQ X±SD*	IR+25 mg/kg TQ X±SD*
SOD					
U/mg. protein	119.15±12.75	72.24±11.16	112.91±13.26	108.94±9.78	94.88±9.19
MDA					
µmol/g protein	5.17±1.07	8.99±1.14	6.24±0.99	6.22±0.97	7.70±1.31
GSH					
nmol/mg protein	11.31±1.28	6.63±1.19	9.83±1.48	8.11±1.19	8.03±1.00
TAS					
mmol Trolox					
Equiv./mg protein	11.92±1.08	7.10±1.09	10.06±0.94	9.77±1.01	8.92±1.08
TOS					
µmol H₂O₂	6.66±1.42	13.76±1.9	8.46±1.34	9.52±1.85	12.03±1.26
Equiv./mg protein					
OSİ					
TNF-α					
ng/g protein	0.56±0.14	1.97±0.41	0.84±0.13	0.97±0.16	1.35±0.13
IL1-β					
ng/g protein	1.47±0.78	3.25±0.77	1.55±0.42	2.13±0.56	2.11±0.54
	4.66±0.59	7.71±1.09	5.73±0.89	7.03±0.93	6.21±0.74

*x±SD: ortalama±standart sapma

** p<0,05 ise anlamlı



Şekil 4.1. Over Dokusu SOD Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı

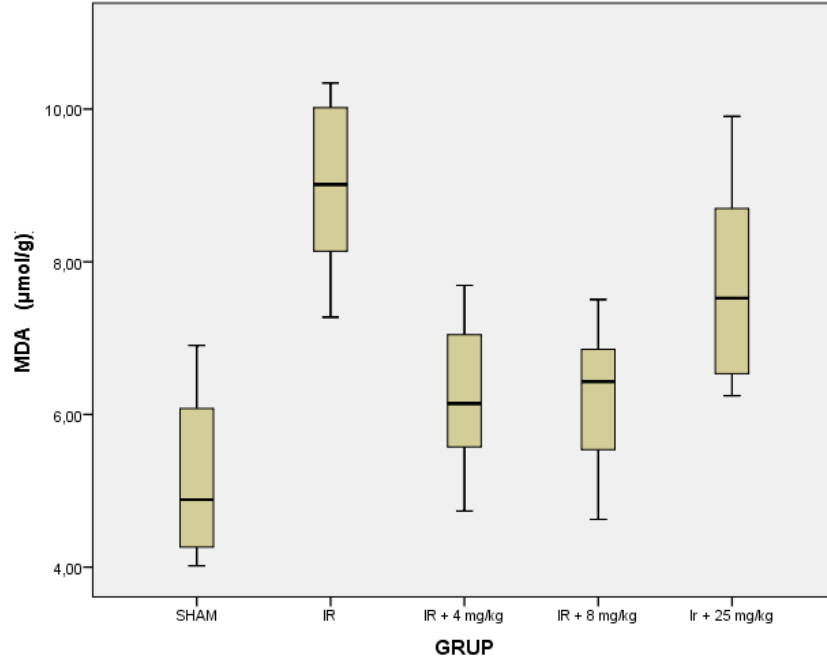
Çalışmamızda over dokusunda ölçülen oksidatif stres parametrelerinden SOD seviyelerine baktığımız zaman I/R oluşturulan gruplarda (72.24 ± 11.16) SOD seviyesinin sham (119.15 ± 12.75), IR+4 mg/kg TQ (112.91 ± 13.26), IR+8 mg/kg TQ (108.94 ± 9.78), IR+25 mg/kg TQ (94.88 ± 9.19) gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p=0.001$). Antioksidan etki gösteren TQ uygulanan gruplarda ise tedavi sonrası SOD seviyelerinin sham grubuna yaklaştığı gözlenmektedir (Tablo 4.1, şekil 4.1)

Tablo 4.2. Over dokusundaki SOD' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken		P
SOD/ IR	SHAM	0.000*
	IR+4 mg/kg TQ	0.000*
	IR+8 mg/kg TQ	0.000*
	IR+25 mg/kg TQ	0.003*

(* $p < 0.05$ ise anlamlı)

SOD düzeyleri için gruplar arası fark karşılaştırıldığında IR ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.001$)



Şekil 4.2. Over Dokusu MDA Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı

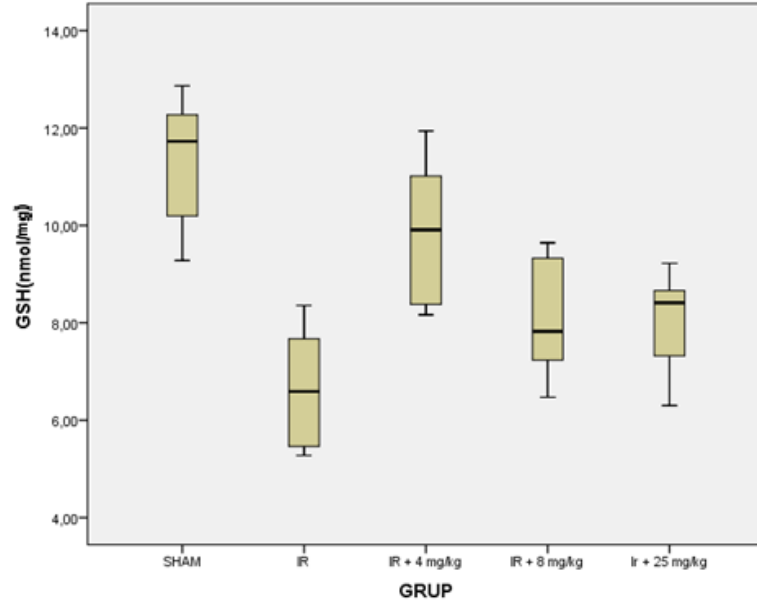
Tablo 4.1 deki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında I/R hasarı oluşturulan gruplarda (8.99 ± 1.14) MDA seviyesinin sham gruba (5.17 ± 1.07) göre anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p=0.001$). TQ tedavisi uygulanan gruplarda ise MDA seviyelerinde I/R sonrasında sham grubuna yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).

Tablo 4.3. Over dokusundaki MDA' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken		P
	SHAM	0.000*
MDA/	IR+4 mg/kg TQ	0.000*
IR	IR+8 mg/kg TQ	0.000*
	IR+25 mg/kg TQ	0.161

(* $p < 0.05$ ise anlamlı)

MDA düzeyleri için gruplar arası fark değerlendirildiği zaman I/R grubunun Sham, IR+4 mg/kg TQ ve IR+8 mg/kg TQ grupları arasında anlamlı fark bulunmasına rağmen I/R grubu ile IR+25 mg/kg TQ grupları arasında farklılık tespit edilemedi (Tablo 4.3)



Şekil 4.3. Over Dokusu GSH Aktivitesinin Gruplara Göre Dağılımı

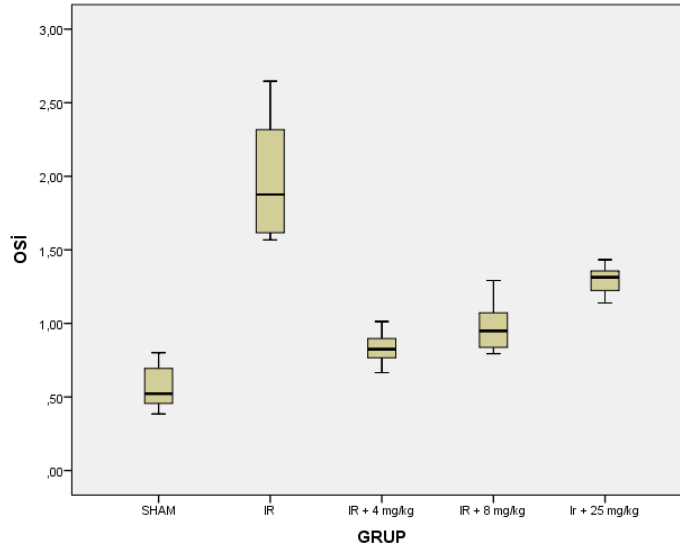
Bir antioksidan olan GSH seviyelerinin I/R grubunda, sham ve diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu şekil 4.3 te gösterilmiştir. GSH seviyesi I/R grubunda (6.63 ± 1.19), sham grubuna (11.31 ± 1.28) göre anlamlı derecede azalmıştır ($p=0.001$). TQ ile uygulanan tedavi sonrasında ise gruplarda değerlerin anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.4. Over dokusundaki GSH' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken		P
GSH / IR	SHAM	0.000*
	IR+4 mg/kg TQ	0.000*
	IR+8 mg/kg TQ	0.146
	IR+25 mg/kg TQ	0.183

(* $p < 0.05$ ise anlamlı)

GSH düzeyleri için gruplar arası fark değerlendirildiği zaman I/R grubunun sham, IR+4 ve mg/kg TQ grupları arasında anlamlı fark bulunmasına rağmen I/R grubu ile IR+8 mg/kg TQ ve IR+25 mg/kg TQ grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilemedi (Tablo 4.4)



Şekil 4.4. Over Dokusu OSİ Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Şekil 4.4 de TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzdelik derecesi olarak bilinen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) düzeyleri verilmiştir.

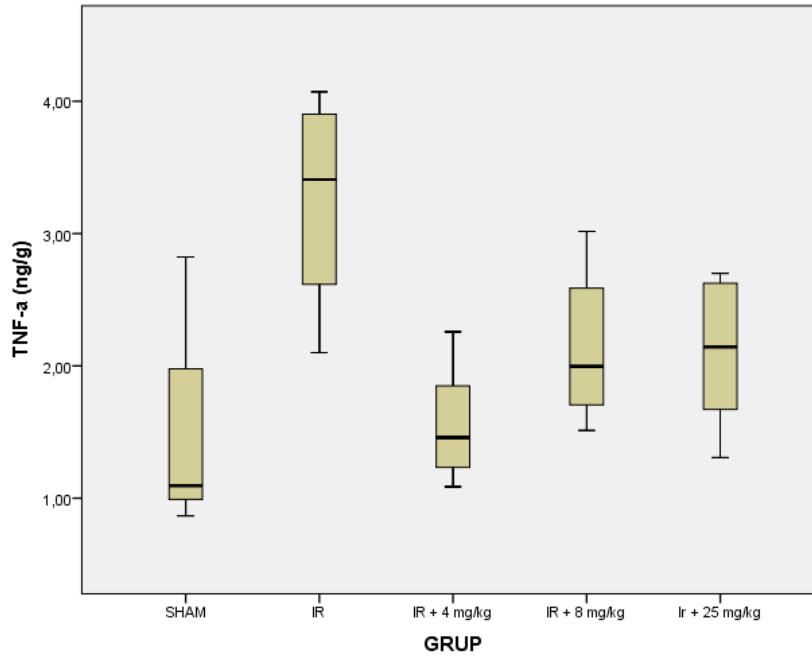
Tablo 4.1 deki OSİ seviyeleri karşılaştırıldığında I/R hasarı oluşturulan gruplarda ($1,97 \pm 0,41$) OSİ düzeyinin sham ($0,56 \pm 0,14$) grubuna göre anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p=0,001$). TQ tedavisi uygulanan gruplarda ise OSİ düzeylerinin I/R hasarı sonrasında anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p=0,001$).

Tablo 4.5. Over dokusundaki OSİ' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken	P
SHAM	0.000*
OSİ/ IR	
IR+4 mg/kg TQ	0.000*
IR+8 mg/kg TQ	0.000*
IR+25 mg/kg TQ	0.000*

(* $p < 0.05$ ise anlamlı)

OSİ düzeyleri için gruplar arası fark karşılaştırıldığında IR ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.5)



Şekil 4.5. Over Dokusu TNF- α Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

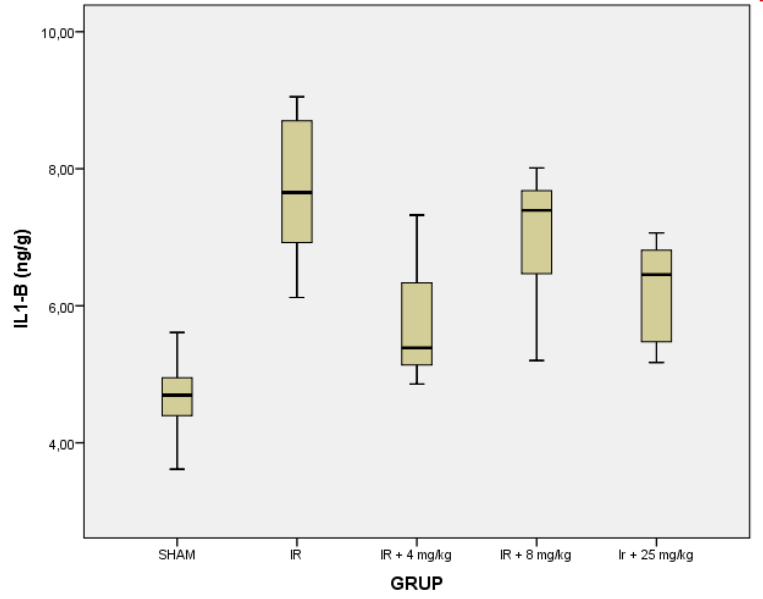
Tablo 4.1 deki TNF- α seviyeleri karşılaştırıldığında I/R hasarı oluşturulan gruplarda TNF- α seviyesinin sham gruba göre anlamlı olarak arttığı ve TQ tedavisi uygulanan gruplarda ise TNF- α seviyelerinde I/R sonrasında anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p=0.001$).

Tablo 4.6. Over dokusundaki TNF- α 'nın Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken	P	
SHAM	0.000*	
TNF- α / IR	IR+4 mg/kg TQ	0.000*
	IR+8 mg/kg TQ	0.010*
	IR+25 mg/kg TQ	0.008

(* $p<0.05$ ise anlamlı)

Tablo 4.6 daki TNF- α düzeyleri için gruplar arası fark karşılaştırıldığında IR ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Over Dokusu IL1-β Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Çalışmamızda yer alan diğer bir parametre olan IL1-β düzeylerinin I/R grubunda (7.71 ± 1.09) sham grubuna (4.66 ± 0.59) göre daha yüksek olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p=0.001$). I/R sonrası uygulanan TQ ile gruplarda IL1-β seviyelerinin anlamlı derecede düşerek sham grubuna yaklaştığı görülmektedir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.6)

Tablo 4.7. Over dokusundaki IL1-β' nin Gruplar Arası Fark ("p") Değerler Tablosu

Bağımlı Değişken		P
	SHAM	0.000*
IL1-β/ IR	IR+4 mg/kg TQ	0.001*
	IR+8 mg/kg TQ	0.534
	IR+25 mg/kg TQ	0.012*

(* $p < 0.05$ ise anlamlı)

I/R grubu ile sham ve TQ tedavisi uygulanan gruplar arası IL1-β düzeyleri karşılaştırıldığında I/ R grubu ile sham, IR+4 mg/kg TQ ve IR+25mg/kg TQ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken, I/R grubu ile IR+8 mg/kg TQ grubu arasında anlamlı fark tespit edilemedi.

4.2. Histopatolojik Bulgular

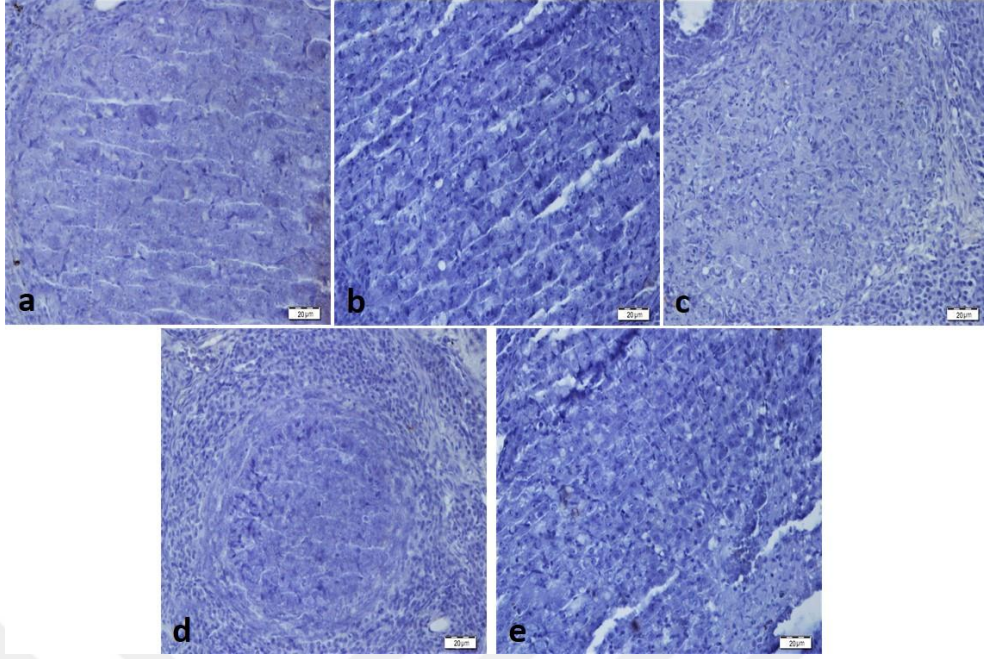
Caspase 3, LC3B ve NF- K β 1 antikorları ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda istatistiksel olarak bazı anlamlı farklar tespit edildi (Tablo 4.8., Tablo 4.9., p <0.05).

Ovaryumlarda yapılan Caspase 3 ve NF- K β 1 immunpozitifliği Sham ve deneme gruplarında tespit edilemedi (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8). Fakat LC3B immunpozitifliği açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (Tablo 4.8). Sham grubunda LC3 pozitifliği görülmezken diğer gruplarda görüldü. LC3B immunpozitifliği IR ve IR+4 mg/kg TQ grubunda en yüksek düzeydeyken, IR+8 mg/kg TQ grubunda orta düzeyde, IR+25mg/kg TQ grubunda ise hafif düzeyde olduğu belirlendi. İmmunpozitiflikler özellikle ovaryumun corpus luteum kısımlarındaydı (Şekil 4.9).

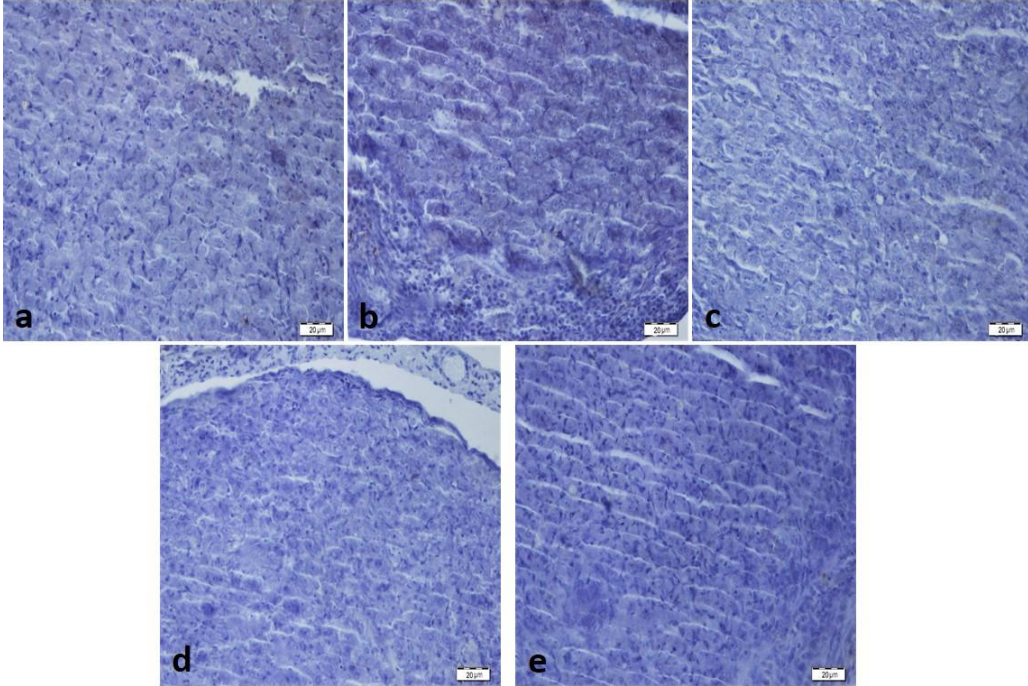
Tablo 4.8. Caspase 3, LC3B ve NF- K β 1 Antikorları İle Yapılan Boyamalar Sonucu Elde Edilen Veriler

Gruplar	Caspase 3	LC3B	NFKB1
Sham	0.25±0.46 ^a	0.12±0.35 ^a	0.25±0.46 ^a
I/R	0.25±0.46 ^a	2.75±0.46 ^b	0.37±0.51 ^a
IR+4 mg/kg TQ	0.37±0.18 ^a	2.62±0.35 ^c	0.50±0.53 ^a
IR+8 mg/kg TQ	0.12±0.12 ^a	1.50±0.53 ^d	0.12±0.35 ^a
IR+25mg/kg TQ	0.12±0.12 ^a	0.75±0.46 ^e	0.25±0.46 ^a

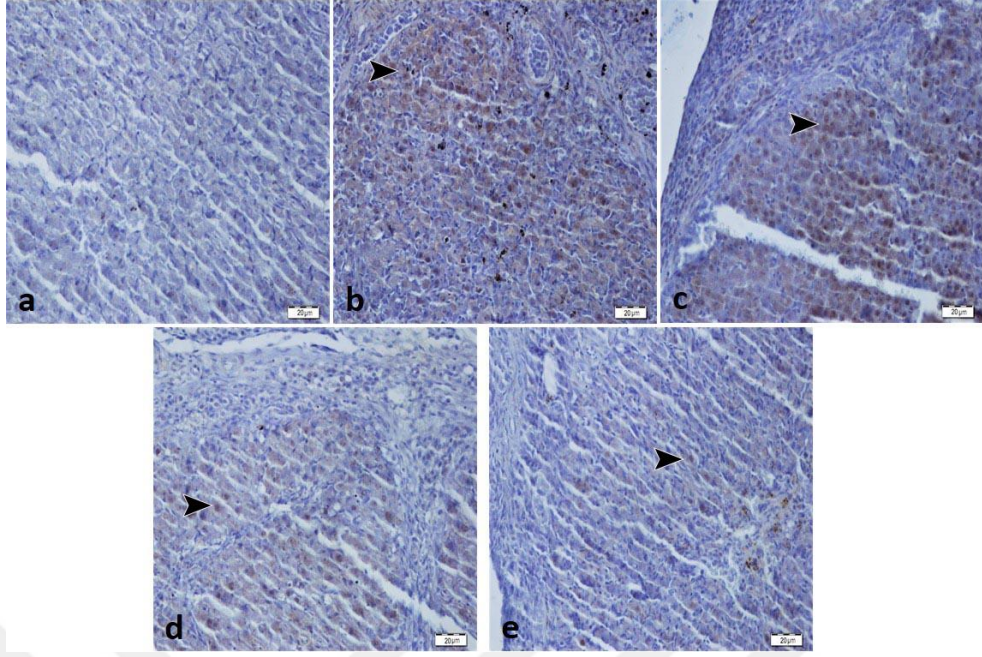
^{a,b,c,d,e} Gruplar arası farklılığı göstermektedir (p <0.05).



Şekil 4.7. Caspase 3 boyamada immunnegatiflik. (a) sham grubu, (b) I/R grubu, (c) I/R+4 mg/kg TQ grubu, (d) I/R+8 mg/kg TQ grubu, (e) I/R+25mg/kg TQ



Şekil 4.8. NFkB1 boyamada immunnegatiflik. (a) sham grubu, (b) I/R grubu, (c) I/R+4 mg/kg TQ grubu, (d) I/R+8 mg/kg TQ grubu, (e) I/R+25mg/kg TQ



Şekil 4.9. LC3B boyamada immunopozitiflik. (a) sham grubu, (b) I/R grubu ve (c) I/R+4 mg/kg yüksek düzeyde, (d) I/R+8 mg/kg TQ grubu orta düzeyde, (e) I/R+25 mg/kg TQ grubunda hafif düzeyde immunopozitiflik (okbaşı).

5. TARTIŞMA

Organ ya da dokuların kan akışını sağlayan damarlarında meydana gelen bir pıhtı veya mekanik etken sonucu tıkanması ile oksijenlenememesi ve beslenememesi iskemi olarak tanımlanmaktadır. İskemi ile birlikte hücrelerde yapısal ve metabolik olarak birtakım değişiklikler meydana gelir.³¹ Oksidatif fosforilasyondaki aksamalar sonucu ATP sentezi azalır. Enerji depolarındaki boşalmalar Na-K ATPaz pompasının inhibisyonuna sebep olur. Bu durumda intrasellüler Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonlarında artışa neden olur. Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun intrasellüler alandaki artışı sitotoksiktir ve bu artış hücre ölümüne sebep olan mekanizmaları aktive eder. Ayrıca hücredeki iyon konsantrasyonlarındaki değişim proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artışa ve antioksidan oluşumunda ise azalmaya sebep olur.¹⁸⁸ İskemik dönemde ATP üretimi azalmasına rağmen tüketim devam ettiği için ATP, AMP ve adenozine dönüşür. Adenozin ise hızlıca ekstrasellüler alana difüze olarak inozin ve hipoksantine parçalanır. Bu durumda dokuda ksantin, hipoksantin gibi pürin metabolitleri birikir ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümü gerçekleşir.¹⁸⁹ Normal şartlar altında hipoksantin ürik asite metabolize olduğu reaksiyonda elektron alıcısı olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) kullanılır. Oysaki iskemik şartlarda KDH, KO'ya dönüştüğü için hipoksantin ürik asit dönüşümü KO tarafından meydana gelir ve bu reaksiyonda elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır.¹⁹⁰ İskemiden dolayı dokuda O_2 olmadığı için intrasellüler KO birikimi meydana gelir. Bu birikim ise reperfüzyonda serbest radikal kaynağını oluşturur. Ayrıca iskemide NF- $\text{K}\beta$ aktivasyonu artar, TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin sentez ve salınımı artar, NO prosiklin gibi vazoaktif maddelerin sentezi ise baskılanır.^{74,191} Reperfüzyon, iskemiye önlemek ve kan akımını yeniden sağlamak amacı ile iskemi sonrası dokunun geliştirdiği mekanizmalarla dokudaki oksijen miktarının

artması olarak tanımlanır.^{30,32} Ancak iskemiye maruz kalmış dokuların yeniden kanlanması ve aktifleşen mekanizmalar ile iltihabi sürecin başlamasıyla iskemik durumdan daha fazla doku hasarının meydana gelmesi durumu reperfüzyon hasarına sebep olmaktadır.^{34,42}

Paradoksal olarak reperfüzyon hasarında iskemik hasara göre daha fazla doku ve organlar hasarı oluşmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu sebepten iskemi-reperfüzyon (İ/R) modeli üzerinde durulmuş ve reperfüzyon sonrası meydana gelen hasarların minimuma indirilmesi amacıyla birçok farmakolojik etkili ajan kullanılmıştır.

Reperfüzyon hasarı, paradoksal olarak doku veya organlara iskemik hasardan daha fazla zarar vermektedir. Bu nedenle iskemi-reperfüzyon (İ/R) modeli birçok çalışmada kullanılmış ve reperfüzyon hasarının azaltılması için birçok farmakolojik ajan denenmiştir.¹⁹²⁻¹⁹⁵

Overlerde reperfüzyon hasarın azaltılması için yapılan çalışmalarda hesperetin¹⁹², aprotinin¹⁹³, tacrolimus¹⁹⁴, ursodeoxycholic acid¹⁹⁵, N-asetil sistein ve resveratrol¹⁹⁶, eritropoietin¹⁹⁷, curcumin¹⁹⁸ ve sildenafilin⁵¹ gibi birçok madde kullanılmış ve bu çalışmalarda over hasarının belli oranlarda azaldığı gösterilmiştir.

Antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri ile bilinen TQ' nun over I/R hasarı üzerine etkisinin olup olmadığı ile ilgili herhangi bir çalışma tespit edilmemiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada rat overlerinde deneysel olarak I/R ile oluşan hasarın önlenmesinde TQ' nun etkinliğinin olup olmadığı araştırmayı amaçladık. Bu sebeple, over I/R sonrası, over doku örneklerinde IL-1 β ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinleri, malonildialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH), total oksidan statusü (TOS), total antioksidan statusü (TAS), süperoksit dismutaz (SOD) gibi oksidatif stres parametreleri düzeylerinin ölçümü yapıldı.

Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin I/R hasarının oluşmasında birincil sorumlu

olduğunu göstermiştir.¹⁹⁹ Dokularda oksidatif stresin göstergesi olarak lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA kullanılmaktadır.²⁰⁰ Kılıç ve ark.'nın N-Asetil Sistein ve Resveratrol'un Rat Overlerinde oluşturulan I/R hasarı üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında I/R gruplarında MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını göstermiştir.¹⁹⁶ Yuan ve ark.'ı ise hepatik I/R hasarını araştırdıkları hayvan deneyi çalışmalarda yine I/R grubunda MDA düzeylerinin yükseldiğini ve tedavi sonrasında MDA düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı göstermişlerdir.²⁰¹ 2008 yılında Beheshtian ve ark.'nın over dokusunda yaptıkları çalışmada I/R grubunda MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı ve sildenafil ile tedavi uygulanan gruplarda ise MDA seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir.²⁰⁷ Atorvastatin'in over I/R modelinde koruyuculuğunu araştırıldığı diğer bir çalışmada ise yine I/R grubunda MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığı atorvastatin uygulanan gruplarda ise MDA seviyelerinin anlamlı derecede düşerek kontrol grubuna yaklaştığı bildirilmiştir.²⁰³ Bizim çalışmamızda da doku MDA düzeyleri literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi I/R grubunda sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Son yıllarda antioksidan, antitümöral, antineoplastik, antikanserojen, antifungal, antienflamatuar gibi pek çok özelliği üzerinde durulan TQ'nun uygulandığı tedavi gruplarında MDA seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Vücudumuzdaki antioksidan savunma sistemlerinden olan SOD ve GSH'nın over I/R hasarındaki rolüne baktığımızda I/R gruplarında SOD aktivitesinin ve GSH düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı, TQ ile tedavi sonrası gruplarında ise bu değerlerin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Cadirci ve ark.'ı yaptıkları çalışmada over I/R hasarında SOD ve GSH seviyelerinin anlamlı derecede azaldığını Atorvastatin uygulanan gruplarda ise bu değerlerin anlamlı derecede arttığını göstermiştir.²⁰³ Coşar ve ark.'ı 2007

de alpha-lipoic acid ile yaptıkları çalışmada I/R grubunda SOD aktivitesini anlamlı derecede düşük bulmuşlardır.²⁰⁴ Korhanlı ve ark. iskelet kasında melatoninin, I/R hasarındaki koruyuculuğunu araştırdıkları çalışmalarında SOD aktivitesini I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğünü ve melatonin kullanılan gruplarda ise SOD aktivitesinin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir.²⁰⁵ Çalışmamız literatürde yer alan ve oksidatif stresle beraber I/R gruplarında antioksidan kullanımının arttığı görüşünü destekler niteliktedir.²⁰³⁻²⁰⁴ Ayrıca over dokusunda antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile bilinen TQ uygulanan gruplarda SOD aktivitesinin ve GSH düzeylerinin artması, oksidatif stresin azaldığını, I/R dan kaynaklı hasarın önlenebileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında lipid peroksidasyon aktivitelerini analiz etmek için TOS parametresinden yararlanılmaktadır.²⁰⁶ SOD, GSH, CAT gibi koruyucu enzimler ROS' dan kaynaklı hasarlara karşı reaksiyon gösterir ve bu koruyucu enzimler TAS'ı oluşturur.²⁰⁷ TOS ve TAS gibi oksidatif stres parametreleri I/R hasar ve tedavi modalitelerinin etkinliğini belirlemede kullanılan önemli belirteçlerdir. Yapılan çalışmalarda I/R hasarında TAS seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunurken TOS seviyeleri ise yüksek bulunmuştur.²⁰⁸⁻²¹⁰ Avni ve ark. 'nın yaptıkları çalışmada I/R oluşturulmuş rat overlerinde TOS ve OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekken, resveratrol ile N-asetil sistein ile yapılan tedavi sonrasında oksidatif stres düzeylerinde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir.¹⁹⁶ Çalışmamızda over dokusunda I/R oluşturulmuş gruplarda hasarın belirteci olarak TOS ve OSİ seviyeleri yükselirken, TAS seviyeleri düşmüştür. TQ uygulanan gruplarda TOS ve OSİ değerleri anlamlı bir şekilde düşerken, TAS seviyelerinin ise yükselerek sham grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir.

I/R hasarında TNF- α , IL1- β gibi çeşitli inflamatuvar sitokinler uyarılmaktadır. Wu

ve ark.' ı karaciğer I/R hasarı üzerine yaptıkları çalışmalarında, karaciğer dokusunda TNF- α mRNA düzeylerinin I/R da belirgin bir şekilde arttığını vurgulamışlardır.²¹¹ 2010 yılında Kim ve ark. ' nın yaptıkları benzer bir çalışmada ise karaciğer I/R hasarında serum TNF- α düzeyleri araştırılmış ve I/R grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.²¹² Liu ve ark. ise hepatik I/R sıçan modelinde plazma TNF- α ve IL1- β seviyelerini yüksek bulurken, NO tedavisinden sonra bu düzeylerin düştüğünü dolayısıyla NO' in I/R hasarını azalttığı hipotezini doğrulamışlardır.²¹³ Avni ve ark. TNF- α düzeylerinin I/R grubunda yüksek olduğunu ve ilaç verilen gruplarda anlamlı ölçüde azaldığını bildirmiştir.¹⁹⁶ Ross ve ark. ' ı I/R hasar modeli ile yaptıkları çalışmada IL- β ' nın iskemik şartlarda arttığını bildirmiş ve IL1- β hedeflemesini, sinsi kas ağrısı tipi için etkili bir tedavi stratejisi olabileceğini bildirmişlerdir.²¹⁴ Yapılan diğer bir literatür çalışmasında ise I/R hasarından sonra karaciğer dokusunda TNF- α seviyelerinin anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir.²¹⁵ Mevcut çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, over dokusunda I/R gruplarında TNF- α ve IL- β seviyelerinde anlamlı derecede artış gözlenmiştir. Ancak TNF- α ve IL- β seviyelerinin TQ uygulanan gruplarda normale yaklaştığı gözlemlendi.

Histopatolojik değerlendirmelerde oksidatif stresin önemli göstergelerinden biri olarak bilinen NF- κ B1' in immunohistokimyasal kesitlerinde immunpozitifliği sham ve deneme gruplarında tespit edilemedi. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda NF- κ B' nın iskemi sırasında aktivasyonun arttığı, immunohistokimya kesitlerinde I/R hasarında aşırı reaktivite gösterdiği görülmüştür.²¹⁶ Çalışmamızda apoptatik bir markır olarak bilinen kaspaz-3 için immunpozitiflik sham ve deneme gruplarında tespit edilemedi. Literatürde over I/R modeli ile ilgili mevcut çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak timokinon kanser üzerindeki etkisini inceleyen Jayaraman ve ark. ları 0, 20, 40 μ m konsantrasyonlarında kullandıkları TQ bileşiğini rat nöroblastomunda kaspaz-3 proteininin ekspresyonunu incelemiş ve TQ konsantrasyonu ile kaspaz-3 ekspresyon orantılı bir şekilde arttığı

bildirmişlerdir.²¹⁷ Chun ve ark. 2003 yılında kalp dokusunda yaptıkları çalışmada I/R sonucunda, kaspaz-3 aktivasyonu ile oligonükleozomal DNA parçalarının oluştuğunu göstererek hücrede apoptotik cisimciklerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir.²¹⁸ Çalışmamızda diğer bir parametre olan ve otofajinin belirteci olarak kullanılan LC3B immunpozitifliği açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Sham grubunda LC3 pozitifliği görülmezken diğer gruplarda görüldü. LC3B immunpozitifliği IR ve IR+4 mg/kg TQ grubunda en yüksek düzeydeyken, IR+8 mg/kg TQ grubunda orta düzeyde, IR+25mg/kg TQ grubunda ise yüksek düzeyde olduğu belirlendi. İmmunpozitiflikler özellikle ovariumun corpus luteum kısımlarında gözlemlendi. Literatürde fibroblast büyüme faktörü (FGF21) ile yapılan bir çalışmada miyokard I/R modelinde FGF21' in, I/R' dan sonra enfarktüsü önemli ölçüde azalttığı ve I/R ile indüklenen hücre apoptozunu iyileştirdiğini ve I/R dan sonra, LC3-B seviyelerini yükselttiğini vurgulamışlardır.²¹⁹

'Nigella sativa (NS)' yani çörek otu 2000 yılı aşkın süredir orta ve yakın doğu ülkelerinde pek çok hastalığın tedavisi için kullanılmış önemli bir bitki türü olup bu bitki ve bileşimleri ile ilgili literatürde pek çok çalışmaya yer verilmiştir. Demir ve ark.' ı deneysel olarak katarakt oluşturdukları ratlara probolis, kafeik asit (CAPE), timokinon ve çörek otu uygulayarak yaptıkları çalışmalarında timokinonun diğer bileşenlere oranla antioksidan özelliğini anlamlı olarak daha güçlü bulmuşlardır.²²⁰ Abdel ve ark. TQ' nun karaciğer hasarını önlemedeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, TQ' nun lipid peroksidasyonu önlediği ve oksidatif strese karşı oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir.²²¹ Literatürdeki bir diğer çalışmada ise testiküler I/R modelinde TQ' nun lipid peroksidasyonunu, oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak etki ettiğini bildirmişlerdir.²²²

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Rat overlerinde deneysel olarak I/R ile oluşan hasarın önlenmesinde özellikle antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri ile bilinen TQ' nun etkinliğinin olup olmadığını araştırmayı amaçladığımız bu çalışmada, elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda TQ' nun koruyucu etkisinin olduğunu destekler sonuçlar elde edildi. TQ, bu etkilerini I/R hasarında ortaya çıkan oksidatif stres parametrelerini azaltarak göstermiştir. Özellikle MDA, TOS ve OSİ düzeyleri I/R hasarında artarken TQ uygulanması ile kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir. Ayrıca SOD, GSH gibi vücuttaki önemli antioksidanlar iskemiye bağlı azalırken tedavi sonrası tekrar anlamlı derecede artış göstermiştir. IL- β ve TNF- α gibi inflamatuvar süreçte aktifleşen moleküllerin, TQ uygulanan gruplarımızda anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir. Mevcut çalışmamızda biyokimyasal parametrelere ek olarak histopatolojik değerlendirmelerde iskemiye takiben ovariumun corpus luteum kısımlarında otofajinin belirteci olan LC3B immunpozitifliğini göstererek destekledik. Bu bilgiler TQ' nun over torsiyonunda iskemiden kaynaklı hasarı azaltmada alternatif bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermekle birlikte mevcut denek sayıları artırılarak ve genetik çalışmalar eklenerek ileriki yıllarda timokinonun iskemi reperfüzyonla indüklenen rat over hasarı üzerine etkileri hakkında daha detaylı bilgiler elde edilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Meyer JS, Harmon CM, Harty MP, Markowitz RI, Hubbard AM, Bellah RD. Ovarian torsion: clinical and imaging presentation in children. *Journal of Pediatric Surgery*, 1995, 30: 1433- 1436.
2. Chen M, Chen CD, Yang YS. Torsion of the previously normal uterine adnexa. Evaluation of the correlation between the pathological changes and the clinical characteristics. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 2001, 80: 58-61.
3. Haskins T, Shull BL. Adnexal torsion: a mind-twisting diagnosis. *Southern Medical Journal*, 1986, 79: 576-577.
4. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yılmaz I, Wheeler JM. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Hum Reprod*, 1998, 13: 2823-2827
5. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clinical neuroscience*, 1997, 4: 199-212.
6. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 1999, 43: 860-878.
7. Gilham B, Papachristodoulou DK, Thomas JH. Wills. *Biochemical Basis of Medicine*, 3rd ed. London, Butterworth-Heinemann, 1997.
8. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine*, 1985, 312: 159-163.
9. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*. 1984, 222: 1-15.

10. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatric Surgery International*, 2006, 22: 99-105.
11. Turkoz Y, Celik O, Hascalik S, Cigremis Y, Hascalik M, Mizrak B, Yologlu S. Melatonin reduces torsion-detorsion injury in rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Journal of Pineal Research*, 2004, 37: 137-141.
12. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, 1993, 215: 213-219.
13. Medenica R, Mukerjee S, Muschart T, Koffskey J, Corbit W. Nigella sativa plant extract increases number and activity of immune component cell in humans. *Experimental Hematology*, 1993, 21 (3): 1186.
14. Al-Naggar TB, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of N sativa L extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 88: 63-68.
15. Al-jabre SHM, Randhawa MA, Akhtar A, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of N. sativa and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 101: 116-119
16. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone promising anticancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38: 1249-1253.
17. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B. Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica*, 2008, 74 (13): 1560-1569.
18. Gökmen G. *Sistemik Anatomi*, İzmir: Güven Yayınevi, 2003.
19. Eşrefoğlu M. *Genel ve Özel Histoloji*. 1. Baskı. Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2004.

20. Liu CF, Liu C, Yao HH. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Current topics in developmental biology*, 2010, 90: 263-290.
21. Eroschenko V. *Di Fiore Histoloji Atlası*. 5th ed. Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
22. Sürmen A. Sıçan Over İskemi- Reperfüzyon Modelinde Rosuvastatin'in Over Üzerine Tedavi Edici Etkisinin Histopatolojik Ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirilmesi. Tıp Faakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.Uzmanlık Tezi.İstanbul: Yedi Tepe Üniversitesi, 2011
23. Waugh A, Grant A., *Ross and Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness*, 9th ed. London, Churchill Livingstone 2002.
24. Junguiera LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*, 8th ed. New York, Appleton & Lange, 1995.
25. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology A Text And Atlas*, 3th ed. Philadelphia, Williams and Wilkins, 1995.
26. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal torsion: can the adnexa be saved? *American journal of obstetrics and gynecology*, 1994, 171: 1506-1510.
27. Comerci JT Jr, Licciardi F, Bergh PA, Gregori C, Breen JL. Mature cystic teratoma: a clinicopathologic evaluation of 517 cases and review of the literature. *Obstetrics and gynecology*, 1994, 84: 22-28.
28. Antoniou N, Varras M, Akrivis C, Kitsiou E, Stefanaki S, Salamalekis E. Isolated torsion of the fallopian tube: a case report and review of the literature. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 2004, 31: 235-238.
29. Breech LL, Hillard PJ. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 2005, 17: 483-489.
30. Stokes KY, Granger DN. Hypercholesterolemia, its impact on ischemia reperfusion injury. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2005; 3: 1061-1070.

31. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. Ischemia-Reperfusion Injury Pathophysiology and Clinical Implications. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 2007, 33: 600-612.
32. Kukan M. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *Journal of physiology and pharmacology*, 2004, 55(1): 3-15.
33. Aksu V. Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Sildenafil Ve N-Asetilsisteinin Femoral Arter Endoteli Ve Gastroknemius Kası Hasarı Üzerine Etkisi. Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Trakya: Trakya Üniversitesi, 2013.
34. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America*, 1992, 72: 65-83.
35. Katori M, Berne RM. Release of adenosine from anoxic hearts: Relationship to coronary flow. *Circulation Research*, 1966, 19: 420-425.
36. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection, an updated overview. *Cardiovascular research*, 2001, 52: 25-39.
37. Guido M, Isabella J. *Cells, Tissues and Disease, Principles of General Pathology*, 2nd ed. New York: Oxford University Press 2004.
38. Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. www.benbest.com/cryonics/ischemia.html. 2.09.2018
39. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997.
40. Pignataro G, Scorziello A, Di Renzo G, Annunziato L. Post-ischemic brain damage, effects of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *The FEBS Journal*, 2009, 276: 46- 57.

41. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Hücre zedelenmesi adaptasyonu ve ölümü. In: Çevikbaş U (Ed.). *Robbins temel patoloji*, 7th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2003. s.3-9.
42. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2005, 20: 336-343.
43. Çağlı K, Özeke Ö, Aras D, Çağlı K. Miyokardiyal Reperfüzyon Hasarı. *Turkish Journal of Cardiology*, 2007, 10: 131-140.
44. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2003, 75: 644-648.
45. Akkoç H. İskemik Önkoşullama Mekanizmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2007, 27: 165-176.
46. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular Research*, 2004, 61: 448-460.
47. Das M, Das D. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*, 2008, 60: 199-203.
48. Rixsen NP, Smiths P, Rongen GA. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application-part I. *The Netherlands Journal of Medicine*, 2004, 62: 353-363.
49. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage, removal, repair and replacement systems. *IUBMB Life*, 2000, 50: 279-289.
50. Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51: 1345- 1352.
51. Celik M. Sildenafil Sıçan Överlerinde Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Hasarındaki Etkisinin Biyokimyasal Ve Histopatolojik Olarak Araştırılması. Tıp

- fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.
52. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology*, 2009, 26: 537-547.
 53. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*, 2002, 34: 2518-2519.
 54. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circulation Research*, 1990, 66: 1436-1444.
 55. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *The New England Journal of Medicine*, 1989, 320: 365-376.
 56. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta physiologica Scandinavica*, 1980, 108: 159-163.
 57. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 2002, 73: 493-499.
 58. Ondiveeran HK, Fox-Robichaud A. New developments in the treatment of ischemia/reperfusion injury. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2001, 2: 783- 791
 59. Chensue SW, Remick DG, Shmyr-Forsch C, Beals TF, Kunkel SL. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. *The American Journal of Pathology*, 1988, 133: 564-572.
 60. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate

- and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 1998, 98: 699-710.
61. Ikeda U, Ikeda M, Kano S, Shimada K. Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1994, 23: 647-652.
 62. Roos A, Bouwman LH, Munoz J, Zuiverloon T, Faber-Krol MC, Fallaux-van den Houten FC, Klar-Mohamad N, Hack CE, Tilanus MG, Daha MR. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Molecular Immunology*, 2003, 39: 655-668.
 63. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Medical Hypotheses*, 2007, 68: 1363-1370.
 64. Senatorski G, Paczec L, Kropiewnicka E, Bartlomiejczyk I. (2002). "Cytokines in noninvasive diagnostics of diabetic nephropathy progression", *Polski Merkurusz Lekarski*, 13(1): 28-32.
 65. Gündüz A, Er H. Sitokinler ve Oftalmolojideki Yerleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, 2000, 9: 53-58.
 66. Dupont Y, Cohen JB, Changeux J.P. X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of *Torpedo marmorata*, *FEBS Letters*, 1974, 40: 130-133.
 67. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 1991, 26: 230-242.
 68. Hefti AF. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology*, 1993, 3: 64-75

69. Abbas, A. K, Lichtman, A. H., Pober, J. S., *Cellular and Molecular Immunology*, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.
70. Güneri İ, Özmen D. Bayindir, O., Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 1997, 17: 65-74.
71. Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 2002, 12: 113-120.
72. Gabryel B, Labuzek K, Malecki A, Herman ZS. Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro. *Polish Journal of Pharmacology*, 2004, 56: 129-136.
73. Burne MJ, Elghandour A, Haq M, Saba SR, Norman J, Condon T, Bennett F, Rabb H. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001, 70: 192-198.
74. Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *Journal of immunology*, 1999, 163: 3963-3968.
75. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1993, 33: 71-90
76. Tamer L. PG., Eskanderi G., Ercen B., Atik U. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi *Tıp Fak. Dergisi*, 2000, 1: 52-58.
77. Southard JH., Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. "Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase." *Surgery* 1987, 101: 566-570.

78. Lee Y, Shacter E. "Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins." *Archives Biochemistry Biophysics*, 1995; 321(1): 175-181.
79. Erden M. Serbest radikaller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 1992; 12: 201-207.
80. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 1989, 9: 1-8.
81. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
82. Dugan LL, Choi WD. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Annals of Neurology*, 1994; 35: 17-21.
83. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991,43: 109-142.
84. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, 283: 65-87.
85. Ramos CL, Pou S, Rosen GM. Effect of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase - dependent hydroxyl radical generation by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*, 1995, 49: 1079-1084.
86. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*. 1991, 91(3C): 23-30.
87. Jurcau A. Acute cerebral ischemia and oxidative stres. *Pharmacological Reviews*, 2008, 2: 45-56.
88. Akkaya K. Sıçanlarda Akrilonitril İle Oluşturulmuş Oksidatif Strese Karşı Timokinon ve Kurkuminin Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Sağlık

- Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Mersin: Mersin, 2018.
89. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160: 1 - 40.
90. Halliwell B. Reactive oxygen species and central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 1992, 59: 1609-1623.
91. Champe PC, Harvey RA. Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry, 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincot Company, 1994.
92. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015, 6 (3): 331-336.
93. Freeman BA, Crapo J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*. 1982, 47(5): 412-426.
94. Aksoy Y. Antioksidan Mekanizmada Glutatyonun Rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002, 22: 442-448.
95. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*. 1991; 91(3C): 2-13.
96. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health and disease*. 1st ed. New York: Oxford University Press, 1994.
97. Kılınc K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi*, 1986, 11: 59-76.

98. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007. 39, 44-84.
99. Gözükar EM. *Biyokimya*. 5. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2011.
100. Canino R, Fiorentino G, Moran A, Rossi M, Bartolucci S. Oxygen friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra and extracellular oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*, 2000, 5: 768-779.
101. Buyukuslu N, Çelik Ö, Atak Ç. The Effect of Magnetic Field on the activity of Superoxide Dismutase. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2006, 5:57-62.
102. Çaylak E. Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. *Tıp Araştırma Dergisi*, 2011, 9(1): 73-83.
103. Awasthi Y, Beutler E, Srivastava KS. Purification and Properties of Human Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(13): 5144-5149
104. Krenitsky T, Spector T, Hall WW. Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 247: 108-119.
105. Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72 (2- Suppl.): 670-674
106. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 1997, 21: 88-101.
107. Mak T. The E. Donnall Thomas Lecture-apoptosis: "tis death that makes life live". *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2003, 9: 483-488.

108. Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) İçinde: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (Editörler), *Moleküler Biyoloji*. Ankara: Nobel Yayın, 2007: 423-468.
109. Apoptosis.<https://evrimagaci.org/programli-hucre-olumu-apoptosis-hucre-olumu-nekroz-ve-evrim-257>. 14.11.2018
110. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495–516.
111. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456–1462.
112. Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians. *Chest*, 1993, 103 (2): 99-101.
113. Böing, A. N., Stap, J., Hau, C.M., Afink, G.B., Ris-Stalpers, C., Reits, E.A., Sturk, A., Van Noorden, C.J.F. and Nieuwland, R., 2013. Active caspase-3 is removed from 32 cells by release of caspase-3-enriched vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 1844-1852.
114. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E.S CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (49): 30761–30764.
115. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, 376 (6535): 37–43.
116. Aslan A. Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53

- Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2011.
117. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell death and Differentiation*, 2002, 9 (1): 3–5.
 118. Walters J, Pop C, Scott FL, Drag M, Swartz P, Mattos C, Salvesen GS, Clark AC. A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *The Biochemical Journal*, 2009, 424(3): 335-345.
 119. Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W. Apoptosis: live or die--hard work either way!. *Hormone and Metabolic Research*, 2001, 33 (9): 511–519.
 120. Katunuma N, Matsui A, Le QT, Utsumi K, Salvesen G, Ohashi A. Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis. *Advances in Enzyme Regulation*, 2001, 41(1): 237–250.
 121. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (30): 18530- 18533
 122. Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, 2004, 116 (2 Suppl): 57- 59.
 123. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and Differentiation*, 1999, 6(2): 99–104.
 124. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407(6805): 770-776.
 125. Nakshatri H, Bhat NP, Martin DA, Goulet RJ, Sledge GW. Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone independent growth. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17: 3629-3639.

126. Sen R, Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbinding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, 47: 921-928.
127. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 1999, 18: 6853-6866.
128. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 1998, 16: 225-260.
129. Shishodia, S., Aggarwal, B.B. Nuclear Factor- κ B: a friend or a foe in cancer? *Biochemical Pharmacology*, 2004, 68: 1071-1080.
130. Baeuerle, P.A., Henkel, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual review of immunology*, 1994, 12: 141-179.
131. Wu JT, Kral JG. The NF- κ B/ I κ B signaling system: A molecular target in breast cancer therapy. *The Journal of Surgical Research*, 2005, 123: 158-169.
132. Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science*, 2006, 90: 519-531.
133. Baldwin, JR. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *Journal Of Clinical Investigation*, 2001, 107: 3-6
134. Baldwin, JR. The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annual Review Of Immunology*, 1996, 14: 643-683
135. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 1967, 33: 437-449.
136. Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 462: 210-219.
137. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132: 27-42.

138. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 211-216.
139. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 2007, 21: 2861–2873.
140. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306: 990-995.
141. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069-1075.
142. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 2007, 9: 1102-1109.
143. Türei D, Földvari-Nagy L, Fazekas D, Modos D, Kubisch J, Kadlecsek T, Demeter A, Lenti K, Csermely P, Vellai T. Autophagy Regulatory Network—A systems-level bioinformatics resource for studying the mechanism and regulation of autophagy. *Autophagy*, 2015, 11: 155-165.
144. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, 2007, 13: 1050-1059.
145. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, 2010, 20: 748-762.
146. Desai SD, Saheb SH, Das KK, Haseena S. Phytochemical analysis of nigella sativa and its antidiabetic effect. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2015,7:527-532

147. Kooti W, Noohi ZH, Ahvazi NS, Samani MA., Larky DA. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14(10): 0732–0745
148. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2003, 58 (9-10): 629- 631.
149. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research*, 2004, 18(3): 195-199.
150. Randhawa MA and Al-Ghamdi MS. Anticancer activity of *nigella sativa* (black seed)-a review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2011, 39(6), 1075–1091.
151. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds in mice. *Phytomedicine*, 2004, 11(1), 56–64.
152. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*L. Nigella sativa*), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 19(5): 757–762.
153. Shuid AN, Mohamed N, Mohamed IN, Othman F, Suhaimi F, Ramli ESM, Muhammad N, Soelaiman IN. *Nigella sativa*: a potential antiosteoporotic agent, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-6.
154. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: A review. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 2009, 20: 741-52

155. Usta A. Deneysel Diyabetli Ratlarda Timokinon Uygulanmasının Nükleer Faktör Kappa B (Nf-Kb) Ve Dna Hasarı Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2014
156. Khan MA, Chen HC, Tania M, Zhang DZ. Anticancer activities of nigella sativa (black cumin). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2011, 8, 5: 226-232.
157. Azza MM, Nadia MM, Sohair SM. Sativa seeds against Schistosoma mansoni different stages. *The Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005, 100(2): 205-211.
158. Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the nigella sativa L seed. *International Immunopharmacology*, 2005; 5: 1749-1770.
159. Dündar Y. Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2001, 2: 131-138.
160. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone, *The International Journal of Oncology*, 2003, 22(1): 107-113.
161. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Research*, 2007, 67 (16): 7782-7788
162. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, SchneiderStock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer biology & therapy*, 2007, 6,(2): 160-169
163. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic

- cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism, *International Journal of Oncology*, 2004, 25(4): 857-866.
164. Attia A, Ragheb A, Sylwestrowicz T, Shoker A. Attenuation of high cholesterol-induced oxidative stress in rabbit liver by thymoquinone. *The European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2010, 22(7): 826-834
165. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of nigella sativa, *Phytotherapy Research*, 2003, 17(4): 299-305.
166. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats, *The Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 72(1-2): 299–304.
167. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of nigella sativa oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats, *The Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 84(2-3): 251-258.
168. Kanter M, Meral I, Yener Z, Özbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats, *Tohoku Journal Of Experimental Medicine*, 2003, 201(4): 213- 219.
169. Fararh KM, Ibrahim AK, Elsonosy YA. Thymoquinone enhances the activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic rats, *Research in Veterinary Science*, 2010, 88(3): 400–404.
170. Al-Enazi MM. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(18): 3115-3119.

171. Mansour MA. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sciences*, 2000, 66(26): 2583-2591.
172. Alsaif MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats, *Journal of Medical Sciences*, 2007, 7(7): 1164-1170.
173. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, Takewaki T. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International Immunopharmacology*, 2002, 2(11): 1603–1611.
174. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone, potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 83(4): 443-451.
175. Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus, *The European Journal of Pharmacology*, 2006, 543(1-3): 40–47.
176. Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia–reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012, 385(5): 503–508
177. Güllü EB, Avcı G. Timokinon: *Nigella sativa*'nın biyoaktif komponenti, *Kocatepe Veterinary Journal*, 2013, 6(1): 51-61.
178. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells, *Hepato Pancreato Biliary Association*, 2009, 11(5): 373–381.

179. Mohany M, El-Feki M, Refaat I, Garraud O, Badr G. Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide, *The Journal of Toxicological Sciences*. 2012, 37(1): 1-11.
180. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Antiinflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation, *International Immunopharmacology*, 2006, 6(7): 1135-1142.
181. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for Thymoquinone-induced cell cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes, *Anticancer Drugs*, 2004, 15(4): 389-399.
182. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
183. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95:351-358.
184. Sun Yi, Larry W. Oberley, Ying Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34(3):497-500.
185. Sedlak, J., Lindsay, R. H. L. Estimation of total and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Elman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.
186. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37(4): 277-85.
187. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38(12): 1103-1111.
188. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Annals of Neurology*, 1992, 32 Suppl: 33-42.

189. Okabe H. The role of xanthine dehydrogenase (xanthine oxidase) in ischemiareperfusion injury in rat kidney. *Nippon Jinzo Gakkai shi*, 1996, 38: 577-584.
190. Yazan S. Rat Abdominal Epigastrik Flebinde Diosmin + Hesperidin İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi. Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2015
191. Lin HI, Wang D, Leu FJ, Chen CF, Chen HI. Ischemia and reperfusion of liver induces eNOS and iNOS expression: effects of a NO donor and NOS inhibitor. *The Chinese Journal Of Physiology*, 2004, 47: 121-127.
192. Cakir Gungor AN, Gencer M, Karaca T, et al. The effect of hesperetin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2014, 290: 763-769.
193. Sahin FK, Cosar E, Koken G, et al. Protective effect of aprotinin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2008, 34: 794-800.
194. Ustundag UV, Sahin S, Ak K, et al. The effects of tacrolimus on the activity and expression of tissue factor in the rat ovary with ischemia-reperfusion induced injury. *Reproductive Biology*, 2015, 15: 139-145.
195. Akdemir A, Sahin C, Erbas O, et al. Isursodeoxycholic acid crucial for ischemia / reperfusion-induced ovarian injury in rat ovary? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2015, 292: 445-450
196. Kılıç A., Uyanıkoğlu H., İncebıyık A. Protective Effect of N-Acetylcystein and Resveratrol on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovary. *Dicle Medical Journal*, 2016, 43(2): 229-236

197. Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, et al. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2010, 152: 186-190.
198. Eser A, Hizli D, Haltas H, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomedical Reports*, 2015, 3: 807-813.
199. Hussein AE, Abd-Elkhabir A, Abozahra A, Baiomy A, Ashamalla SA, Sheashaa HA, Sobh MA. Pancreatic injury secondary to renal ischemia/reperfusion (I/R) injury: possible role of oxidative stress. *Physiological Research*, 2014, 63(1):47-55
200. Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M. The influence of oxidative stress on the level of malondialdehyde (MDA) in different areas of the rabbit brain. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina*, 2002, 57: 160-164
201. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, et al. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *The World Journal of Gastroenterology* , 2005, 11: 1825-1828.
202. Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, et al. Protective effects of sildenafil administration on testicular torsion/detorsion damage in rats. *The World Journal of Urology*. 2008, 26: 197-202.
203. Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, Kilic C, Coskun K, Halici Z, Suleyman H, Nuri Keles O, Unal B. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *NaunynSchmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2010, 381: 455-466.
204. Cosar E, Sahin FK, Köken G, Toy H, Basarali K, Buyukbas S. The protective effect of alpha-lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury.

- Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2007; 47: 499-503.
205. Erkanlı K., Kayalar N., Erkanlı G., Ercan F., Sener G. and Kırallı K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Journal of Pineal Research*. 2005, 39: 238–242
206. Kim IH, Yan BC, Park JH, Yeun GH, Yim Y, Ahn JH, Lee JC, Hwang IK, Cho JH, Kim YM, Lee YL, Park JH, Won MH. Neuroprotection of a novel synthetic caffeic acid-syringic acid hybrid compound against experimentally induced transient cerebral ischemic damage. *Planta Medica*, 2013, 79: 313-321
207. Sancak EB, Akbas A, Silan C, Cakir DU, Turkon H, Ozkanli SS. Protective effect of syringic acid on kidney ischemia-reperfusion injury. *Renal Failure*, 2016, 38: 629-635
208. Yurtcu E, Togrul C, Ozyer S, Uzunlar O, Karatas YH, Seckin KD, Caydere M, Hucumenoglu S, Cicek N. Dose dependent protective effects of vardenafi 1 on ischemia-reperfusion injury with biochemical and histopathologic evaluation in rat ovary. *Journal of Pediatric Surgery*, 2015, 50: 1205-1209
209. Güzel D., Tanyeli A., p-Kumarik Asit, Renal İskemi Reperfüzyon Kaynaklı Akut Pulmoner Hasarı Azaltır. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2018, 8(3):644-649
210. Yildiz F., Coban S., Terzi A., Ates M, Aksoy N., Cakir H., Ocak A.R., and Bitiren M. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *The World Journal of Gastroenterology*. 2008, 14(33): 5204–5209.
211. Wu C, Wang P, Rao J, et al. Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF-kappaB activity in mice. *The Journal of Surgical Research*. 2011, 166: 205-213.

212. Kim SJ, Moon YJ, Lee SM. Protective effects of baicalin against ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Journal of Natural Products*. 2010; 73: 2003-2008.
213. Liu P, Xu B, Spokas E, Lai PS, Wong PY. Role of endogenous nitric oxide in TNF-alpha and IL-1beta generation in hepatic ischemia-reperfusion. *Shock*, 2000, 13(3): 217-223
214. Ross J.L., Queme L.F., Lamb J.E., Green K.J., Ford Z.K., Jankowski M.P. Interleukin 1 β inhibition contributes to the antinociceptive effects of voluntary exercise on ischemia/reperfusion-induced hypersensitivity. *Pain*, 2018, 159(2): 380–392.
215. El-Bahy AA, Kassem LA, Heikal OA, Mahran LG. Antiapoptotic effect of DDB against hepatic ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2011, 36: 145-154.
216. Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer*, 2010, 10: 9.
217. Jayaraman, G., Priyadharsini, J.V., Rajiv, R., Anandan, B., Raghunandhakumar, S., Shabnam, J., Sambantham, S., Paramasivam, A., 2012. Anti-Cancer Effects of Thymoquinone in Mouse Neuroblastoma (Neuro-2a) Cells Through Caspase-3 Activation with Down-Regulation of XIAP, *Toxicology Letters*, 213, 151-159.
218. Kim G., Chun Y., Park J., Kim M., Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 309(3) 619-624.

219. Hu S, Cao S, Tong Z, Liu J. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. *American Journal of Translational Research*. 2018 15;10(11):3677-3688
220. Demir, E., S. Taysi, B. Al, T. Demir, S. Okumus, O. Saygili, E. Saricicek, A. Dirier, M. Akan, M.Tarakcioglu and C. Bagci The effects of Nigella sativa oil, thymoquinone, propolis, and caffeic acid phenethyl ester on radiation-induced cataract. *The Wiener klinische Wochenschrift*, 2016, 128(Suppl 8):587-595.
221. Abdel-Wahab, W. M. "Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats." *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2014. 17(11): 1152-1160.
222. Erboga, M., C. Aktas, O. Kurt, R. Uygur, V. Caglar, B. C. Turan, B. Topcu, Z. Fidanol Erboga, A. Gurel and O. A. Ozen. Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*. 2015, 48(2).

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Özge Nur TÜRKERİ
Doğum tarihi:	20.08.1987
Doğum Yeri:	Amasya
Medeni Hali:	Evli, 1 çocuk
Uyruğu:	T.C
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, 25240 ERZURUM
Tel:	0442 234 6612
Faks:	0442 234 1050
E-mail:	ozgenurgunes@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Aydın Efeler Süper Lisesi (2005)
Lisans:	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği (2006-2011)
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2011/2014)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2014/2019)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta düzey
Almanca:	-
Rusça:	-

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BAYAN FORMU ONAY FORMU

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BAYAN FORMU ONAY FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Nuri BAKAN danışmanlığında sunulan “İskemi Reperfüzyonla İndüklenen Rat Over Hasarı Üzerine Timokinonun Biyokimyasal ve Histopatolojik Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	16	30
Materyal ve Metod	13	35
Bulgular	5	10
Tartışma	3	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 03 /05/ 2019

Özge Nur TÜRKERİ

İmza



Prof. Dr. Nuri BAKAN

İmza



* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800069779
Konu : HADYEK Kararı.

23.02.2018

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 12.02.2018 tarihli ve 42190979-000-E.1800051443 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 22.02.2018 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 29 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 22.02.2018

Toplantı Sayısı : 2

KARAR N0 29: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Nuri BAKAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "İskemi Reperfüzyonla İndüklenen Rat Over Hasarı Üzerine Timokinonun Biyokimyasal ve Histopatolojik Etkisi" isimli doktora tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 12.02.2018 tarih ve 42190979-000-E.1800051443 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>

Keş Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vctfak@atauni.edu.tr

