



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNFRARENAL AORT KLEMPLENMESİ İLE İSKEMİ-
REPERFÜZYON OLUŞTURULAN RATLARDA GİNSENG
EKSTRESİNİN VE ÇÖREK OTUNUN (TİMOKİNON) OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN

Danışman

Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

HATAY – 2016



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNFRARENAL AORT KLEMPLENMESİ İLE İSKEMİ-
REPERFÜZYON OLUŞTURULAN RATLARDA GİNSENG
EKSTRESİNİN VE ÇÖREK OTUNUN (TİMOKİNON) OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN

Danışman

Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
14040 nolu proje olarak desteklenmiştir

HATAY – 2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İNFRARENAL AORT KLEMPLENMESİ İLE İSKEMİ-REPERFÜZYON
OLUŞTURULAN RATLARDA GİNSENG EKSTRESİNİN VE ÇÖREK OTUNUN
(TİMOKİNON) OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lütfiye Gül ÇALIŞKAN

Danışman

Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 29 / 04 / 2016 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Nurten AKSOY

Üye: Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

Üye: Doç.Dr. Sedat MOTOR

Bu tez, Enstitümüz Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

29/04/2016

Doç.Dr.Yaşar ERGÜN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEŞEKKÜRLER

Tıbbi Biyokimya anabilim dalında yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini benden esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına katkıda bulunan değerli danışman hocam sayın Doç.Dr.Zafer Yönden'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ali Özcan, Doç.Dr.Sedat Motor ve Yrd.Doç.Dr.Oğuzhan Özcan'a

Deneylerin gerçekleştirilmesinde ve laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan asistan arkadaşlarım Yasemin Çalışkan ve Şahin Öztürk'e

Büyük bir fedakarlık ve anlayışla her konuda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da manevi desteklerini esirgemeyen eşime,aileme,yakınlarıma ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İç Kapak	II
Kabul ve Onay	III
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
RESİMLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	3
2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri	4
2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler	7
2.1.3. Kompleman sistemi	9
2.1.4. Endotel hücreninin rolü	9
2.2 ANTİOKSİDANLAR	10
2.2.1. Endojen antioksidanlar	10
2.2.2. Eksojen antioksidanlar	11
2.2.3. Süperoksit dismutaz	12
2.2.4. Katalaz	12
2.2.5. Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz	12
2.2.6. Glutasyon S-Transferaz	13
2.2.7. Glutasyon	13

2.2.8. Vitamin E (α -tokoferol)	14
2.2.9. Vitamin C (askorbik asit)	14
2.2.10. Karotenoidler	15
2.2.11. Ürik asit	15
2.2.12. Taurin	16
2.2.13. Melatonin	16
2.3. ÇÖREK OTU	18
2.3.1 Timokinon	20
2.3.2. Timokinonun Etkileri	21
2.4. GİNSENG EKSTRESİ (PANAX)	27
2.5. ASETİLSALİSİLİK ASİT (ASPİRİN)	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1.Cerrahi prosedür:	38
3.2. Biyokimyasal Analiz	39
3.2.1.Total Antioksidan Status	39
3.2.2. Total Oksidan Status	39
3.2.3. Oksidatif Stres İndeksi	39
3.3. İstatiksel analiz	41
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Pürin nükleozitlerinden ürik asit oluşumu	4
Şekil 2: Serbest oksijen radikal kaynakları	5
Şekil 3: Oksijenden reaktif ürünlerin oluşumu	6
Şekil 4: Timokinon	21
Şekil 5: Dammanare saponinlerin yapısı	28
Şekil 6: Asetil salisilik asit kimyasal yapısı	33
Şekil 7: TAS dağılımı	42
Şekil 8: TOS dağılımı	43
Şekil 9: OSI dağılımı	43



RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa no
Resim 1: PMNL aktivasyon şeması	8
Resim 2: Çörek otu	18
Resim 3: Ginseng	27
Resim 4: Aspirin	32
Resim 5: Hayvan deneyi sırasında genel görüntüler	37
Resim 6: Ratların oral gavaj ile beslenmesi	38
Resim 7: Cerrahi sürecin izlenmesi	39

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo 1: TOS TAS ve OSI ham değerleri	40
Tablo 2: Gruplar arası OSI değerlerine göre değerlendirilmesi	44
Tablo 3: Grupların dağılımı	44



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2 '-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit
AMP	Adenozin mono fosfat
ASA	Asetil salisilik asit
ATPaz	Adenin tri fosfataz
AP-1	Aktivatör protein
Ca ⁺	Kalsiyum
CAPE	Kafeik asit
CAT	Katalaz
COX	Siklooksijenaz
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
e ⁻	Elektron
Fe	Demir
Fe ⁺²	Ferröz demir
Fe ⁺³	Ferrik demir
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSH-R	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz

H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HDL	High density Lipoprotein
HgA1c	Glike hemogloblin
HOCL	Hipokloröz asit
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü-1
IL-1	İnterlökin-1
I/R	İskemi-reperfüzyon
ip	İntraperitoneal
K ⁺	Potasyum
LDL	Low density lipoprotein
LD ₅₀	Lethal doz yarı ömrü
LOOH	Lipit hidroperoksit
LT	Lökotrien
MDA	Malondialdehit
MRNA	Messenger ribo nükleik asit
Na ⁺	Sodyum
NAD ⁺	Nikotin adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-Kb	Nükleer transkripsiyon faktörü
NO	Nitrik oksit

NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂	Moleküler Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit
OH [·]	Hidroksil radikali
OSI	Oksidatif stres indeksi
P	Probability,olasılık
P38	Mitojen aktıveli protein kinaz
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PMNL	Polimorf nüveli lökositler
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Statistical Packages for the Social Science
STZ	Streptozosin
TAS	Total antioksidan status
TNF- α	Tumör nekrozis faktör
Toc O	Tokoferol
TOS	Total oksidan status
Zn	Çinko

ÖZET

İnfrarenal Aort Klemplenmesi ile İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Ginseng Ekstresinin ve Çörek Otunun (Timokinon) Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması

Son zamanlarda modern tıbbın bazı hastalıklarda yetersiz kaldığı kanısı toplumda sıklıkla dile getirilmeye başlanması sonrası insanlarda yeni arayışlar, insanları tekrar geleneksel tıp olarak adlandırılan bitki köklerinden veya kendisinden elde edilen ilaç yapımına itmektedir. Bu çalışmamızda Doğu Asya geleneksel tıbbında sıklıkla kullanılan ginseng ile Ortadoğu ve Anadolu topraklarında büyük şifa kaynağı olarak bilinen çörek otunun günümüzün en sık mortalite ve morbidite nedeni olan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkinliğini tartışmaya açmayı amaçladık.

Bu çalışmada 35 adet yetişkin rat 5 randomize gruba (kontrol, sham, ginseng, asetilsalisilik asit [ASA] ve timokinon) bölünerek, kalpten alınan serum örneklerinden total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI) çalışılarak sonuçlar değerlendirildi.

Sham ve kontrol grubu kıyaslandığında iskemi-reperfüzyonun tek başına oksidatif stresi laparotomiden daha çok etkilediğini düşündürdü. TAS değerlerinin kontrol grubu ile ASA grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu saptandı ($p=0,035$). ASA, ginseng ve timokinon arasında anlamlı fark bulunmadı. Timokinon grubundaki düşük TOS seviyeleri ise iskemi-reperfüzyon oluşturulan kontrol grubu ($p=0.013$), çalışma grubu olarak tasarlanan ginseng grubu ($p=0.002$) ve ASA grubuna ($p=0,048$) göre anlamlı izlendi. Timokinon grubunda en düşük OSI seviyeleri saptanırken bu fark kontrol ($p=0,009$), sham ($p=0,013$), ginseng ($p=0,002$) ve ASA ($p=0,030$) gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlıydı.

Abdominal aort hastalıklarında aortun klemplenmesiyle iskemi-reperfüzyon hasarına yol açılabilir. Yaptığımız bu iskemi-reperfüzyon deneysel modelinde geleneksel tıpta kullanılan ginseng ve çörek otunu, modern tıpta rüştünü ispatlamış aspirin ile antioksidan özellikleri açısından kıyasladığımızda aralarında anlamlı fark saptanmamasına rağmen kontrol grubu ile anlamlı fark saptanmıştı ki bu da kullandığımız her üç materyalin de antioksidan olduğunu göstermiştir. Çörek otunun etken maddesi timokinonun ise TOS seviyesinin anlamlı şekilde diğerlerine göre daha az olduğunu saptadık. Bitkisel ilaçların modern tıp dünyasında tartışılır halde olmasının en önemli sebebi içindeki etkin maddenin standartize edilememesidir. Buradan çıkan sonuç ise; halen geleneksel şifa kaynakları olarak bilinen bitkisel ilaçlar üzerinde çalışılması gerektiği, bu şekilde yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ışık tutulabileceğidir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, Ginseng, Timokinon, İskemi-reperfüzyon

ABSTRACT

The Effect Of Ginseng Extract and Black Cumin (Thymoquinone) on a Rat Model of Ischemia-Reperfusion Formed by Infrarenal Aort Clamping

The lack of effective treatment of some diseases by modern medicine have made people search traditional treatments which are derived from plants or plant roots. In this study, we aimed to investigate the protective role of ginseng, which is a frequently used compound in the East Asian traditional medicine, and black cumin, which is a great source of healing in the Middle East and Anatolia, on ischemia-reperfusion injury which is the most common cause of morbidity and mortality in recent years.

Total antioxidant levels (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) values of rat serum samples taken from the heart were evaluated in 35 adult rats which were divided into 5 randomized groups (control, sham, ginseng, acetylsalicylic acid [ASA] and thymoquinone).

When compared to the sham and control groups, ischemia reperfusion effected oxidative stress more than only laparotomy. TAS value of the control group was significantly different from the ASA group ($p = 0.035$). There were no significant difference between the ASA, ginseng and thymoquinone groups. TOS levels of thymoquinone group were significantly lower than the control ($p = 0.013$), ginseng ($p = 0.002$) and ASA groups ($p = 0.048$). Lowest levels of OSI were detected in thymoquinone group which was significantly different from the control ($p = 0.009$), sham ($p = 0.013$), ginseng ($p = 0.002$) and ASA ($p = 0.030$).

The aortic abdominal aortic disease can lead to ischemia-reperfusion injury by clamping. In the present ischemia-reperfusion experimental model, the effect of ginseng and black cumin which are used in traditional medicine were comparable with ASA which is the evidence based treatment in ischemic diseases in modern era. Thymoquinone, active compound of black cumin, significantly reduced the TOS levels compared to other groups. Although herbal medicines are being discussed in the modern medical world due to the inadequate standardization of active substance, we conclude that there should be large scale researches on herbal medicine which may help to develop combined treatment strategies in addition to modern medicine.

Keywords: oxidative stress, ginseng, thymoquinone, ischemia-reperfusion

1. GİRİŞ

Günümüz teknolojisinin hızla gelişmesi ve sanayileşme hayatın tüm aşamaları gibi tıbbi tedavi protokollerini de etkilemektedir. Eski zamanlardan beri Anadolu topraklarında, Orta Asya ve Afrika'da şifa verici bitkiler kullanılmaktadır. Sanayi devrimi sonrası göz ardı edilen, etkinliği tartışılan geleneksel yöntemlerle hazırlanan bitkisel kaynaklı ilaçlar, teknoloji karşısında güvenilirliğini zamanla kaybetmiştir. Son zamanlarda modern tıbbın bazı hastalıklarda yetersiz kaldığı kanısı toplumda sıklıkla dile getirilmeye başlanması sonrası insanlarda yeni arayışlar, yeni umutlar ve bunları fırsata dönüştürmek isteyen kişi ve kuruluşlar oluşmasına neden olmuştur. Geleneksel tıp zaman zaman modern tıp ile birlikte, zaman zamansa ona alternatif olarak insanları çözüm arayışlarına yöneltmiştir. Bu arayışlar insanları tekrar geleneksel tıp olarak adlandırılan bitki köklerinden veya kendisinden elde edilen ilaç yapımına itmektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarı çeşitli damar tıkanıklıkları sonrası gelişen ciddi bir problemdir. İskemi kelime manası olarak dokulara kan sağlayan damarların bir şekilde (pıhtı, ateroskleroz veya mekanik) tıkanması ile dokularda beslenme bozukluğunu takiben gelişen reaksiyonlar bütününe denir, reperfüzyon ise tıkalı olan damarların ilaçlarla veya mekanik olarak açılması sonrası oluşan reaksiyonlar zincirinin adıdır.

İskemi-reperfüzyon hasarında temel patofizyoloji, iskemik dokuların reperfüzyonu sonrası gelişen mikrovasküler disfonksiyondur (Teke Z ve ark. 2008). Bu olay olduğunda mikrovasküler dolaşımda endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, lökosit infiltrasyonu ve plazma protein ekstravazasyonu gibi değişiklikler gerçekleşmektedir. Mikrosirkülasyondaki aktive endotel hücreleri reperfüzyon sonrası ilk dönemde daha fazla oksijen radikali, ancak daha az nitrik oksit üretmektedir (Zimmerman ve ark. 1992, Teke Z ve ark. 2008). Bu dengesizlik inflamatuvar belirteçlerin üretim ve salınımına yol açmakta ve bir dizi reaksiyonu tetiklemektedir. Reperfüzyon sonucunda salınan inflamatuvar belirteçlerin uzak organlardaki endotel hücrelerini de aktive ettiği görülmektedir (Zimmerman BJ ve ark. 1992). Bu aktivasyon sonrası multipl organ disfonksiyonun özelliği olan lökosit bağımlı mikrovasküler hasar meydana gelebilmektedir (DN 1999).

Oksidatif stres dokularda normalde üretilen serbest radikaller ile antioksidanların oranının radikaller lehine bozulması ile oluşan hücre düzeyindeki hasar olarak tanımlanır (Zimmerman ve ark. 1992, DN 1999).

Ginseng'in kelime manası "insan otu" 'dur. Kökünün görünüşü nedeniyle Çince'de bu isim verilmiştir. Ginseng ekstreleri özellikle Doğu Asya ülkelerinde çok uzun süredir geleneksel tıpta kullanılan bir saponindir (Fu YQ ve ark. 2013). Şimdiye kadar 30'un üzerinde ginsenoid ekstresi tanımlanmıştır (Shibata S ve ark. 1985, J 1995). Yakozowa ve arkadaşları (1998)ratlar üzerinde böbrek iskemi-reperfüzyon modelinde koruyucu etkisi olduğunu raporlamışlardır. Antiagregan ilaçlarla yapılan rat çalışmalarında iskemi-reperfüzyon modellerinde ginsengin koruyucu etkisi bildirilmiştir (Kanko M ve ark. 2005, Iba T ve ark. 2006 , Hu H ve ark. 2011).

Geleneksel tıpta diğer bir ürün olan çörek otu ile yapılan çalışmada diabetes mellutusa bağlı oluşan oksidatif strese karşı korumada faydalı olduğunu bildirmişlerdir (M. 2009). Ayrıca yapılan çalışmalarda çörek otu yağı olan timokinonun antioksidan özelliği vurgulanmıştır (Salem 2005).

Bu çalışmamızda Doğu Asya geleneksel tıbbında sıklıkla kullanılan ginseng ile Ortadoğu ve Anadolu topraklarında büyük şifa kaynağı olarak bilinen çörek otunun günümüzün en sık mortalite ve morbidite nedeni olan iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan hastalıkların tedavisinde etkinliğini tartışmaya açmayı amaçladık.

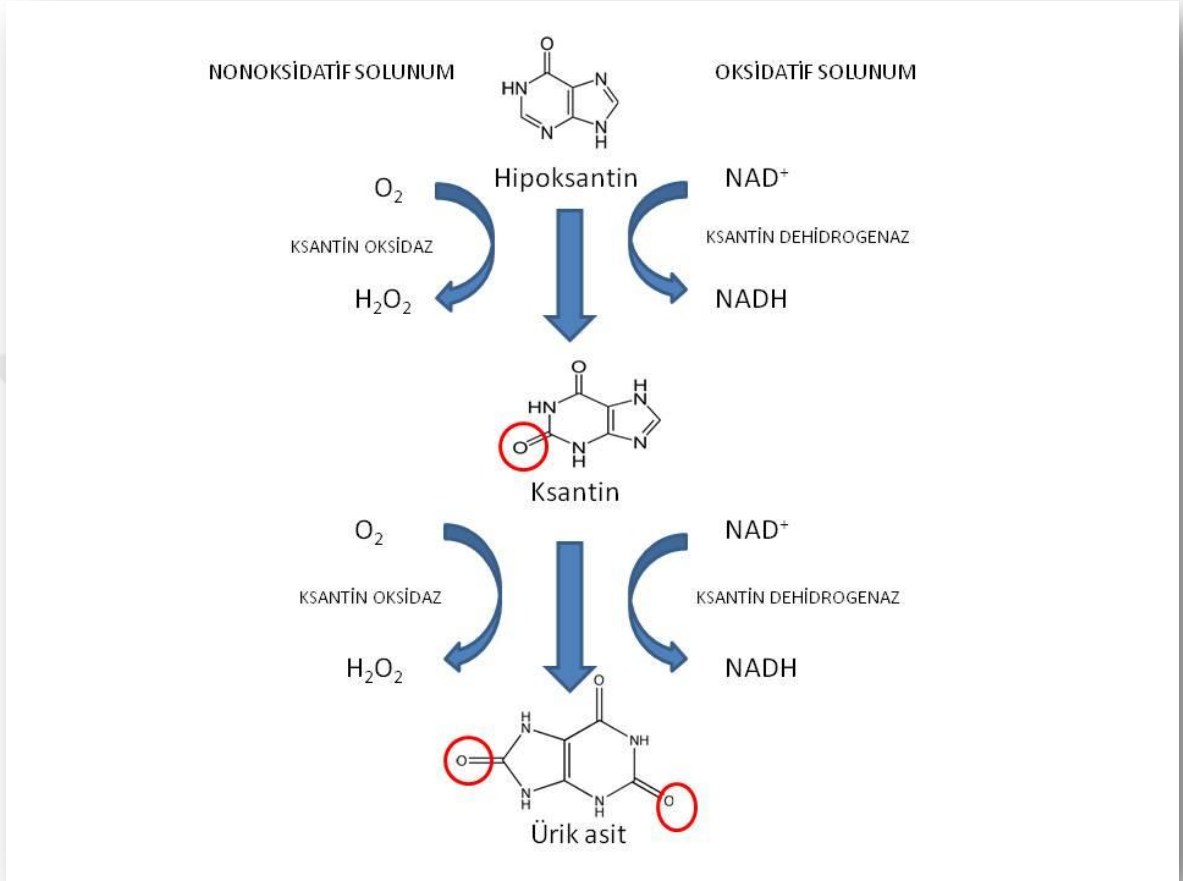
2. GENEL BİLGİLER

2.1 İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Hücre ve doku düzeyinde kan ihtiyacının mekanik veya fonksiyonel olarak kısmen ya da tamamen karşılanmaması haline “iskemi” denir (Aka S.A ve ark.. 2004). Her dokuda iskemi sonrası hasar hemen başlamakla beraber, geri dönüşümsüz hasarın oluşma zamanı farklıdır. Örneğin; beyin dokusundaki nöronlar iskemiyeye 5-7 dk dayanabilirken, kas hücreleri 4-6 saate kadar dayanabilmektedir. Bu iskemi süresini takiben yeniden kanlanma olayı sonrası hücre düzeyinde zaman ve doku yapısı göz önüne alınarak ortaya çıkan reaksiyon zincirine ise “reperfüzyon hasarı” adı verilir (Zimmerman BJ ve ark. 1992). İskemik doku hücre düzeyinde enerji depolarının boşalması ve biriken toksik maddeler nedeni ile kendini ölüme programlar, reperfüzyonda ise olay karmaşık hale gelerek ortaya çıkan toksik maddelerin yanına bir de oksijen radikalleri eklenir ve lokal halde olan iskemi süreci vücutta genel bir reaksiyon zincirini tetikleyerek yaygın bir inflamatuvar süreci başlatır (Jennings ve Reimer 1991). Reperfüzyon hasarına en duyarlı yapılar zar lipitleri, nükleik asitler, proteinler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Wilhelm 1990).

Hücre düzeyinde iskeminin başlaması ile metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Kan akımının azalması ile hücrede oksidatif fosforilasyon azalır, ardından yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Hücre düzeyinde enerji depolarının boşalmasını takiben hücre zarındaki Na^+ - K^+ ATPaz kanal pompaları inhibe olur. Bunun sonucunda hücre içinde Na^+ ve Ca^+ konsantrasyonu artar (Green ve ark.. 1989). Bu Ca^+ iyonun hücre içinde birikmesi toksiktir (Shen ve Jennings 1972). İskemi sürecinde ayrıca lökosit adezyon moleküllerinin yapımında artış, bunun aksine ise antioksidan enzimlerin yapımında ise azalma söz konusudur. Bu da reperfüzyon sonrası dokunun savunmasız kalması anlamına gelmektedir. Hücrede ATP üretilmese de tüketimi devam etmektedir, oluşan AMP ve adenozin hızla hücre dışına difüze olur, inozin ve hipoksantine parçalanır. İskemi sonrası yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine neden olur. Oksidatif solunum sırasında pürin metabolitleri ksantin dehidrogenaz enzimi ile nikotin adenin dinükleotidi (NAD^+) elektron

alıcısı olarak kullanarak ürik asite dönüştürülür. Nonoksidatif solunumda ise ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaza dönüşür bu da elektron alıcısı olarak oksijen kullanır (Parks ve ark. 1988).



Şekil 1: Pürin nükleozitlerinden ürik asit oluşumu

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı fizyopatolojisi ile alakalı birçok faktör öne sürülmüştür. Bu faktörleri dört başlık halinde tartışacağız;

- 1) Serbest oksijen radikalleri
- 2) Polimorf nüveli lökositler
- 3) Kompleman sistemi
- 4) Endotel hücresinin rolü

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri:

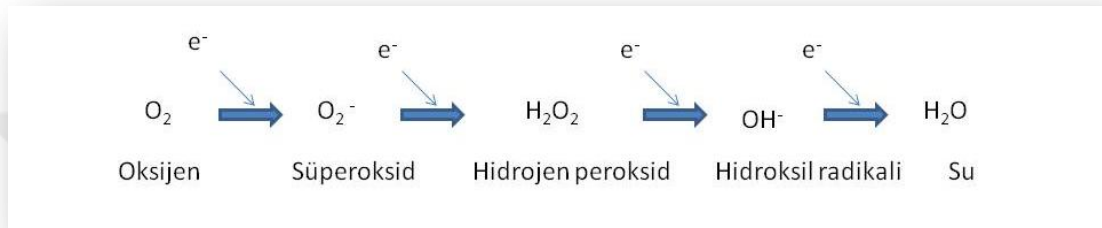
Hayatın devamı için gerekli olan oksijen, metabolik olayların akımı içerisinde bazı ara ürünlere çevrilir. Serbest radikaller denilen bu ara ürünler toksik etkiye sahiptir. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron içeren kimyasal olarak reaktif bileşiklerdir. Genellikle elektronlar atom veya moleküle eşlenik olduğundan kararlı davranır ve reaktif değildir. Fakat bu moleküle bir elektron eklenmesi veya çıkarılması onu reaktif hale getirir (Leong, Rais Mustafa et al. 2013). Oluşan bu serbest radikaller organizmaya zarar verme potansiyeline sahiptir fakat metabolizmanın devamı için süregelen reaksiyonlar zinciri neticesinde oluşumları kaçınılmazdır (Freeman and Crapo 1982). Mitokondrial elektron taşıma zinciri, mikrozomal membran elektron taşıma zinciri, oksidan enzimlerin reaksiyonu, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, fagositik hücrelerin aktivasyonu, endotelial hücreler ve otooksidasyon reaksiyonları başlıca serbest radikal oluşturan endojen kaynaklardır (Cross, Halliwell et al. 1987, Southard, Marsh et al. 1987). Uzun bir süre için, mitokondri tükettiği O₂ 'nin %1-4 'ünden süperoksit ürettiği tahmin edilmekteydi, bu oranı ile hücrel serbest oksijen radikallerin ana üreticisi olarak kabul edilmişti (Steinbacher and Eckl 2015).



Şekil 2: Serbest oksijen radikal kaynakları

Serbest radikal oluşturan eksojen kaynaklar ise indirgenme-yükseltgenme (redoks) ürünleri, ilaç oksidasyonları, radyasyon, güneş ışığı, ağır metaller ve sigara sayılabilir (Lee ve Shacter 1995).

Hücre sistemlerinde bulunan belli başlı oksijen radikalleri süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijendir. Aslında hidrojen peroksit ve singlet oksijen radikal değildir, tüm elektronları doygun haldedir fakat çok çabuk radikale döndüğü için bu sınıfta sayılırlar (Steinbacher ve Eckl 2015).



Şekil 3: Oksijenden reaktif ürünlerin oluşumu

Serbest oksijen radikalleri lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin hasarına neden olarak apoptozisi tetikler (Zubair ve ark. 2013). Yaşlanma, ateroskleroz, hipertansiyon, karsinogenesis, iskemik hasar, immunolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, sindirim sistemi hastalıkları, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıklarının serbest oksijen radikalleri ile sıkı irtibatlı olduğu birçok çalışma ile bildirilmiştir (Cejka ve Cejkova 2015, Chen ve ark. 2015, Kim ve Kang 2015, Rinnerthaler ve ark. 2015, Van De Wier ve ark. 2015).

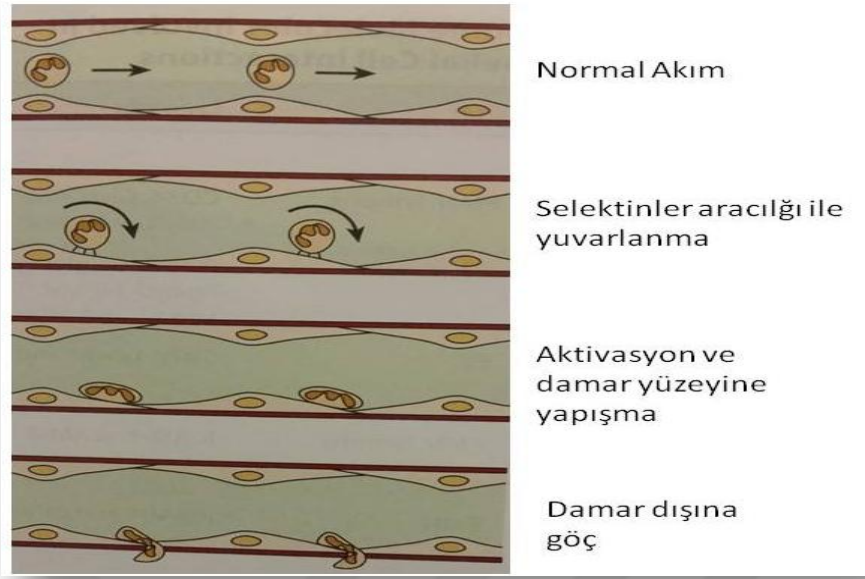
Oksijen radikalleri protein, karbonhidrat, lipid ve nükleik asit metabolizmaları üzerinde çeşitli yolları kullanarak hasara neden olur. Proteinlerde agregasyon, çapraz bağ, floresan oluşumu gözlenir. Floresan oluşumunun sebebi proteinlerin lizin aminoasidinin epsilon amino grubuna malondialdehit bağlanmasıyla schiff bazı ve protein-protein ya da protein-lipit çapraz bağlarının oluşumudur (Beckman ve Ames 1998). Karbonhidratların otooksidasyonu sonunda hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşur (Lee ve Shacter 1995). Serbest radikaller DNA'yı nükleik asit seviyesinde etkileyerek mutasyonlara neden olurlar. Normalde de günlük birçok kez oksidasyona sekonder mutasyon olmasına rağmen %99 'u antioksidan enzimlerle düzeltilir fakat %1 kalır ve

zamanla lezyonların birikimine neden olur (Rinnerthaler ve ark. 2015). Serbest oksijen radikallerinin en önemli etkisi ise lipidler üzerindedir bu da lipid peroksidasyonu olarak isimlendirilir (Rein ve Tappel 1998). Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle ilişkisi sonrası metilen grubundaki bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır. Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Nihayetinde ise hücre membranının akışkanlığı ve permeabilitesini arttırarak membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Lizozomal membranın bozulması ise hidrolitik enzimlerin ortaya saçılmasına ve intraselüler sindirime neden olur (Amat ve ark. 2015).

2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler:

İskemi-reperfüzyon sonrası lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelir (Frangogiannis 2007). Ayrıca polimorf nüveli lökositler (PMNL) yüksek oranda serbest radikal üretebilme kapasitesine sahiptir (Jawa ve ark. 2013). PMNL'nin iskemi-reperfüzyondaki rolü ile ilgili birkaç mekanizma ileri sürülmüştür. Bunlar; a) serbest oksijen radikallerinin salınımı, b) sitotoksik enzim salınımı, c) mikrovasküler oklüzyonlar, d) vasküler permabilite artışı, e) sitokin salınımında artış olarak sıralanabilir (Furuichi ve ark. 2008).

Polimorf nüveli lökositler membrandaki selektif adezyon molekülleri ile aktive edildikten sonra fagositik aktivite ve hücre içi öldürme yeteneğine kavuşurlar. I/R sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin en önde gelen kaynağı durumundadırlar. (Garip R ve ark. 2014) Selektif adezyon molekülleri selektinler olarak bilinirler ve L, P, E selektin olmak üzere üçe ayrılırlar. I/R esnasında P-selektin üretimi artar. Bu molekül PMNL de bulunan P-selektin glikoprotein-1 adlı reseptör ile zayıf bağ oluşturur, ikinci evrede ise lökosit β_2 integrinler ile endoteldeki interselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sırasında lökosit adezyonu ve agregasyonu gelişir , üçüncü aşamada ise trombosit endotel adezyon molekülü -1 ile transmiğrasyon olur bunun sonucunda aktiflenmiş olan lökosit hasar bölgesine göç eder. (Woodfin ve ark. 2007)



Resim 1: PMNL aktivasyonu şeması (Murray R.K ve ark. 2012)

Lökositler aktiflendikten sonra ortaya saldıkları serbest oksijen radikalleri ile oluşturdukları hasarın yanı sıra kümelenerek mikrovasküler düzeyde oklüzyonlar ile iskeminin ve sonrasında apoptozisin tetiklenmesine neden olurlar. (Das D ve ark. 2012) Bu ortama salınan maddeler hasarı azaltmak amaçlı oluşan inflamatuvar cevap sonrası vasküler permeabilitede artış, ödem ve hücre ölümüne sebep olabilir. Görevi biten lökositler apoptozise uğrar ve makrofajlar tarafından ortamdaki uzaklaştırılır. (El-Mahmoudy ve ark. 2005)

Reperfüzyon sonrası arteriol düzeyde endotel bağımlı dilatasyon bozulur, tıkaçlar oluşur, postkapiller venlerde damar dışına plazma sızar ve sonucunda mikrokapiller fonksiyon bozukluğu oluşur. Böylece nitrik oksit ile oksijen radikalleri arasındaki denge kapiller düzeyde radikaller lehine bozulması ile endotel hücrelerinden trombosit aktive edici faktör (PAF) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) gibi inflamatuvar mediatörlerin ve adezyon moleküllerinin salınımının artmasına neden olur (Entok ve ark. 2014) .

2.1.3. Kompleman sistemi;

İskemi-reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin çalışma mekanizması ve etkisi tam manasıyla aydınlatılamamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu ile preinflamatuvar komponentler meydana gelir. Bunlar lökositlerin aktivasyonunda ve kemotaksisinde etkilidirler. Bunun yanı sıra endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozarlar. Kompleman tarafından sentezi artan adezyon molekülleri vasküler adezyon molekülü-1, interselüler adezyon molekülü-1, E- selektin ve P- selektin olarak bildirilmektedir. (Zhang ve ark. 1999)

2.1.4. Endotel hücresinin rolü;

Endotel iskemi-reperfüzyon hasarının oluşumunda önemli bir yere sahiptir, hem hedef hem de radikal üretim merkezi olarak kısır döngünün bir parçasıdır. Endotel mikrovasküler hemostazdan sorumlu endotelin ve nitrik oksit üretir. Endotelin vazokonstriksiyon etkisi mevcut iken nitrik oksit bunun aksine vazodilatatif etkilidir. İskemi-reperfüzyonda bu denge endotelin lehine bozulur. (Alici ve ark. 2011)

Endotel hücresi oksidatif stres ile karşılaşınca kompleman sistemini aktive eder, lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar. Serbest oksijen radikallerinin etkisi ile IL-1, PAF, prostoglandinler, büyüme faktörleri, endotelin, nitrik oksit ve tromboksan A₂ salgırlar. Bunlara ek olarak kendi membranını lizise uğratan kollejenazlar da salınır. (Jawa ve ark. 2013)

2.2 ANTİOKSİDANLAR

Canlının hayatını sürdürebilmesi için oksidan/antioksidan dengesi oldukça önemlidir. Antioksidan savunma sistemi serbest oksijen radikallerinin meydana gelme aşamasında veya sonrasındaki zararlı etkileri önleme aşamalarında etki ederek hücre düzeyinde koruma sağlar.

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler:

1) Süpürücü Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme şeklinde etkidir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.(RJ. 1995;)

2) Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme şeklinde etkidir. Vitaminler ve flavanoidler bu tarz etkiye sahiptir.(Cherubini A ve ark. 2008)

3) Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici şekilde etkidir. Mineraller, hemoglobinin ve seruloplazmin bu tip etki gösterirler.(Mickle DA ve RD 1993)

4) Onarıcı Etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde etkidir. (Virág ve ark. 2002)

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki şekilde tanımlanır.

2.2.1. Endojen antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayan antioksidanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar:

1.Enzim olan endojen antioksidanlar: (Valko ve ark.. 2007)

- Superoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferaz (GST)

- Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz

2.Enzim olmayan endojen antioksidanlar: (AO 2001)

- Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon

- Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin.

2.2.2. Eksojen antioksidanlar

1. Vitamin eksojen antioksidanlar:

- α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar: (Akkuş 1995)

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)

- Rekombinant süperoksit dismutaz

- Trolox-C (vitamin E analogu)

- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)

- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)

- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)

- Nötrofil adezyon inhibitörleri

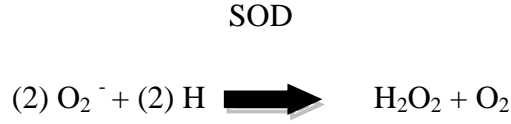
- Sitokinler (TNF ve IL-1)

- Barbitüratlar

- Demir şelatörleri.

2.2.3. Süperoksit dismutaz (SOD)

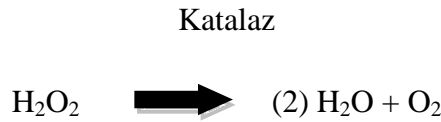
Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalinin (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2^- üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafından düşük tutulur. Ancak H_2O_2 geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH^- radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır. (Kim ve Kang 2015)

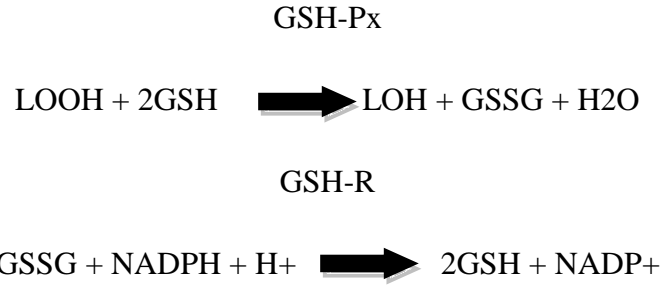
2.2.4. Katalaz

Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az miktarda sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. H_2O_2 'yi oksijen ve suya parçalar. Böylece H_2O_2 'nin OH^- oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar. (Rodriguez C ve ark. 2004)



2.2.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-R)

Gerek H_2O_2 ve gerekse lipid hidroperoksitleri (LOOH) metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H_2O_2 ve LOOH'leri, selenyum-bağımsız tipi sadece LOOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



GSH-Px'nin fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur. (Beckman ve Ames 1998)

2.2.6. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder. (Beckman ve Ames 1998)



2.2.7. Glutasyon (GSH)

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ -glutamil sistein sentaz ve GSHsentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. (Beckman ve Ames 1998)

GSH homeostazı için diyetle yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsistein'in GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamsal fonksiyonlarda büyük öneme sahip GSH'ın, hayvan çalışmalarında lenfositlerin ve ince bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır. (Ratz-Lyko ve ark. 2015)

2.2.8. Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır. Hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir.

Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna (TocO) dönüşse de, askorbik asit, glutatyon ve koenzim Q10 (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline döndürülür. Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği gösterilmiştir. (González-Pérez ve ark. 2008)

2.2.9. Vitamin C (askorbik asit)

Vitamin C (askorbik asit) suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentez edilmediğinden diyetle alınması gerekir. Organizmada kolayca

dehidroaskorbik aside oksitlenebilir. O_2^- , OH^- , singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. C vitamini kornea, lens, aköz hümör, adrenal, hipofiz, beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreasta yüksek miktarda bulunur. Yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgiller önemli C vitamini kaynaklarıdır.

C vitamini antioksidan etkisi yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH^-) oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir. (Hilmi ve ark. 2014)



Bu şekilde oluşan C vitamini radikali çok reaktif değildir, NADH tarafından indirgenir ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarını durdurur.

2.2.10. Karotenoidler

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve OH^- , alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Singlet O_2 uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid likopendir. (Akkuş 1995)

2.2.11. Ürik asit

Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit, insan dokularında urat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit singlet O_2 , peroksil radikalleri, ozon ve hipokloröz asit ($HOCl$) için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir. (Akkuş 1995)

2.2.12. Taurin

Organizmada sistein ve metiyoninden sentez edilen taurin protein yapısına katılmaz ve dokuda serbest olarak bulunur. Taurin'in safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol atılımı, osmoregülasyon, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre membranının stabilizasyonu ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi önemli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Oksidan bir bileşik olan HOCl'i N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidan hasar oluşmasını engeller. (Akkuş 1995)

Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı, albümin ise LOOH ve HOCl toplayıcısıdır. Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferröz demiri (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri, ferritin ise dokudaki demiri bağlar. Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

Ebselen selenyumlu bir bileşiktir; GSHPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder. Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler; ancak proteolitik enzimleri aktive ettikleri için zararlı da olabilirler. Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir. Desferroksamin serbest Fe^{+3} 'ü bağlar. Oksipürinol allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder. Mannitol hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir. Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan probukol'un lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır. (Akkuş 1995)

2.2.13. Melatonin

Melatonin, memelilerde başta epifiz olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Sentezinin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Oral uygulamada ilk geçiş etkisine maruz kalır. Melatonin esas olarak karaciğerde metabolize edilir ve idrar ile atılır. Melatonin özellikle Amerika'da ilaç olarak bulunabilen ve en çok 'jetlag' için kullanılan bir maddedir.

Bununla beraber, melatoninin kanseri önleyici etkileri, hücrel hasarın onarımındaki rolü ve bağışıklık sistemini destekleyici etkileri olduğu da gösterilmiştir. (el-Aziz ve ark. 2005)

Melatonin lipit çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Son çalışmalar melatoninin hücre çekirdeğinde yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir.

Melatonin güçlü bir radikal süpürücüsü olduğu gibi, radikaller üzerinde dolaylı etkilere de sahiptir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2 radikalini H_2O_2 'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir. Oksidatif hasarın rol oynadığı iskem-reperfüzyon dahil pek çok deneysel modelde melatoninin olumlu etkileri gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretiminin azalması yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde artan oksidan hasarın ve melatonin yetersizliğinin önemli rolü olduğunu göstermektedir. (Rodriguez C ve ark. 2004)

Bağırsak, böbrek, beyin, ekstremiteler ve karaciğerde yapılan I/R deneyleri gerçekte klinikte sıkça karşılaşılan dolaşım şoku, dissemine intravasküler koagülasyon ve organ cerrahileri sırasında sıkça karşılaşılan I/R hasarının taklit edildiği deney modelleridir. Bu modellerde test edilen ve geliştirilen antioksidan ajanların kliniğe uygulanması uzun süreçlere dayansa da, çeşitli patolojik durumlarda ya da cerrahi işlemlerde organ koruyucu olarak tedavi protokollerinde yer verilen pek çok antioksidan bulunmaktadır.

2.3. ÇÖREK OTU

Dünyanın ve ülkemizin hemen her yerinde yetişebilen düğün çiçeğigiller ailesinden olup 30-40 cm boyutlarında ince yapraklı otsu tarla bitkisidir. Çiçeği beyaz, açık veya koyu mavi renkli 4-5 parçalıdır. Çörek otu olarak adlandırılan siyah tohumlar bu bitkinin dallarında yetişen kapsüllerin içinde bulunur. Yüzyıllardır kullanılan çörek otu ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı son yıllarda artmaktadır. Anavatanı Doğu Akdeniz ve Güney Avrupa olan çörek otunun birçok türü mevcuttur. Türkiye'de özellikle Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde tarımı yapılan yaklaşık 12 türü mevcuttur. Bu türler geleneksel tıpta ve yaygın şekilde ise baharat olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde tarımı ağırlıklı olarak yapılan türü ise *Nigella sativa*'dır. Siyah tohumları olgunlaşınca toplanır ve kurutulur. (Baytop 1984) Birçok vitamin ve minerali içinde barındırır. Çörek otu, %21 protein, %38 karbonhidratlar ve %35 bitkisel yağlardan oluşur. Nigellon, timokinon, linoleik asit, oleik asit, palmitik asit, kalsiyum, sodyum, potasyum, demir, çinko, bakır, magnezyum, selenyum, fosfor, A, B ve C vitaminlerini içerir. (Mabrouk ve Ben Cheikh 2015)



Resim 2: Çörek otu

Nigella sativa doğal bitkisel ilaçlar sınıfında olup yüzyıllardır sağlığı destekleyici ve hastalıkların tedavisinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. (Salem 2005) Günümüzde de hala soğuk algınlığı, gaz giderici, süt arttırıcı, bağırsak kurdu düşürmek için, iltihabi hastalıklar ve egzema, romatizma gibi birçok hastalıkta halk arasında kullanılmaktadır. (Güllü ve ark. 2013)

Çörek otu üzerinde en fazla çalışma yapılan ve halen de üzerindeki çalışmalar devam eden bitkisel kaynaklı üründür. Buna rağmen etki mekanizması yeterince aydınlatılamamıştır. Belli başlı öne çıkan özellikleri; antikanserojen (Bhattacharya ve ark.

2015), antiülserojen (Abdelwahab ve ark. 2013), antibakteriyel (Bakathir ve Abbas 2011), antioksidan (Mabrouk ve Ben Cheikh 2015), antidiyabetik (Heshmati ve Namazi 2015), immunolojik etki (Sapmaz ve ark. 2015) olarak sıralanabilir.

Çörek otunun kimyasal yapısı çok zengindir. İçindeki bileşenler ise bulunduğu bölgeye, yetiştiği toprağa, sulama özelliklerine ve toplandığı mevsime göre farklılıklar gösterebilir. (Kızıl 2009) Bileşenleri arasında su (%7), protein (%23), yağ (%39), nişasta(%15), ham lif (%5,4), diyet lifi (%16) bulunmaktadır. (Nickavar ve ark. 2003) Aminoasitlerden lizin, lösin, izolosin, valin, glisin, alanin, fenilalanin, sistin, glutamik asit, aspartik asit, prolin, serin, treonin, triptofan ve tirozin, minerallerden Fe, Ca, Na, Cu, Zn, P, K, vitaminlerden askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin, folik asit içerirler. Yağ içeriği ise sabit ve uçucu yağlar olarak ayrılmaktadır, sabit yağında doymamış yağ asitlerinden oleik asit, linoleik asit, araşidonik asit, doymuş yağ asitlerinden ise palmitik asit ve stearik asit sayılabilir. Uçucu yağın yapısında ise iki görüş bildirilmiştir. Birincisi uçucu yağın çoğunlukla p-simen, γ -terpinen, α -pinen, β -pinen, α -thujen, karvakrol ve timokinondan oluştuğu (Benkaci-Ali ve ark. 2007), diğer görüşte ise uçucu yağın içeriğinde nigellon, karvakrol, p-simen, d-limonen, α ve β -pinen bunların yanı sıra farmakolojik olarak aktif temel bileşen timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol yer almaktadır. (Randhawa ve Alghamdi 2011) Çörek otu üzerine yapılan in vitro çalışmada uçucu yağın sabit yağdan daha fazla antioksidan etkili olduğu bildirilmiştir. (Sultan ve ark. 2015) Bu antioksidan özelliği ise ağırlıklı olarak timokinon varlığına bağlansa da başka bir çalışmada timokinonun yanı sıra karvakrolün de bu etkisinin varlığı bildirilmiştir. (Mahmoudvand ve ark. 2014) Çörek otunun toksisitesinin düşük oranda da olsa varlığı bildirilmiştir. (Abdel-Wahhab ve Aly 2005)

Günümüzde çörek otunun ısıya verdiği reaksiyonu araştıran çalışma sayısı hala yeterli değildir. Çörek otu uçucu yağının mikrodalga ve geleneksel fırınlarda kavurma metodlarına göre konsantrasyon değişimini inceleyen bir çalışmada, 38 adet uçucu yağ fraksiyonu tespit edilmiş bunlardan timokinon ve p-simenin en yüksek konsantrasyonda olduğu saptanmış, bu komponentlerin konsantrasyonlarının ise kavurma işlemine bağlı olarak azaldığı, pirozn ve furankların ısıya bağlı olarak aroma oluşturarak konsantrasyonun arttığı tespit edilmiştir. (Kıralan 2012) Yine aynı çalışmacının 2014 yılında yaptığı çalışmasında soğuk pres yöntemi ile elde edilen çörek otu yağının uçucu yağlarının 60°C

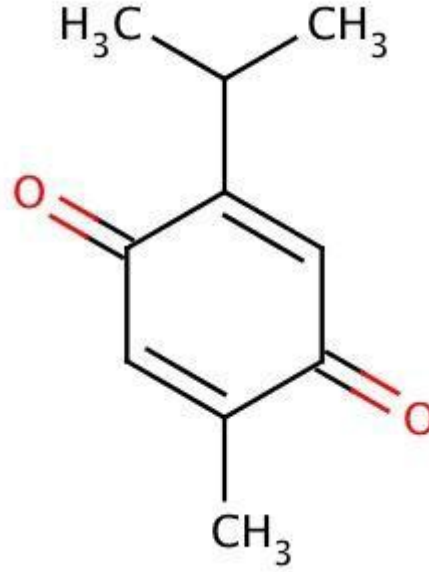
ve 100°C’de iyi oksidasyon stabilitesine sahip olduğu tespit edilirken, yüksek dozda bulunan timokinonun uygulanan koşullarda kararlılık gösterdiği bildirilmiştir. (Kıralan 2014)

Antioksidan özelliğe sahip içeriğin ayrıştırılması için uygun yöntemin seçilmesi önemli bir konudur. (Rooney ve Ryan 2005, Bourgo ve ark. 2008) Çağımızda çörek otu yağının ayrıştırılmasında ısı ile işlem, çözücü solüsyonlar ve bunlara alternatif olarak da soğuk pres yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Soğuk pres ile elde edilen yağın özelliklerinin daha kaliteli olduğu bildirilmiştir. (SA mahgoub ve ramadan 2013) Bu çalışmalar ışığında soğuk pres ile elde edilen çörek otu yağı antioksidan özelliği daha etkin ve doğal olduğu sonucuna varılabilmektedir. Çörek otunda farmakolojik fraksiyonlara sahip temel bileşenler; timokinon, dihidrotimokinon, timohidrokinin ve timol olarak bildirilmiştir. (Ghosheh ve ark. 1999)

Kılıç ve arkadaşlarına göre başlıca uçucu yağ üretim metotları, çözücü solüsyon yardımı ile süperkritik sıvı ayrıştırması, mikrodalga ile ayrıştırma, sıkıştırılmış çözücü ayrıştırması, katı faz mikro ayrıştırması ve çok yönlü ayrıştırma olarak sıralanmıştır. (Kılıç 2008) Yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre ayrıştırma yöntemi bileşiğin konsantrasyon ve kalitesini etkilemektedir.

2.3.1 TİMOKİNON

Çörek otunda bulunan temel biyoaktif bileşen olan timokinon $C_{10}H_{10}O_2$ (2-izopropil-5-metil 1,4-benzokinon) kimyasal yapısında olup antioksidan, antiinflamatuvar ve antineoplastik olarak geleneksel tedavi metotları arasında kullanılmaktadır. (Darakshshah ve ark. 2015)



Şekil 4: Timokinon

2.3.2. Timokinonun Etkileri

Çörek otu ailesinin en yaygın üretimi yapılan türü *Nigella sativa*'dan çeşitli metodlarla ayrıştırılan timokinon, birçok hastalığın tedavi sürecine destek gıda takviyesi veya bitkisel ilaç olarak kullanıldığına dair makaleler yazılmış olmasına rağmen halen etki mekanizmaları ve fayda dereceleri tamamıyla aydınlatılamamış bir şifa kaynağıdır. (Mollazadeh ve Hosseinzadeh 2014, Darakhshan ve ark. 2015, Saadat ve ark. 2015)

Timokinon üzerine yapılan yeni nesil birçok çalışmada antioksidan özelliği vurgulanmaktadır (Aydin ve ark. 2015). Oksidanlar bünyelerindeki kararsız elektronlar nedeniyle hücre membranından ve nükleik asit moleküler yapısından elektron kopararak ayrıca enzim ve proteinlere etki ederek lizis ya da apoptozisi tetikler ve ardından sistemik sonuçları olan bir yıkım başlar (Sharma ve ark. 2014). Daha önce antioksidanların çalışma mekanizmalarından bahsederken değindiğimiz çeşitli yollar ile timokinon antioksidan olarak görev yapar. Bunlar süperoksit radikal iyonu ve hidroksil radikallerini süpürücü etki (Badary ve ark. 2003) ve 5- hidroksi eikozatetraenoik asit ile 5-lipooksijenaz sentezini inhibe ederek etki ettiği bildirilmiştir (El-Dakhakhny ve ark.. 2002). Abdel-Wahap ve arkadaşlarının ratlarda bisfenol A ile oluşturdukları karaciğer hasarında, timokinonun lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmiştir (Abdel-Wahab 2014). Yine bir rat çalışmasında deneysel olarak testiküler iskemi-

reperfüzyon çalışmasında, timokinonun apoptozis, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azaltarak etki ettiği bildirilmiştir (Erboga ve ark. 2015). Radyasyon üzerine antioksidan özellikleri kıyaslanan kafeik asit (CAPE), propolis, timokinon ve çörek otu yağının iyonize radyasyonun tetiklediği kataraktı engellemede timokinonun diğerlerine göre üstün olduğu bildirilmiştir (Demir ve ark. 2015). Serebral iske mi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda timokinonun intraperitoneal uygulamasını takiben malondialdehit (MDA) seviyeleri takip edildiğinde timokinon uygulanan grupta anlamlı MDA düşük seyrettiği gözlenmesi üzerine timokinonun lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Hosseinzadeh ve ark. 2007). Siklofosamid ile oluşturulan akciğer hasarı modelinde timokinonun antiinflamatuvar ve antioksidan etki mekanizmaları ile koruyucu olduğu bildirilmiştir (Suddek ve ark. 2013). Aydın ve arkadaşlarının yaptığı deneysel ortamda abdominal aorta klemp ile iske mi reperfüzyon modelinde serumda total antioksidan status (TAS), total oksidan status (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) ayrıca uç organ (akciğer,böbrek ve karaciğer) histopatolojik incelemesinde intraperitoneal enjeksiyon ile verilen timokinonun kontrol ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (Aydın ve ark. 2015).

Çağımızın en güncel problemi olan obezite, beslenme içeriğimizde yağ oranının artmasına paralel olarak vücut yağ oranının artmasına neden olmakta ve dolayısıyla hiperlipidemi ve hiperkolesterolemi ile kendini göstermektedir. Ratlar üzerinde yapılan çalışmada yağlı diyet ile beslenen gruplardan birine oral 1mg/kg dozda çörek otu yağı eklenmiş ve 12 hafta boyunca takip edilen ratlar sonrasında kanda kolesterol, trigliserid ve şeker düzeyleri ölçüldüğünde kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hipokolesteromik etkinin antioksidan kapasitesi ve gen metabolizması üzerindeki etkiye bağlı olabileceği bildirilmiştir (Zaoui ve ark. 2002). Toplamda 200 rat üzerinde yapılan çalışmada timokinonun lipidler üzerine etkisi araştırılmış ve farklı dozlarda belirli zaman aralıklarında kan lipidlerine bakılmış, timokinonun etkisi tüm dozları için 4 gün sonra başlayıp zamana ve doza göre etkisi dalgalanma göstermiştir. 8 mg / kg dozunda toksik olduğu tespit edilmiştir. Timokinonun hipokolesterolemik etkisi yanı sıra trigliserid, HDL ve LDL üzerinde azaltıcı etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. (Bamosa ve ark. 2002)

Diyabet vücutta insülin sentezindeki yetersizlik veya reseptör düzeyinde direnç ile karakterize kanda glukoz düzeyinin optimum sınırların dışında olması ile kendini belli eden bir hastalıktır. Streptozosin (STZ) indüklediği diabetik ratlarda pankreas dokusunda oksidatif stres ile siklooksijenaz-2 (COX-2) ve hücre adezyon molekülü-1 mRNA ekspresyonu ile diyabet oluşturulan ratlarda timokinon ve çörekotu yağı eklenen gruplarda lipid peroksidasyonu malondialdehit seviyelerini ve COX-2 etkisinin azaldığı gösterilmiştir, bu da timokinon ve çörekotu yağının diyabette koruyucu olduğu göstermektedir (Al Wafai 2013). Timokinonun pankreatik beta hücre fonksiyonu üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği ve antioksidan özellikleri vasıtasıyla oksidatif stresi ortadan kaldırdığı bildirilmektedir (Sankaranarayanan ve Pari 2011). 65 mg / kg STZ intraperitoneal enjeksiyonu ile indüklenmiş diyabet oluşturulan ratlarda 50 mg / kg oral gavaj ile timokinon tedavisi diyabet indüksiyonundan 4 hafta sonra başlandı. Kan şekeri ve gliko hemoglobin (HgA1c) düzeyleri tedavi dönemleri bağlı olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, timokinonun antidiyabetik etki ve kısmen de olsa hepatik glikoneogenez bir azalmaya aracılık ettiğini göstermektedir (Fararh ve ark. 2005). HgA1c hemoglobin ile glikozun nonenzimatik reaksiyonu sonucu oluşmaktadır ve geriye dönük kan şekeri takibinde iyi bir göstergedir (Pimouguet ve ark. 2011). Streptozosinin indüklediği diabetik ratlarda pankreas β -hücrelerinde çörek otu (*Nigella sativa*) ve timokinonun biyokimyasal ve yapısal değişiklikleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada 5 gruba ayrılan ratlar 2 ml / kg intraperitoneal (ip) %5 çörek otu suyu, , 0.2 ml / kg ip. çörek otu yağı ve 3 mg / mL ip. timokinon 30 gün boyunca haftada 6 gün şeklinde verildi. Serum insülin ve glukoz konsantrasyonu, süperoksit dismutaz (SOD), pankreas dokusu malondialdehit (MDA) düzeylerine bakıldı. Elektron mikroskobu ile hücre içi değişiklikler incelendi. Bu çalışma sonucunda kontrol grubunda MDA ve serum glukozu artarken insülin ve SOD düzeyleri düşük göstermiş, tedavi edilen grupta (çörek otu suyu, yağı ve timokinon verilen ratlar) ise insülin ve SOD artış gösterirken glikoz ve MDA düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Aynı çalışmada timokinonun diğer çörek otu ürünlerinden diyabet oluşumundan korumada daha fazla anlamlı koruyuculuğu bildirilmiştir (Abdelmeguid ve ark. 2010) Çörek otunun antidiyabetik etkisi üzerinde halen çalışmalar devam etmektedir. Bu etki tam anlamıyla aydınlatılmış değildir, antidiyabetik etki insülin salınımını tetikleme dışında ekstrapankreatik eylemler ile de gerçekleştiğini bildiren yayınlar da mevcuttur (El-Dakhkhny ve ark. 2002)

Hayatın devamı ve düzeni içinde belirlenmiş hücre çoğalmasının kontrol dışına çıkması ve vücut tarafından önleminin alınmadığı durumlarda ortaya çıkan tablo kanser olarak tanımlanır. Hücre düzeyindeki bu kontrolsüz çoğalma ve farklılaşmayı gen düzeyinde bozulmalar meydana getirmektedir. Timokinon üzerinde yapılan birçok deneysel çalışma sonrası antitümoral etkisi olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar ışığında timokinon insan akciğer adenokarsinomunda (Dehghani ve ark. 2015), pankreas kanseri (Azimi ve ark. 2015), lösemi (Brown ve ark. 2014), yumurtalık kanseri (Harpole ve ark. 2014), prostat kanseri (Dirican ve ark. 2014) gibi birçok kanser çeşidinde hücre düzeyinde kontrolsüz çoğalma ve gen mutasyonlarını inhibe ederek etki gösterdiği bildirilmektedir. Timokinonun anti kanser etkisini G1/S fazı hücre döngüsünü inhibe ederek (Raghunandhakumar, Paramasivam et al. 2013) ve apoptoziste görevli olan p53 geni ekspresyonu ile kaspas enzim yolunu aktive ederek etki ettiği gösterilmiştir (Alhazmi ve ark. 2014).

Çörek otu halk arasında mide bağırsak rahatsızlıklarında da şifa aracı olarak kullanılmaktadır. Timokinonun mide koruyucu etkileri üzerine yapılan çalışmada bilinen antioksidan özellikleri olan mukin salgılanmasını ve nitrik oksit üretimini arttırırken, proton pompa, asit salgılanmasını ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek mide koruyucu mekanizmalarına sahip olduğunu göstermiştir (Magdy ve ark. 2012). Ayrıca bir diğer deneysel çalışmada timokinonun antiülser etkisinin muhtemelen prostaglandin aracılı ve antioksidan anti-sekresyon aktivitesi ile olduğu bildirilmektedir (Al Mofleh ve ark. 2008).

Timokinonun bağışıklık sistemini güçlendirdiğini bildiren yayınlar bol miktarda mevcuttur. T hücrelerini ve makrofaj hücrelerini arttırarak ve immünmodülatör etki ile immün sistemin düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmektedir (Salem 2005). Otoimmün hastalıklarda ise makrofajlarda nitrik oksit üretiminin azaltılması ile faydalı olabileceği ileri sürülmektedir (El-Mahmoudy ve ark. 2002).

Çörek otu ve ekstreleri geleneksel olarak astım ve inflamatuvar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. İnflamasyon mekanizması hücre düzeyinde siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz olmak üzere iki enzim sistemi üzerinden etkili olmaktadır. COX yolu ile prostaglandinler sentezlenirken lipooksijenaz yolu ile lökotrienler (LT) sentezlenir bunlar alerji ve inflamasyonda görev görev alır. Timokinon bu iki enzim sisteminin

zamana ve doza bağımlı olarak inhibisyonu ile antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (Mansour ve Tornhamre 2004).

Nigella sativa tohumları ve timokinon geniş terapötik etkilere sahiptir. Örneğin Gram(-/+) bakteriler, virüsler, parazitler, mantarlar ve şistozomiyazlar üzerinde geniş bir antimikrobiyal spektrumu vardır. *N. sativa* tohum ve timokinonun etkinliği değişkendir ve hedef mikroorganizma türüne bağlıdır (Forouzanfar ve ark. 2014). Kapan ve arkadaşları, mekanik bağırsak tıkanıklığı tarafından uyarılan bakteriyel translokasyon ve inflamatuvar yanıt karşısında timokinon etkinliğini araştırdıkları deneysel çalışmada, bağırsak tıkanıklığı yapılan ratlarda timokinon verilen grupta inflamatuvar sitokinler, oksidatif hasarı ve bakteriyel translokasyon salgılanmasını azalttığı, bağırsak ve karaciğerde inflamatuvar değişiklikleri engellediği ve mukozanın remodelinginde faydalı olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Timokinonun başarıyla bakteriyel translokasyonu kontrol ettiği ve bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir (Kapan ve ark. 2012).

Kurşun zehirlenmesi kaynaklı beyin hasarı oluşturulan ratlarda timokinon etkisinin araştırıldığı deneysel çalışmada, kurşunun beyin üzerindeki hasarını timokinonun azalttığı bildirilmektedir (Radad ve ark. 2014). Ratlarda prenatal kortikal nöronlarda etanolün toksik etkisine karşı metformin ve timokinonun etkisinin araştırıldığı çalışmada metformin ve timokinonun etanol nörotoksitesini iyileştirmek için potansiyele sahip olduğu ve erken beyin gelişimi sırasında etanolün zararlı etkileri için olası bir koruyucu olduğu ileri sürülmektedir (Ullah ve ark. 2012).

Timokinonun ayrıca solunum sistemi (El Mezayen ve ark. 2006), dolaşım sistemi (el Tahir ve ark. 1993) ve karaciğer (Mollazadeh ve Hosseinzadeh 2014) üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkileri de birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile bildirilmektedir.

Literatür taramasında çörek otu ve ekstraktları ile ilgili toksik etkileri üzerine yayınlanmış pek fazla yazı bulunmamaktadır. Yaptıkları deneysel rat çalışmasında hiçbir toksik ölüm olmamasına rağmen, ratlarda çörek otu için akut toksisite LD₅₀ değerini oral uygulama için 28,8 ml/kg, intraperitoneal uygulama için 2,06 ml/kg, kronik toksisite LD₅₀ değerini 2 ml/kg/12 hafta oral olarak bildirilmiştir (Zaoui ve ark. 2002). Çalışma sonucunda karaciğer enzim düzeylerinde ve histopatolojide kontrol grubuna göre fark

olmamakla beraber serum kolesterol, şeker düzeyleri ile lökosit ve trombosit sayılarında düşüş, hemotokrit ve hemoglobin düzeylerinde ise belirgin artış olduğu gözlenmiştir. Badary ve arkadaşlarının çalışmasında ise timokinonun akut oral toksisitesinin düşük seviyelerde olduğu, subkronik olarak verildiğinde ise hücre içi koruyucu akitviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Badary oa ve ark. 1998). Karbon tetraklorürün indüklediği karaciğer hasarında timokinonun çeşitli dozlarda etkinliğinin ve koruyuculuğunun araştırıldığı çalışmada timokinon için LD₅₀ değeri 90 mg/kg olarak raporlanmış, bu çalışmada karaciğer hasarında koruyucu olduğu fakat yüksek dozlarda karaciğerde yaralanmaya yol açan oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur (Mansour ve ark. 2001). Yine başka bir çalışmada timokinonun 8 mg/kg (ip) uygulandığında toksik olduğu bildirilmiştir (Bamosa ve ark. 2002). Timokinon için intraperitoneal enjeksiyonun ardından farelerde LD₅₀ değerinin 104.7 mg / kg (89,7-119,7, % 95 güven aralığı) olduğu, oral yolla ise 870,9 mg / kg (647,1-1094,8, % 95 güven aralığı) olduğu bildirilmiştir. Anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-kanser etkilerinin gözlemlendiği tedavi dozlarının, intraperitoneal enjeksiyon için 10-15 kat ve oral yol için ise 100-150 katı letal doz olarak bildirilmiştir. Timokinon deney hayvanlarında güvenli bir bileşiktir (Al-Ali ve ark. 2008).

2.4. GİNSENG EKSTRESİ (PANAX);

Başta Asya olmak üzere birçok yerde geleneksel tıpta şifa kaynağı olarak kullanılan ginseng, ismini kökünün insan figürüne benzemesi ile alan uzun ömürlü bir bitkidir. Basit, dallanması olmayan bir kök ve kökten dik olarak çıkan boyutları 4-15 cm, yaprakları ise 2-6,5 cm genişliğinde olabilen eliptik ya da ters dönmüş yumurta şeklinde geniş olan ve gövdede dairesel biçimde dizilim gösteren, ilkbaharda çiçeklenen sonbahara doğru kırmızı, hafif sulu küçük bir meyvesi uç kısmında yetişen bir bitkidir. Eski dönemlerde yemeklerde baharat malzemesi olarak kullanılan ve zamanla birçok hastalıkta iyileşmeye neden olduğu anlaşılması üzerine geleneksel bitkisel tıpta yerini alan bir şifa kaynağıdır.

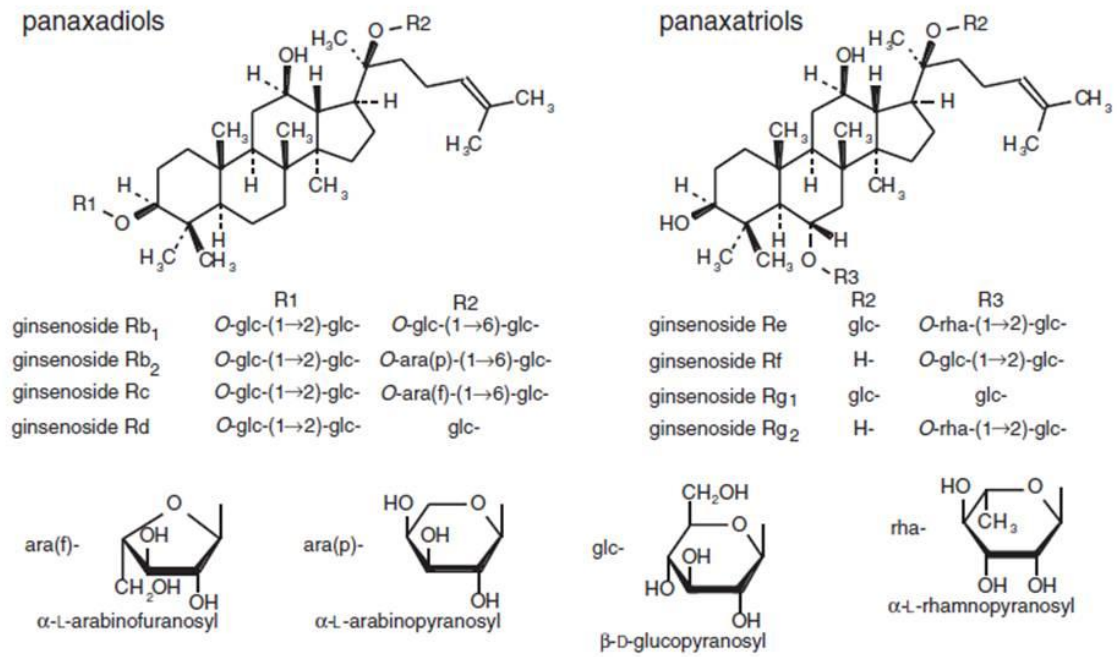


Resim 3: Ginseng

Ginsengin mikrokimyasal analizinde, ince tabaka kromatografisi ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizi yapıldığında, ginsengin karakteristik saponini olan Ginsenosit Rg1(D-glukopiranosil-6-glukopiranosil-

20S-protopanaxatriol, [molekül kütlesi 800]) en az % 1.5 oranında olduğu hesaplanmıştır (Tan ve ark. 2010).

Ana kimyasal bileşenleri triterpen saponinleridir. Triterpen saponinler 30'dan fazla dammarane yapısını esas alır ve bir oleanolik asitten (ginsenoside Ro) elde edilir (Shibata ve ark. 1985, Jia 1995). Dammarene saponinler protopanaxadiol ya da protopanaxatriol türevleridir. Ginsenoitlerin ilk üyeleri Ra1 3, Rb1 3, Re, Rc2, Rd, Rd2 ve Rh2; (20S) RG3 -ginsenosit; ve malonil ginsenositler Rb1, Rb2, Rc ve Rd'dir. Protopanaxatriol saponinlere örnekler ginsenositler Re2, RE3, Rf, Rg1, RG2 ve RH1'dir. 20-gluko-ginsenosit Rf olduğu ve (20R) RG2 ve RH1 -ginsenositlerdir. En önemli düşünülen ginsenositler Rb1, Rb2, Re, Rd, Rf, Rg1 ve RG2 vardır; Rb1, Rb2, ve Rg1 en bol miktarda bulunmaktadır.



Şekil 5: Dammanare saponinlerin yapısı (WHO 2004)

Ginseng halsizlik, bitkinlik, yorgunluk ve konsantrasyon kaybı durumlarında, zihinsel ve fiziksel kapasitelerin geliştirilmesine yönelik profilaktik ve restoratif madde olarak iyileşme sırasında kullanılmaktadır (Sun ve ark. 2014). Ginseng ve ekstraktları son dönemlerde birçok çalışmada incelenmiş ve hastalıkların tedavisinde etkin olduğuna dair ciddi iddialar mevcuttur. Antioksidan ve antiapoptotik etki (Wang ve ark. 2015),

antidiyabetik (Shishtar ve ark. 2014), erektil disfonksiyon tedavisinde (ve ark. 2015), anti-kanser (Kim ve ark. 2015), nörolojik hastalıklarda koruyucu (Paik ve ark. 2015) etkileri literatürde son yıllarda fazlaca yer almaktadır.

Ginseng deneysel modellerde iki yönden önerilmektedir. İlk olarak, eksojen stres faktörleri ve zararlı kimyasallara karşı savunma amaçlı vücudun spesifik olmayan "adaptojenik" etkisini artırma etkisine sahiptir (Sonnenborn ve ark. 1991). İkincisi, fiziksel ve zihinsel performansta genel iyileşme arttırmaya teşvik şeklinde kullanımı önerilmektedir (Wagner ve ark. 1994). Laboratuvar ortamında gelişmiş organizmalarda (fare, sıçan vb.) yapılan deneysel modellerde ginseng ve alt ürünlerinin radyasyon zehirlenmesinde (Jang ve ark. 2015), alkol veya tetraklorür zehirlenmesinde (Han ve ark. 2015), bağışıklık sistemi üzerine (Lin ve ark. 2015) koruyucu olduğu bildirilmektedir.

Ginseng üzerine son yıllarda yapılan klinik çalışmalar oldukça kadar çoktur. Ginseng kullanarak 11 denizci üzerinde performans artırıcı etkiyi değerlendirme amaçlı çift kör çalışmada bir gruba dört hafta boyunca 2 gr ginseng, diğer gruba ise plasebo verilmiş sonrasında kilo takibi, hormon üretimi, metabolizma hızları karşılaştırılmış fakat anlamlı fark elde edilememiştir. Çalışmacılar bunu değerlendirme kriterlerinin yetersizliğine ve kullanılan ginseng ekstrelerinin bir standarta sahip olamamasına bağlamışlardır (Knapik ve ark. 1983). Diğer bir randomize, çift kör çalışma 50 erkek (21-47 yaş) kardiyopulmoner egzersiz sırasında dolaşım, solunum ve metabolik fonksiyonları üzerine ginseng etkileri araştırıldı. Toplam iş yüküne dayanıklılık ve maksimal oksijen alımı plaseboya göre ginseng uygulamasını takiben anlamlı derecede yüksek bulundu (Pieralisi ve ark. 1991). Kim ve arkadaşlarının idiyopatik kronik yorgunluk tanısı almış 90 denekte (21 erkek, 69 kadın) randomize, çift kör çalışmada bir gruba plasebo diğer gruba günlük 1 gr veya 2 gr ginseng verilmiş. Dört hafta boyunca yorgunluk (bıkkınlık) ciddiye skalası, görsel analog skalası ile sınıflanmışlar. Ayrıca serumda Reaktif oksijen türlerinin (ROS), malondialdehit (MDA), toplam glutatyon (GSH) içerikleri ve glutatyon redüktaz serum seviyeleri (GSH-R) aktivitesi takip edilmiş. Çalışma sonucunda, 4 hafta sonunda yorgunluk (bıkkınlık) ciddiye skalası azalmış fakat plaseboya göre anlamlı olmadığı, zihinsel yorgunluk (bıkkınlık) ciddiye skalası ise plaseboya göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ginseng grubunda anlamlı olmasa da ROS ve MDA düşük bulunmuştur yani

ginseng kronik yorgunluk sendromunda pozitif etki yapmaktadır sonucuna varmışlardır (Kim ve ark. 2013).

Ginseng ekstrelerinin kullanımının antioksidan etkileri de literatürde sıklıkla bildirilmektedir. Ratlarda spinal kord yaralanması üzerine ginsengin koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan durumunu değerlendirmek için, TAS, TOS, lipid peroksidasyonu, myeloparaksidaz aktiviteleri takip edilmiş ve çalışma sonucunda ise ginsengin önemli ölçüde oksidatif stresi ve inflamasyonu kontrol altına alarak iyileşmede pozitif etkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark. 2015).

In vitro ve in vivo çalışmalar ile ilgili veriler Ginseng saponinlerin (ginsenositler) osteoporoz tedavisinde yararlı etkilere sahip olduğunu, kemik iliği stromal hücreleri ve ön osteoblast hücrelerinin osteogenezini artırabileceğini göstermektedir (Siddiqi ve ark. 2013)

Bitkisel ilaçlar, Asya ülkelerinde geleneksel diyabet tedavisinde önemli bir rol oynamıştır. Tianqi veya sanqi olarak bilinen ginseng Çin tıbbında kullanımı uzun, tarihi bir şifalı bitkidir. 'Hayatın korunması için mucize kök olarak nitelendirilen, çeşitli hastalıkların tedavisi için, 600 yıldır Çin'de kullanılmıştır. Son zamanlarda, ginsengin hipoglisemik, anti-obezite özellikleri de gösterilmiştir. Ginsengin antidiyabetik etkisi üzerine yapılan derlemede antidiyabetik üzerine etkisi Rb1 ve RG1 gibi beş ana bileşenleri arasında glukoz ile uyarılmış insülin salgılanmasını teşvik etmek ve trigliserid birikimini azaltmak olarak bildirilmiştir (Uzayisenga ve ark. 2014).

Shergis ve arkadaşlarının (2013) ginseng üzerine literatürde mevcut olan çalışmaları değerlendirerek yaptıkları derlemede, ginsengin sözde birçok ortak sağlık faydaları olan bir bitki olduğu, ancak, herhangi bir hastalığın tedavisinde kullanımını destekleyen hiçbir kesin kanıt olmadığını gözlemlemişlerdir. Randomize kontrollü çalışmaları değerlendirmek için sistematik bir inceleme yapılan dört veritabanı hiçbir yayın tarihi kısıtlaması olmadan yapılan araştırmada, Cochrane analiz metodunu kullanarak çalışmaların kalitesini değerlendirdi. 475 potansiyel olarak ilgili çalışmada, 65'i dahil edilme kriterlerini karşıladı. Bu çalışmalar psikomotor performans (17 çalışma), fiziksel performans (10 çalışma), dolaşım sistemi (8 çalışma), glukoz metabolizması (6 çalışma), solunum sistemi (5 çalışma), erektil disfonksiyon (4 çalışma), immünomodülasyon P. Ginsengin etkileri (4 çalışma), hayat kalitesi (4 çalışma), antioksidan işlevi (2 çalışma),

kanser (2 çalışma), menopoz semptomları (2 çalışma) ve ağız diş sağlığı (1 çalışma) incelenmiştir, yanlılık riski bir çok çalışmada belli değildi. Bu literatür taraması sonrası en umut verici sonuçların glukoz metabolizması, immün sistem üzerine koruyucu ve destekleyici etkisinin olduğu bulunmuş, gelecek çalışmalarda ise bu konu üzerine yoğunlaşılmasını tavsiye etmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından beş farklı hayvan modellerinde bilinen toksikolojik yöntemler kullanılarak ginseng özleri incelenmiş, akut ya da kronik bir toksisite rapor etmemişlerdir (Sonnenborn ve ark. 1992). Siegel'in (1979) 133 hastanın takip edildiği çalışmasında çok miktarda ginseng tüketildiğinde hipertansiyon, sinirlilik, ishal, deri döküntüleri ve uykusuzluk gibi haller bildirilmiştir. Ginseng için ciddi bir yan etki bildirilmemiştir.

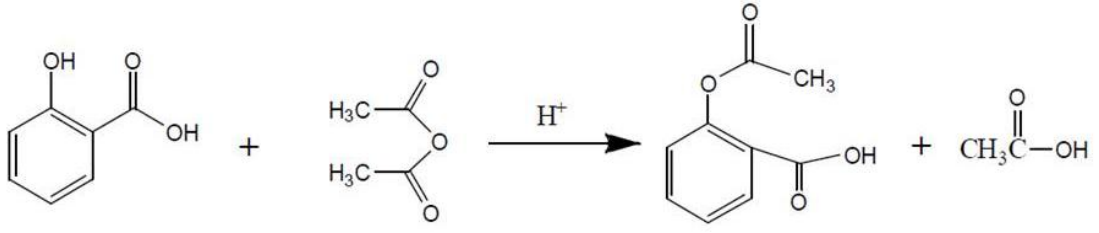
2.5. ASETİLSALİSİLİK ASİT (ASPIRİN);

Salisilik asit bir cins söğüt ağacının bitki özünde, keklik üzümü yağında, keçisakalı bitkisinin çiçeklerinde doğal halde bulunur. Keşfedildiği günden itibaren insan hayatında ve tıp literatüründe geniş yer bulan ve her geçen gün ayrı bir faydası bildirilen aspirin bilinenin aksine 3500 yıllık bir tarihe sahiptir. Tıp tarihçileri 1897 yılını aspirinin keşfi olarak tanımlasalar da M.Ö. 2.yüzyılda ağrılara iyi gelen mersin ağacı yapraklarının ağrılı bölgeye sarılmasını tavsiye etmişlerdir. Hipokrat ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak söğüt ağacı kabuğundan elde edilen ekstrelerin suda alınmasını tavsiye etmiştir. Sonraları halk arasında da söğüt ağacının kabuğu kaynatılarak şifacılar tarafından ağrı kesici olarak kullanıldığı dikkati çekmektedir (Lafont 2007). Söğüt ağacındaki etkin madde salisilik asit idi.1763'te salisilik asit söğütten elde edildi fakat tadı acı ve yan etkisi fazlaydı. Dr. Hofman salisilik asiti asetilsalisilik asite çevirdi bunu takiben iki yıl sonra modern manada aspirin üretilmeye başlandı (Vane 1971).



Resim 4: Aspirin

Aspirinin kimyasal ismi asetil salisilik asittir, fenolik hidroksil grubunun asetillenmesi ile meydana gelir.



Şekil 6: Asetil salisilik asit kimyasal yapısı.

Aspirin analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkileri olan ve günümüzde dünyada en sık tüketilen ilaç olarak bilinir. Etki mekanizması ise prostoglandin ve tromboksan üretiminin inhibisyonu ile olmaktadır (Vane ve ark. 2003). Prostoglandin-H sentetaz olarak bilinen ve araşidonik asitin prostoglandinlere dönüşümünü sağlayan enzimin, aspirin tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (Robinson 1983 , Levy 1997). Ayrıca kinaz ve protein kinazın indüklediği mitojen aktiviteyi salisilat tarafından uyarılan p38 ile inhibe ederek de etki ettiği gözlemlenmiştir. Nükleer transkripsiyon faktörü kapp B (NF-kB) ya da aktivatör protein 1 (AP-1) gibi çeşitli nükleer transkripsiyon kinazlarını inhibe ederek de salisilatlar etkili olabilir (Amann ve ark. 2002).

Aspirinin klinik kullanımında düşük dozlarda kalp krizi ve serebro vasküler olay riskini azalttığı (Schoenberger 1987), yüksek dozlarda kullanıldığında ise (günde 4-8 g) romatizmal ateş, gut hastalığı ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıkları azalttığı bildirilmiştir (Vane JR and RM 2003). Preeklempsi'yi önlemede etkili olan nadir ilaçlar arasında gösterilmektedir (Bartsch ve ark. 2015).

Aspirinin reaktif oksijen türleri hidroksil radikalleri (OH[•]), süperoksit radikalleri (O₂^{•-}) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) radikalleri ile reaksiyonunu incelemek için yapılan çalışmada elektron dönme rezonansı kullanılmıştır. Fenton reaksiyonu OH[•] radikallerinin bir kaynağı olarak kullanılmıştır. Aspirinin OH[•] radikalini temizleme etkisi askorbat, glutatyon ve sistein gibi iyi bilinen antioksidanlardan daha hızlı olarak bulunmuştur. Ancak aspirinin O₂^{•-} veya H₂O₂ için diğerlerine göre iyi bir temizleyici olmadığı bildirilmiştir. Antioksidan özelliği sayesinde, aspirin lipid peroksidasyonu ve DNA zincir kırılmaya karşı koruyucu bir etki göstermiştir. Sonuçlar OH[•] radikallerini temizleme kabiliyeti aracılığıyla bir antioksidan olarak aspirinin fonksiyonlarını gösterir (Shi ve ark. 1999). Son zamanlarda

Stone ve arkadaşları (2014) kolon kanserini önlemede antioksidanların koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada aspirinin antioksidan etki ile kolon kanserinde koruyucu olduğunu bildirmişlerdir.

Koroner arter hastalığı genetik yatkınlık, diyabet, hipertansiyon ve çevresel faktörler gibi durumlar ile etkilenen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Aspirin, prototip antiplatelet ajan olarak kovalent bağ ile geri dönüşümsüz olarak siklooksijenaz (COX) enzimine bağlanır ve böylece trombositin tromboksan sentezini inhibe eder. Ayrıca immun genlerin transkripsiyonunu düzenleme yeteneği antioksidan özelliği olarak ifade edilir. Bu özellikleri ile koroner arter hastalığında koruyucu etkiye sahiptir (Maree ve ark. 2004). Aspirinin tedavi edebilen optimum dozunu bulmayı hedefleyen bir çalışmada, farklı doz yanıt ilişkileri ile antioksidan ve antiinflamatuvar mekanizmalar kardiyovasküler hastalıklarda aspirinin klinik etkisine katkıda bulunabilir fakat optimal aspirin dozu halen belirsizliğini korumaktadır. 81 mg/gün ile 325 mg/gün dozlarında uygulamaları incelediklerinde yüksek doz aspirin daha faydalıdır sonucuna varılamamıştır. İskemik kalp hastalığı olan hastalar için, genel uzlaşma 75- 160 mg / gün arasında miyokard infarktüsü, inme gibi vasküler kaynaklı ölümlerde koruma sağladığı, buna karşın görülen en önemli yan etkisi gastrointestinal kanama riskinin artması olmuştur. Bazı hastalarda trombositler aspirin ile bloke olmayan yollar ile aktive edilebilir ve tam olarak platelet toplanmasını bastırmak için gerekli olan aspirin dozu yüksek olabilir. Aspirin dirençli popülasyonların daha iyi anlaşılması, yüksek aspirin dozlar veya antiplatelet tedavinin alternatif formlarını gerektirir. Bu çalışma ile dirençli popülasyonların tespiti, “tedavi protokolü oluşturmayı kolaylaştıracaktır” şeklinde öneride bulunmaktadırlar (Kong 2004).

Aspirinin toksik etkileri karmaşıktır. Salisilatın başlıca toksik olma nedeni aşırı dozda alınması iledir. Toksik dozda alındığında solunum merkezinin uyarılması, sitrik asit döngüsü (karbonhidrat metabolizması) inhibisyonu, lipid metabolizması uyarılması, aminoasit metabolizması inhibisyonu ve oksidatif fosforilasyon bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda da solunumsal alkaloz, metabolik asidoz, su ve elektrolit kaybı ortaya çıkar. Santral sinir sistemi toksisitesi (kulak çınlaması, işitme kaybı, konfüzyon ve koma dahil), hipoprotrombinemi ve non-kardiyojenik pulmoner ödem gibi bazı durumlar meydana gelebilir (O'Malley 2007). Hücrel metabolizma etkilendiğinden tüm dokular etkilenir, ancak özellikle karaciğer, böbrekler, akciğerler ve sekizinci kranial sinir dikkati

eker. Zehirlenme sonrası bulantı, kusma, epigastrik rahatsızlık, gastrointestinal (genelde akut zehirlenmede nadiren ve kronik ile birlikte) kanama; takipne ve hiperapne; kulak çınlaması, sağırlık, terleme, vazodilatasyon, hiperpireksi (nadir), dehidratasyon; sinirlilik, titreme, görme, subkonjonktival kanamalar ve bulanıklık gibi semptomlar ile kendini belli eder (WHO 2005).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 35 adet ortalama 200-250 gr ağırlıkta, sağlıklı Wistar Albino cinsi erkek yetişkin rat kullanılmıştır. Yürütülen proje ile ilgili olarak Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 2014/40 nolu karar sayısı ile oy birliğiyle onay alınmıştır. Çalışmaya başlamadan önce 2 hafta boyunca laboratuvarında habitüe edildi.

Tüm gruplar klima kontrollü odada, 24±1 C° sıcaklıkta ve %60 nemde barındırıldı. Deney Dicle Üniversitesi Sağlık Araştırmaları Merkezi hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi, şehir içme suyu ve timokinon grubu hariç diğer her bir gruba karşılaştırılacak ilgili madde oral olarak diyetine eklendi, timokinon ise cerrahi işlem günü intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Gruplarda Aspirin (Bayer, Türkiye) , Timokinon (Sigma, St. Louis) , Ginseng (Kibarlı, Türkiye) ve anestetik olarak da tüm gruplarda Ketamin hidroklorür (Pfizer, Türkiye) kullanılmıştır. Ratlar randomize şekilde 5 gruba bölünerek, deney sonuna kadar yedışerli kafeslerde tutuldu.

Gruplar aşağıdaki şekilde planlanmıştır:

Grup 1 (Kontrol grubu): Laparotomi öncesi 0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür ile anestezi uygulandı. Laparotomi sonrası aort 30 dk kleplendi ve sonra 2 saat reperfüze edilerek kalpten 5cc kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Kanlar 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak -20 C° 'de analiz aşamasına kadar saklandı.

Grup 2 (Sham grubu): Anestezi (0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür) ile laparotomi sonrası kalpten 5cc kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Kanlar 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak -20 C° 'de analiz aşamasına kadar saklandı.

Grup 3: Dört hafta boyunca oral gavaj yoluyla 150 mg/kg/gün Ginseng ekstresi verilen gruba cerrahi işlem günü laparotomi öncesi 0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür ile anestezi uygulandı. Laparotomi sonrası aort 30 dk kleplendi ve sonra 2 saat reperfüze edilerek kalpten 5cc kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Kanlar 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak -20 C° 'de analiz aşamasına kadar saklandı.

Grup 4: Dört hafta boyunca oral gavaj yoluyla 30 mg/kg/gün Antiagregan (asetil salisilik asit) verilen gruba cerrahi işlem günü laparotomi öncesi 0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür ile anestezi uygulandı. Laparotomi sonrası aort 30 dk kleplendi ve sonra 2 saat reperfüze

edilerek kalpten 5cc kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Kanlar 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak -20 C  'de analiz aşamasına kadar saklandı.

Grup 5: Laparotomi  ncesi 0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür ile anestezi uygulandı. Laparotomi sonrası aort 30 dk kleplendi, reperfüzyondan 5 dk önce intraperitoneal yolla 20 mg/kg Timokinon uygulandı. Timokinon uygulama öncesi üretici firmanın öngördüğü şekilde dimetil sülfoksit içinde üzülmüŐtür. Ardından 2 saat reperfüze edilerek kalpten 5cc kan alınarak biyokimya tüpüne konuldu. Kanlar 10,000 rpm' 5 dk santrifüj edildikten sonra serum ayrılarak -20 C  'de analiz aşamasına kadar saklandı.



Resim 5: Hayvan deneyi sırasında genel görüntüler

Tüm gruplardan alınan serum  rnekleri -20 C  'de saklandıktan sonra soğuk zincir bozulmadan  rnekler Mustafa Kemal Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarında total antioksidan status (TAS), total oksidan status (TOS) bakıldı ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplanarak sonuÇlar istatistiksel olarak analiz edildi.



Resim 6: Ratların oral gavaj ile beslenmesi

3.1.Cerrahi prosedür:

Dört hafta boyunca doğal ortamlarına en yakın şartlar sağlanan ratlar, deney günü kafeslerinden alınarak cerrahi odasına alındı. Gerekli steril ortam hazırlandıktan sonra intraperitoneal olarak her bir rat için 0,2 ml/100 gr ketamin hidroklorür uygulanarak anestezi sağlandı (A). Laparotomi öncesi traş ve alkol ile dezenfeksiyon işlemi yapılarak medial laparotomi yapıldı (B). Batın içi organlar düzenli bir şekilde kenara itilerek retroperitoneal alana ulaşıldı ve abdominal aort eksplere edildi (C). İnfrarenal seviyeden abdominal aort plastik buldog yardımı ile klempe edildi (D). Klempe 30 dk boyunca kalarak iskemi ortamı oluşturuldu ardından ise buldog klempe kaldırılarak 2 saat boyunca reperfüze olması sağlandı (E). Tüm ratlar deney sonunda göğüs kafesi açılarak kalpten direkt yaklaşık 5 cc kan alınarak sakrifiye edildi (F). Bu alınan kanlar sarı biyokimya tüplerine rat numarası üzerine işaretlenerek ayrıldı. Sonrasında tüm biyokimya tüpleri santrifüj cihazına yerleştirilerek 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından serum kısmı ayrı bir tüpe alınarak -20 C° 'de biyokimyasal analiz aşamasına kadar saklandı.



Resim 7: Cerrahi sürecin izlenmesi

3.2. Biyokimyasal Analiz

3.2.1.Total Antioksidan Status(TAS);(Erel 2004)

Bu ölçüm yöntemi 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonik asit radikali (ABTS kökü) tarafından sağlanmaktadır. Bu metodun prensibi hidrojen peroksit varlığında hidroksil radikalleri tarafından ABTS kökünün ABTS⁺ radikale okside olarak renk değişiminin ölçülmesidir. Ortamdaki antioksidan ve oksidan miktarına göre mavi- yeşil renkte açılma ve koyulaşma gözlemlenmektedir. Bu renk değişikliği 660 nm emilim eşliğinde ölçümlenir. Renk değişimi ile antioksidan kapasite arasında ters ilişki mevcuttur. Bu çalışma %3'ten düşük mükemmel hassas değerlere sahiptir. Ölçümün sonuçları mmol/L olarak birimlendirilmiştir.

3.2.2. Total Oksidan Status (TOS);(Erel 2005)

Erel tarafından tanımlanan bu yöntemde oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçümünün otomatik cihazlar yardımı ile oksidan kapasitenin hesaplandığı bir ölçüm yöntemidir. Sonuçları umol /L olarak birimlendirilmektedir.

3.2.3. Oksidatif Stress İndeksi (OSI);

TOS/TAS şeklinde bölünerek Oksidatif stres indeksi hesaplandı. Ölçümün sonuçları (TOS/[TASx1000]x100 nmol/L olarak birimlendirilmiştir. Elde edilen ham sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

	TOS(umol/l)	TAS (mmol/l)	OSİ (TOS/[TASx1000]x100)
A1(kontrol)	12,775	1,692	0,755
A2(kontrol)	15,621	1,362	1,146
A3(kontrol)	24,917	1,561	1,596
A4(kontrol)	17,186	1,457	1,179
A5(kontrol)	19,699	1,626	1,211
A6(kontrol)	20,563	1,599	1,285
A7(kontrol)	19,528	1,554	1,256
B1(sham)	12,016	1,142	1,052
B2(sham)	9,656	1,318	0,732
B3(sham)	45,51	2,266	1,988
B4(sham)	35,806	1,541	2,323
B5(sham)	14,133	1,281	1,103
B6(sham)	35,338	1,658	2,131
B7(sham)	12,922	1,418	0,911
C1(Ginseng)	15,88	1,37	1,159
C2(Ginseng)	19,683	1,277	1,541
C3(Ginseng)	30,613	1,803	1,697
C4(Ginseng)	23,826	1,217	1,957
C5(Ginseng)	24,037	1,476	1,628
C6(Ginseng)	24,79	1,542	1,607
C7(Ginseng)	22,673	1,382	1,64
D1(ASA)	13,061	1,451	0,9
D2(ASA)	15,72	1,433	1,096
D3(ASA)	11,699	1,329	0,88
D4(ASA)	21,496	1,401	1,534
D5(ASA)	28,283	1,508	1,875
D6(ASA)	23,185	1,481	1,565
D7(ASA)	12,232	1,368	0,894
E1(Timokinon)	7,535	1,79	0,42
E2(Timokinon)	8,536	1,65	0,517
E3(Timokinon)	10,065	1,97	0,51
E4(Timokinon)	15,023	1,68	0,894
E5(Timokinon)	14,023	1,72	0,815
E6(Timokinon)	11,184	1,24	0,901
E7(Timokinon)	14,076	1,34	1,05

Tablo 1: TOS-TAS ve OSI ham değerleri

3.3. İstatiksel analiz

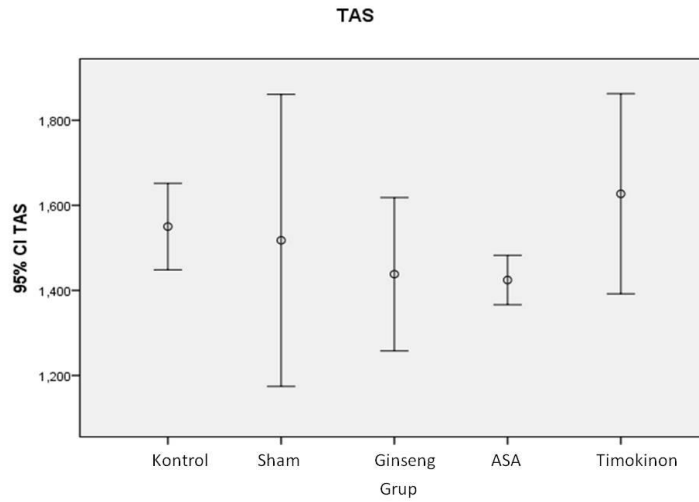
Bu bulgular ışığında yapılan istatistiksel analiz SPSS 11,5 (Windows SPSS 11,5 Chicago) kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm SD (Standart sapma) ve yüzde olarak sunulmuştur. Sürekli değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi ve tüm değişkenlerin anormal dağıldığı belirtilmiştir. Bu nedenle, parametrik olmayan bağımsız grup karşılaştırmaları yapılmıştır: çoklu karşılaştırmalar için, Kruskal Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

İskemi-reperfüzyonun oksidatif etkisini değerlendirdiğimiz kontrol grubunda TOS düzeyleri $18,18 \pm 4,18$ $\mu\text{mol/L}$, TAS düzeyleri $1,55 \pm 0,10$ mmol/L ve OSI düzeyleri $1,52 \pm 0,58$ olarak saptandı. Laparotominin oksidatif etkisini araştırmak üzere dizayn edilen sham grubunda ise TOS düzeyleri $15,34 \pm 4,68$ $\mu\text{mol/L}$, TAS düzeyleri $1,51 \pm 0,37$ mmol/L ve OSI düzeyleri $1,99 \pm 1,45$ olarak saptandı. Bu durum iskemi-reperfüzyonun tek başına oksidatif stresi laparotomiden daha çok etkilediğini düşündürdü.

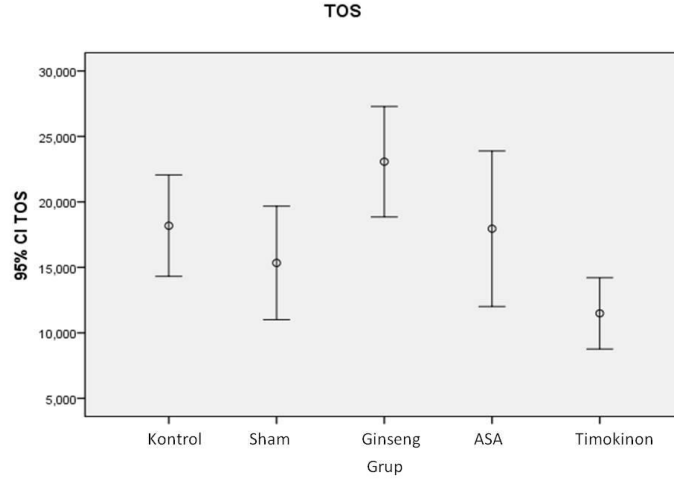
Çalışma gruplarında antioksidan kapasite (TAS) sırasıyla $1,43 \pm 0,19$ mmol/L (ginseng), $1,42 \pm 0,60$ mmol/L (ASA) ve $1,62 \pm 0,25$ mmol/L (timokinon) olarak saptandı. TAS değerlerinin kontrol grubu ile ASA grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu saptandı ($p=0,035$). Ancak diğer gruplar arasında antioksidan kapasite açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). Gruplar arasındaki TAS düzeylerinin karşılaştırılması şekilde gösterilmiştir.



Şekil 7: TAS dağılımı

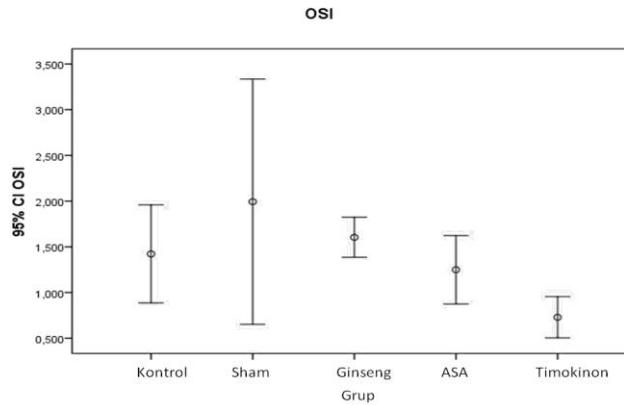
TOS seviyeleri ginseng grubunda $23,07 \pm 4,55$ $\mu\text{mol/L}$, ASA grubunda $17,95 \pm 6,42$ $\mu\text{mol/L}$, timokinon grubunda ise $11,49 \pm 2,94$ $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı. Ginseng grubunda beklenmedik şekilde yüksek saptanan TOS düzeyleri bu maddenin farklı hasat dönemlerinde, farklı etkinlik gösterebileceğini düşündürdü. Özellikle sham grubuna oranla ginseng grubunda anlamlı oksidatif stres artışı izlendi ($p=0,009$). ASA grubunda kısmi TOS düşüklüğü saptanmasına karşın bu düzeyler sham ve kontrol grubuna göre anlamlı değildi ($p>0,05$). Timokinon grubundaki düşük TOS seviyeleri ise iskemi-reperfüzyon

oluşturulan kontrol grubu ($p=0.013$), çalışma grubu olarak tasarlanan ginseng grubu ($p=0.002$) ve ASA grubuna ($p=0,048$) göre anlamlı izlendi. Bu farklılıklar şekilde şematize edildi.



Şekil 8: Tos dağılımı

OSI düzeyleri ise çalışma gruplarında sırasıyla $1,60\pm0,23$ (ginseng), $1,24\pm0,40$ (ASA) ve $0,72\pm0,24$ (timokinon) olarak saptandı. Timokinon grubunda en düşük OSI seviyeleri saptanırken bu fark kontrol ($p=0,009$), sham ($p=0,013$), ginseng ($p=0,002$) ve ASA ($p=0,030$) gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlıydı. ASA grubunda saptanan OSI düzeyleri ise ginseng grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü ($p=0,048$). Ginseng grubundaki beklenmedik OSI yüksekliği ginseng ekstraktlarının zararlı etkilerinden çok dönemsel etkilerine bağlı olarak yorumlandı. OSI düzeylerinin gruplar arasındaki farklılıkları Tablo 2-3 de özetlenmiştir ve şekilde dağılımları gösterilmiştir.



Şekil 9: OSI dağılımı

Grupların karşılaştırılması OSI	p*
Kontrol ile Sham	0,94
Kontrol ile Ginseng	0,33
Kontrol ile ASA	0,56
Kontrol ile Timokinon	0,009
Sham ile Ginseng	0,65
Sham ile ASA	0,40
Sham ile Timokinon	0,13
Ginseng ile ASA	0,48
Ginseng ile Timokinon	0,002
ASA ile Timokinon	0,03

Tablo 2: Gruplar arası OSI değerlerine göre değerlendirilmesi (* p<0,05 ise anlamlı)

	TOS (umol/L)	TAS (mmol/L)	OSI
Kontrol	18,18±4,18	1,55±0,10	1,52±0,58
Sham	15,34±4,68	1,51±0,37	1,99±1,45
Ginseng	23,07±4,55	1,43±0,19	1,60±0,23
ASA	17,95±6,42	1,42±0,60	1,24±0,40
Timokinon	11,49±2,94	1,62±0,25	0,72±0,24
p*	0,004	0,29	0,008

Tablo 3: Grupların dağılımı (* p<0,05 ise anlamlı)

5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişen teknoloji ve ilaç sanayisine rağmen hala çare bekleyen birçok hastalık mevcuttur. Bunun yanı sıra önceden tanımlayamadığımız yeni hastalıklar ile mücadele etmek zorundayız. Bu da bizi her geçen gün yeni arayışlara ve alternatif bulma gayretlerine sevk ediyor. Yeniye ararken yine en güvenli yol geçmişten beri geleneksel tıpta kullanılan, şifacılar tarafından nesilden nesile öğretilen, etki mekanizması anlaşılmasa da tedavi ettiği hastalıklar kısmen tariflenen bitkisel ilaçlar, araştırma yapılması için halen saflığını korumaktadır. Biz bu çalışmamızda Doğu Asya geleneksel tıbbının önemli şifa kaynağı ginseng ile Ortadoğu ve Anadolu topraklarında ölüm hariç her derde deva olarak nitelendirilen çörek otunu etki mekanizması kısmen de olsa anlaşılan aspirin ile kıyaslayarak, oluşturulan iskemi-reperfüzyon deneysel modelinde antioksidan özelliklerini karşılaştırmayı amaçladık.

Abdominal aort hastalıklarında cerrahi uygulama sırasında aortun klempenmesi ve ardından klempin kaldırılması ile iskemi-reperfüzyon hasarına yol açılabilir. Bu durumda ortaya çıkan oksidatif stres sadece hedef organlarda değil süperoksit radikallerinin kan aracılığı ile sisteme karışarak karaciğer, böbrek ve akciğer başta olmak üzere tüm organlarda oksidatif hasara neden olabilir bu da mortalite ve morbiditede etkilidir (Aivatidi ve ark. 2011). Biz de bu çalışma modelinde abdominal aorta klemp ile oklüde ederek 30 dk boyunca iskemi ve bunu takiben 2 saat reperfüzyon oluşturarak oksidatif stresi değerlendirmek amaçlı TAS, TOS ve OSI'nin serumda ölçümünü yaptık.

İskemi sırasında hücre düzeyinde oksidatif fosforilasyon azalırken ATP tüketimi devam etmektedir (Frangogiannis 2007). Bu sırada nonoksidatif solunum devam eder. Hücre düzeyinde endojen antioksidanlar ise giderek azalır. Nonoksidatif solunumda ise ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaza dönüşür, bu da elektron alıcısı olarak oksijen kullanır (Parks ve ark. 1988). Reperfüzyon sonrası ortama yüksek dozda oksijen gelmesi ile oksijen radikalleri meydana gelir. Bunun sonucunda hücre zarı başta olmak üzere bir yıkım başlar. Normal hücre yapısında denge halinde olan oksidan ve antioksidan oranları reperfüzyon sonrası oksidan tarafa doğru kayar ki bu da bizlere oksidatif stresin arttığını işaret eder (Asci ve ark. 2015). Biz de çalışmamızda iskemi-reperfüzyonun oksidatif etkisini değerlendirdiğimiz kontrol grubunda TOS düzeyleri $18,18 \pm 4,18$ olarak, laparotominin oksidatif etkisini araştırmak üzere dizayn edilen sham grubunda ise TOS

düzeyleri $15,34 \pm 4,68$ olarak saptandı. Bu durum iskemi-reperfüzyonun tek başına oksidatif stresi laparotomiden daha çok etkilediğini düşündürdü.

Uzun bir geçmişe sahip olan ve dünyada en sık kullanılan ilaç olarak bilinen söğüt ağacının özünden elde edilen salisilik asitten üretilen aspirin hakkında her yıl yüzlerce araştırma yapılmaktadır (Lafont 2007). Yapılan bir çalışmada Zebra balığı (*Danio rerio*) gelişim evrelerinin subkronik oksidatif strese maruz kalması karşısında asetilsalisilik asid verilmesi ile oluşan etkinin incelenmesi sonrası, asetilsalisilik asidin zebra balığı üzerinde antioksidan ve biyodönüştürme enzim aktivitesinde bir artışa ve lipid peroksidasyonda bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Zivna ve ark. 2013). Maree ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada aspirinin siklooksijenaz, tromboksan ve prostoglandin üretimini inhibe ederek antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da TAS değerlerinin kontrol grubu ile ASA grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu saptandı ($p=0,035$). Ancak diğer gruplar arasında antioksidan kapasite açısından anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$). ASA grubunda kısmi TOS düşüklüğü saptanmasına karşın bu düzeyler sham ve kontrol grubuna göre anlamlı değildi ($p>0.05$). ASA grubunda saptanan OSI düzeyleri ise ginseng grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü ($p=0,048$) Aspirinin antioksidan kapasitesi literatüre uyumlu olarak bizim çalışmamızda da anlamlı olarak bulundu.

Çin ve Doğu Asya'da geleneksel tıpta kullanılan ve daha çok kronik yorgunluk tedavisinde ve antiageing (gençlik iksiri) olarak önerilen ginseng ve ekstreleri birçok hastalıkta da önerilmektedir (Xiao ve ark. 1993). Ratlarda spinal kord yaralanması üzerine ginsengin koruyucu rolünün araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan durumunu değerlendirmek için, TAS, TOS, lipid peroksidasyonu, myeloperoksidaz aktiviteleri takip edilmiş ve çalışma sonucunda ise ginsengin önemli ölçüde oksidatif stresi ve inflamasyonu kontrol altına alarak iyileşmede pozitif etkili olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark. 2015). Ginseng ekstrelerinin periferik dokuda iskemi-reperfüzyon üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlarda femoral arter 6 saat oklüde edilerek sağ alt ekstremitede iskemi oluşturduktan sonra oklüzyon kaldırılarak 6 saat reperfüze edilmiş, sistemik etkileri görmek için kanda nitrik oksit, malondialdehit, prolidaz ve paroksinaz 1 enzimleri ölçülmüştür. Sonuç olarak ginseng ekstrelerinin iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede faydalı olduğunu bildirmişlerdir. (Caliskan ve ark. 2015). Bitkisel ilaçların modern tıp

dünyasında tartışılır halde olmasının en önemli sebebi içindeki etken maddenin standardize edilememesidir. Bu tür bitkisel ilaçlarda etken madde oranı mevsimsel değişiklikler, toprağın yapısı, havadaki nem, ısı gibi çevresel şartlardan çok etkilenir (Kızıl 2009). Doğal yollar ile toplanan ve ilaç olarak kullanılan bitkisel ürünlerin, rendelenerek kaynar suda demleme şeklinde kullanıma hazırlanması sırasında etken madde oranlarında bir standart sağlanamamaktadır (Rangarajan ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda total oksidatif kapasite (TOS) açısından gruplar değerlendirildiğinde ginseng grubunda $23,07 \pm 4,55$, ASA grubunda $17,95 \pm 6,42$, timokinon grubunda ise $11,49 \pm 2,94$ olarak saptandı. Ginseng grubunda beklenmedik şekilde yüksek saptanan TOS düzeyleri bu maddenin farklı hasat dönemlerinde, farklı etkinlik gösterebileceğini düşündürdü. Özellikle sham grubuna oranla ginseng grubunda anlamlı oksidatif stres artışı izlendi ($p=0.009$). Ginseng grubundaki beklenmedik OSI yüksekliği ise oksidan/antioksidan arasındaki dengenin oksidan lehine bozulması olarak nitelendirilebilir. Bu açıdan bakıldığında literatürün aksine ginsengin oksidatif stresi arttırdığı şeklinde yorumlanabilir fakat biz bu durumu bitkisel ilaçlarda etken madde miktarının standart bir dozda oluşturulamamasına bağlı olarak gelişen bir tablo olduğunu düşünüyoruz.

Ölümden başka her derde deva olarak nitelendirilen, Orta Doğu ve Anadolu memleketlerinde yüzyıllardır kullanılan, daha çok baharat ve yemeklere lezzet katmak amaçlı kullanılsa da şifa verdiği bilinen çörek otu üzerine literatürde birçok çalışma mevcuttur. Radyasyon etkisi ile katarakt oluşturulan ratlarda timokinon, çörek otu, propolis ve CAPE karşılaştırdıkları çalışmada timokinonun diğerlerine göre antioksidan özelliğinin daha güçlü olduğu bildirilmiştir (Demir ve ark. 2015). Yine bir başka çalışmada ratlarda bisfenol A ile oluşturdukları karaciğer hasarında timokinonun lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidatif streste koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir (Abdel-Wahab 2014). Diğer bir deneysel çalışmada ratlarda testiküler iskemi-reperfüzyon çalışmasında timokinonun apoptozisi, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azaltarak etki ettiği bildirilmiştir (Erboga ve ark. 2015). Bu çalışmamızda timokinon grubundaki düşük TOS seviyeleri ise iskemi-reperfüzyon oluşturulan kontrol grubu ($p=0,013$), çalışma grubu olarak tasarlanan ginseng grubu ($p=0,002$) ve ASA grubuna ($p=0,048$) göre anlamlı izlendi. Timokinon grubunda en düşük OSI seviyeleri saptanırken bu fark kontrol ($p=0,009$), sham ($p=0,013$), ginseng ($p=0,002$) ve ASA ($p=0,030$) gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlıydı. Timokinonun reperfüzyondan hemen önce verilmesi

yoluyla, oksidatif stres daha fazla baskılanarak profilaktik bir etki gösterdiğini bizlere düşündürdü. Çörek otundan en çok elde edilen etken maddesi olan timokinon literatürde de desteklendiği gibi antioksidan özelliği dışında birçok faydası bildirilen bitkisel bir üründür. Bizim çalışmamızda da düşük TOS ve OSI değerleri ile iskemi-reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olduğu gözlemlenmiştir.



6. SONUÇ

Çalışmamızda oluşturduğumuz iskemi-reperfüzyon deneysel modelinde geleneksel tıpta kullanılan ginseng ve çörek otunu, modern tıpta güvenilirliği kanıtlanmış aspirin ile antioksidan özellikleri açısından kıyasladığımızda, çörek otunun etken maddesi timokinonun anlamlı şekilde diğerlerinden daha fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğu sonucuna ulaştık. Ginsengin beklenen etkiye sahip olamamasını ise bitkisel ilaçlarda her dozda ve kullanımda aynı etken madde standardının yakalanamamasına bağladık.

Bu çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç ise halen geleneksel şifa kaynakları olan bitkisel ilaçlar üzerinde çalışılması gerektiği, bu yolla çaresiz olarak bilinen birçok hastalığın tedavisine ışık olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab, W. M. "Thymoquinone attenuates toxicity and oxidative stress induced by bisphenol A in liver of male rats." *Pak J Biol Sci* 2014. **17**(11): 1152-1160.
- Abdel-Wahhab, M. A. and S. E. Aly "Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis." *J Appl Toxicol* 2005. **25**(3): 218-223.
- Abdelmeguid, N. E., R. Fakhoury, S. M. Kamal and R. J. Al Wafai "Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic beta-cells of streptozotocin-induced diabetic rats." *J Diabetes* 2010. **2**(4): 256-266.
- Abdelwahab, S. I., B. Y. Sheikh, M. M. Taha, C. W. How, R. Abdullah, U. Yagoub, R. El-Sunousi and E. E. Eid "Thymoquinone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, gastroprotection, in vitro toxicity, and pharmacokinetic properties after extravascular administration." *Int J Nanomedicine* 2013. **8**: 2163-2172.
- Aivatidi C, Vourliotakis G, Georgopoulos S, Sigala F, Bastounis E and P. E. . "Oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair--biomarkers and antioxidant's protective effect: a review." *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011.**15**(3): 245-252.
- Aka S.A and S. M. "Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı." *Türkiye Klinikleri J Cardiovascular_Surgery* 2004. **5**: 202-206.
- Akkuş İ . "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri." 1.Baskı, Mimoza Yayınları: 1995. s 1-60.
- Al-Ali, A., A. A. Alkhawajah, M. A. Randhawa and N. A. Shaikh "Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats." *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2008. **20**(2): 25-27.
- Al Mofleh, I. A., A. A. Alhaider, J. S. Mossa, M. O. Al-Sohaibani, M. A. Al-Yahya, S. Rafatullah and S. A. Shaik "Gastroprotective effect of an aqueous suspension of black cumin *Nigella sativa* on necrotizing agents-induced gastric injury in experimental animals." *Saudi J Gastroenterol* 2008. **14**(3): 128-134.
- Al Wafai, R. J. "Nigella sativa and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats." *Pancreas* 2013. **42**(5): 841-849.
- Alhazmi, M. I., T. N. Hasan, G. Shafi, A. H. Al-Assaf, M. A. Alfawaz and A. A. Alshatwi (). "Roles of p53 and caspases in induction of apoptosis in MCF- 7 breast cancer cells treated with a methanolic extract of *Nigella sativa* seeds." *Asian Pac J Cancer Prev* 2014. **15**(22): 9655-9660.
- Alici, O., H. S. Kavakli, C. Koca and N. D. Altintas "Treatment of *Nigella sativa* in experimental sepsis model in rats." *Pak J Pharm Sci* (2011). **24**(2): 227-231.
- Amann R and P. BA. "Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate." *Eur J Pharmacol* (2002). **447**(1): 1-9.

- Amat, N., A. Umar, P. Hoxur, M. Anaydulla, G. Imam, R. Aziz, H. Upur, A. Kijjoa and N. Moore "Traditional Uighur Medicine Karapxa decoction, inhibits liver xanthine oxidase and reduces serum uric acid concentrations in hyperuricemic mice and scavenges free radicals in vitro." *BMC Complement Altern Med* 2015.**15**(1): 131.
- AO, Ş. "Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi." Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2001
- Asci A, Surmeli Onay O, Erkekoglu P, Yigit S, Yurdakok M and K.-G. B "Oxidant and antioxidant status in neonatal proven and clinical sepsis in relation to selenium status." *Pediatr Int*. 2015
- Aydin, M. S., A. Kocarlan, S. Kocarlan, A. Kucuk, I. Eser, H. Sezen, E. Buyukfirat and A. Hazar "Thymoquinone protects end organs from abdominal aorta ischemia/reperfusion injury in a rat model." *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2015.**30**(1): 77-83.
- Azimi, H., A. A. Khakshur, M. Abdollahi and R. Rahimi . "Potential New Pharmacological Agents Derived From Medicinal Plants for the Treatment of Pancreatic Cancer." *Pancreas* 2015.**44**(1): 11-15.
- Badary oa, al-shabanah oa, nagi mn, al bekarı am and e. mna. "acute and subchoronic toxicity of thymoquinone in mice " drug development research 1998.**44**: 56-61.
- Badary, O. A., R. A. Taha, A. M. Gamal el-Din and M. H. Abdel-Wahab "Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger." *Drug Chem Toxicol* 2003.**26**(2): 87-98.
- Bakathir, H. A. and N. A. Abbas . "Detection of the antibacterial effect of Nigella sativa ground seeds with water." *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011.**8**(2): 159-164.
- Bamosa, A. O., B. A. Ali and Z. A. al-Hawsawi "The effect of thymoquinone on blood lipids in rats." *Indian J Physiol Pharmacol* 2002 **46**(2): 195-201.
- Bartsch E, Park AL, Kingdom JC and R. JG. . "Risk threshold for starting low dose aspirin in pregnancy to prevent preeclampsia: an opportunity at a low cost." *PLoS One* 2015. **10**(3).
- Baytop, T. "Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi." İ.Ü. Yayınları **no: 3255**. 1984
- Beckman, K. B. and B. N. Ames. "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* 1998. **78**(2): 547-581.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y. and C. F. "Chemical composition of seed essential oils from Algerian Nigella sativa extracted by microwave and hydrodistillation." *Flavour Frag. J.* 2007. **22**: 148-153.
- Bhattacharya, S., M. Ahir, P. Patra, S. Mukherjee, S. Ghosh, M. Mazumdar, S. Chattopadhyay, T. Das, D. Chattopadhyay and A. Adhikary "PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a." *Biomaterials* 2015,**51**: 91-107.
- Bourgou, S., R. Ksouri, A. Bellila, I. Skandrani, H. Falleh and B. Marzouk. "Phenolic composition and biological activities of Tunisian Nigella sativa L. shoots and roots." *C R Biol* 2008,**331**(1): 48-55.
- Brown, RK., Wilson G, Tucci MA, Benghuzzi HA. "The effects of thymoquinone and Doxorubicin on leukemia and cardiomyocyte cell lines." *Biomed Sci Instrum* 2014,**50**: 391-396.
- Caliskan A, Karahan O, Yazici S, Demirtas S, Guclu O ve ark.. "Protective effects of ginseng extracts and common anti-aggregant drugs on ischaemia-reperfusion injury.." *Cardiovasc J Afr.* 2015,**26**(6): 222-226.

Cejka, C. ve J. Cejkova. "Oxidative Stress to the Cornea, Changes in Corneal Optical Properties, and Advances in Treatment of Corneal Oxidative Injuries." *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 591530.

Chen, X., S. Zhang, J. Wu and X. Sun . "[Study of thioredoxin antioxidative system in lateral geniculate body of chronic intraocular hypertension rat]." *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2015.**51**(2): 120-125.

Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A and A.-L. C. "Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke." *Curr Med Chem* 2008,**15**: 1236-1248.

Cross, C. E., B. Halliwell, E. T. Borish, W. A. Pryor, B. N. Ames, R. L. Saul, J. M. McCord and D. Harman . "Oxygen radicals and human disease." *Ann Intern Med* 1987,**107**(4): 526-545.

Darakhshan, S., A. Bidmeshki Pour, A. Hosseinzadeh Colagar and S. Sisakhtnezhad. "Thymoquinone and its therapeutic potentials." *Pharmacol Res* 2015,**95-96C**: 138-158.

Das, S., K. K. Dey, G. Dey, I. Pal, A. Majumder, S. MaitiChoudhury, S. C. Kundu and M. Mandal. "Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma." *PLoS One* 2012,**7**(10): e46641.

Dehghani, H., M. Hashemi, M. Entezari and A. Mohsenifar . "The comparison of anticancer activity of thymoquinone and nanothymoquinone on human breast adenocarcinoma." *Iran J Pharm Res* 2015,**14**(2): 539-546.

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." *Wien Klin Wochenschr* 2015.

Dirican, A., C. Erten, H. Atmaca, E. Bozkurt, Y. Kucukzeybek, U. Varol, M. Oktay Tarhan, B. Karaca and R. Uslu (2014). "Enhanced cytotoxicity and apoptosis by thymoquinone in combination with zoledronic acid in hormone- and drug-resistant prostate cancer cell lines." *J BUON* **19**(4): 1055-1061.

DN, G. (1999). "Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease." *Microcirculation* **6**: 167-178.

el-Aziz, M. A., H. A. Hassan, M. H. Mohamed, A. R. Meki, S. K. Abdel-Ghaffar and M. R. Hussein (2005). "The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and Nigella sativa in mammary carcinoma: an animal model." *Int J Exp Pathol* **86**(6): 383-396.

El-Dakhakhny, M., N. J. Madi, N. Lembert and H. P. Ammon (2002). "Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats." *J Ethnopharmacol* **81**(2): 161-164.

El-Dakhakhny, M., N. Mady, N. Lembert and H. P. Ammon (2002). "The hypoglycemic effect of Nigella sativa oil is mediated by extrapancreatic actions." *Planta Med* **68**(5): 465-466.

El-Mahmoudy, A., H. Matsuyama, M. A. Borgan, Y. Shimizu, M. G. El-Sayed, N. Minamoto and T. Takewaki (2002). "Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages." *Int Immunopharmacol* **2**(11): 1603-1611.

El-Mahmoudy, A., Y. Shimizu, T. Shiina, H. Matsuyama, H. Nikami and T. Takewaki (2005). "Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect of thymoquinone." *Acta Diabetol* **42**(1): 23-30.

El Mezayen, R., M. El Gazzar, M. R. Nicolls, J. C. Marecki, S. C. Dreskin and H. Nomiyama (2006). "Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation." *Immunol Lett* **106**(1): 72-81.

- el Tahir, K. E., M. M. Ashour and M. M. al-Harbi (1993). "The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action." Gen Pharmacol **24**(5): 1123-1131.
- Entok, E., M. C. Ustuner, C. Ozbayer, N. Tekin, F. Akyuz, B. Yangi, H. Kurt, I. Degirmenci and H. V. Gunes (2014). "Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Nigella sativa* L.: 18FDG-PET imaging of inflammation." Mol Biol Rep **41**(5): 2827-2834.
- Erboga, M., C. Aktas, O. Kurt, R. Uygur, V. Caglar, B. C. Turan, B. Topcu, Z. Fidanol Erboga, A. Gurel and O. A. Ozen (2015). "Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study." Andrologia.
- Erel O (2004). "A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions." Clin. Biochem **37**(2): 112-119.
- Erel O (2005). "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status " Clin. Biochem **38**(12): 1103-1111.
- Fararh, K. M., Y. Shimizu, T. Shiina, H. Nikami, M. M. Ghanem and T. Takewaki (2005). "Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters." Res Vet Sci **79**(3): 219-223.
- Forouzanfar, F., B. S. Bazzaz and H. Hosseinzadeh (2014). "Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects." Iran J Basic Med Sci **17**(12): 929-938.
- Frangogiannis, N. G. (2007). "Chemokines in ischemia and reperfusion." Thromb Haemost **97**(5): 738-747.
- Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury." Lab Invest **47**(5): 412-426.
- Fu YQ, Hua C, Zhou J, Cheng BR and Z. J. (2013). "Protective effects of ginseng total saponins against hepatic ischemia/reperfusion injury in experimental obstructive jaundice rats." Pharm Biol: [Epub ahead of print].
- Furuichi, K., T. Wada, S. Kaneko and P. M. Murphy (2008). "Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury." Front Biosci **13**: 4021-4028.
- Ghosheh, O. A., A. A. Houdi and P. A. Crooks (1999). "High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.)." J Pharm Biomed Anal **19**(5): 757-762.
- González-Pérez O, Moy-López NA and Guzmán-Muñiz J (2008). "Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine." Rev Invest Clin **60**: 58-67.
- Green, C. J., J. D. Gower, G. Healing, L. A. Cotterill, B. J. Fuller and S. Simpkin (1989). "The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys." Free Radic Res Commun **7**(3-6): 255-264.
- Güllü E. B. and A. G. (2013). "Timokinon: *Nigella sativa*'nın Biyoaktif Komponenti." Kocatepe Vet J **6**(1): 51-61.
- Han JY, Lee S, Yang JH, Kim S, Sim J, Kim MG, Jeong TC, Ku SK, Cho IJ and K. SH (2015). "Korean Red Ginseng attenuates ethanol-induced steatosis and oxidative stress via AMPK/Sirt1 activation." J Ginseng Res **39**(2): 105-115.
- Harpole, J. L., M. A. Tucci and H. A. Benghuzzi (2014). "Pathophysiological Responses Associated with Exposure to TQ and EGCG Using CAOV-3 Ovarian Cancer Like Cells." Biomed Sci Instrum **50**: 345-352.

- Heshmati, J. and N. Namazi (2015). "Effects of black seed (*Nigella sativa*) on metabolic parameters in diabetes mellitus: A systematic review." Complement Ther Med **23**(2): 275-282.
- Hilmi, Y., M. F. Abushama, H. Abdalgadir, A. Khalid and H. Khalid (2014). "A study of antioxidant activity, enzymatic inhibition and in vitro toxicity of selected traditional Sudanese plants with anti-diabetic potential." BMC Complement Altern Med **14**: 149.
- Hosseinzadeh, H., S. Parvardeh, M. N. Asl, H. R. Sadeghnia and T. Ziaee (2007). "Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus." Phytomedicine **14**(9): 621-627.
- Hu H, Batteux F, Chéreau C, Kavian N, Marut W, Gobeaux C, Borderie D, Dinh-Xuan AT and N. C. Weill B (2011). "Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischaemia-reperfusion injury." J Pathol **255**(2): 265-275.
- Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Takuhiro K, Ouchi M and I. Y. (2006). "Comparison of the protective effects of type III phosphodiesterase (PDE3) inhibitor (cilostazol) and acetylsalicylic acid on intestinal microcirculation after ischemia reperfusion injury in mice." Shock **26**(5): 522-526.
- J, B. (1995). "Pharmacognosy, phytochemistry medicinal plants." Paris, Lavoisier.
- Jang SS1, Kim HG, Han JM, Lee JS, Choi MK, Huh GJ and S. CG (2015). "Modulation of radiation-induced alterations in oxidative stress and cytokine expression in lung tissue by *Panax ginseng* extract." Phytother Res **29**(2): 201-209.
- Jawa, R. S., E. Quist, C. W. Boyer, V. K. Shostrom and D. W. Mercer (2013). "Mesenteric ischemia-reperfusion injury up-regulates certain CC, CXC, and XC chemokines and results in multi-organ injury in a time-dependent manner." Eur Cytokine Netw **24**(4): 148-156.
- Jennings, R. B. and K. A. Reimer (1991). "The cell biology of acute myocardial ischemia." Annu Rev Med **42**: 225-246.
- Kanko M, Maral H, Akbas MH, Ozden M, Bulbul S, Omay O, Yavuz S and B. KT. (2005). "Protective effects of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia." Tohoku J Exp Med. **205**(2): 133-139.
- Kapan, M., R. Tekin, A. Onder, U. Firat, O. Evliyaoglu, F. Taskesen and Z. Arıkanoglu (2012). "Thymoquinone ameliorates bacterial translocation and inflammatory response in rats with intestinal obstruction." Int J Surg **10**(9): 484-488.
- Kiliç., A. (2008). "Methods of essential oil production." Bartın Orman Fakültesi Dergisi **10**(13): 37-45.
- Kim HG, Cho JH, Yoo SR, Lee JS, Han JM, Lee NH, Ahn YC and S. CG. (2013). "Antifatigue effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." PLoS One **8**(4).
- Kim, J. H. and J. C. Kang (2015). "Oxidative stress, neurotoxicity, and non-specific immune responses in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, exposed to different waterborne selenium concentrations." Chemosphere **135**: 46-52.
- Kim SJ and K. AK (2015). "Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (*Panax ginseng* Meyer) and ginsenoside Rg5." J Ginseng Res. **39**(2): 125-134.
- Kıralan, M. (2012). "Volatile compounds of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.) from microwave-heating and conventional roasting." J Food Sci **77**(4): C481-484.
- Kıralan, M. (2014). "Changes in Volatile Compounds of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) Seed Oil During Thermal Oxidation." International Journal of Food Properties **17**(7): 1482-1489.
- KIZIL, S. (2009). "Farklı Hasat Dönemlerini Oğul Otu (*melissa officinalis* L.)'nda Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi." Tarım Bilimleri Dergisi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi **15**(1): 20-24.

- Knapik JJ, Wright JE and W. MJ. (1983). "The influence of Panax ginseng on indices of substrate utilization during repeated, exhaustive exercise in man. Federation proceed-ings." **42**: 336.
- Kong DF (2004). "Aspirin in cardiovascular disorders. What is the optimum dose?." Am J Cardiovasc Drugs **4**(3): 151-158.
- Lafont O (2007). "From the willow to aspirin." Rev Hist Pharm (Paris). **55**(354): 209-216.
- Lee, Y. and E. Shacter (1995). "Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins." Arch Biochem Biophys **321**(1): 175-181.
- Leong, X. F., M. Rais Mustafa and K. Jaarin (2013). "Nigella sativa and Its Protective Role in Oxidative Stress and Hypertension." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 120732.
- Levy GN (1997). "Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer." FASEB J. **11**(4): 234-247.
- Lin X, Yin L, Gao R, Liu Q, Xu W, Jiang X and C. BH (2015). "The effects of panaxadiol saponins on megakaryocytic maturation and immune function in a mouse model of immune thrombocytopenia." Exp Hematol **43**(5): 364-373.
- Liu T, Peng YF, Jia C, Yang BH, Tao X, Li J and F. X (2015). "Ginsenoside Rg3 improves erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats." J Sex Med. **12**(3): 611-620.
- M., K. (2009). "Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy." J Mol Histol **40**(2): 107-115.
- Mabrouk, A. and H. Ben Cheikh (2015). "Thymoquinone supplementation reverses lead-induced oxidative stress in adult rat testes." Gen Physiol Biophys **34**(1): 65-72.
- Magdy, M. A., A. Hanan el and M. Nabila el (2012). "Thymoquinone: Novel gastroprotective mechanisms." Eur J Pharmacol **697**(1-3): 126-131.
- Mahmoudvand, H., E. S. Dezaki, F. Kheirandish, B. Ezatpour, S. Jahanbakhsh and M. F. Harandi (2014). "Scolicidal effects of black cumin seed (Nigella sativa) essential oil on hydatid cysts." Korean J Parasitol **52**(6): 653-659.
- Mansour, M. and S. Tornhamre (2004). "Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone." J Enzyme Inhib Med Chem **19**(5): 431-436.
- Mansour, M. A., O. T. Ginawi, T. El-Hadiyah, A. S. El-Khatib, O. A. Al-Shabanah and H. A. Al-Sawaf (2001). "Effects of volatile oil constituents of Nigella sativa on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **110**(3-4): 239-251.
- Maree AO and F. DJ. (2004). "Aspirin and coronary artery disease." Thromb Haemost. **92**(6): 1175-1181.
- Mickle DA and W. RD (1993). "Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury." Can J Cardiol **9**: 89-93.
- Mollazadeh, H. and H. Hosseinzadeh (2014). "The protective effect of Nigella sativa against liver injury: a review." Iran J Basic Med Sci **17**(12): 958-966.
- Murray R.K, Bender D.A, Botham K.M, Kennelly P.J, Rodwell V.W and W. P.A. (2012). "HARPER'S ILLUSTRATED BIOCHEMISTRY." **29TH EDITION**: 584.
- Nickavar, B., F. Mojab, K. Javidnia and M. A. Amoli (2003). "Chemical composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran." Z Naturforsch C **58**(9-10): 629-631.

- O'Malley GF (2007). "Emergency department management of the salicylate-poisoned patient." Emerg Med Clin North Am **25**(2): 333-346.
- Paik DJ and L. CH (2015). "Review of cases of patient risk associated with ginseng abuse and misuse." J Ginseng Res. **39**(2): 89-93.
- Parks, D. A., T. K. Williams and J. S. Beckman (1988). "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation." Am J Physiol **254**(5 Pt 1): G768-774.
- Pieralisi G, Ripari P and V. L (1991). "Effects of a standardized ginseng extract combined with dimethylaminoethanol bitartrate, vitamins, minerals, and trace elements on physical performance during exercise." Clinical therapeutics **13**: 373-382.
- Pimouguet, C., M. Le Goff, R. Thiebaut, J. F. Dartigues and C. Helmer (2011). "Effectiveness of disease-management programs for improving diabetes care: a meta-analysis." CMAJ **183**(2): E115-127.
- Radad, K., K. Hassanein, M. Al-Shraim, R. Moldzio and W. D. Rausch (2014). "Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats." Exp Toxicol Pathol **66**(1): 13-17.
- Raghunandhakumar, S., A. Paramasivam, S. Senthilraja, C. Naveenkumar, S. Asokkumar, J. Binuclara, S. Jagan, P. Anandakumar and T. Devaki (2013). "Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G1/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma." Toxicol Lett **223**(1): 60-72.
- Randhawa, M. A. and M. S. Alghamdi (2011). "Anticancer activity of Nigella sativa (black seed) - a review." Am J Chin Med **39**(6): 1075-1091.
- Rangarajan P, Eng-Ang L and D. ST. (2013). "Potential drugs targeting microglia: current knowledge and future prospects." CNS Neurol Disord Drug Targets **12**(6): 799-806.
- Ratz-Lyko, A., J. Arct, K. Pytkowska and S. Majewski (2015). "In vivo and ex vivo evaluation of cosmetic properties of seedcakes." J Cosmet Laser Ther **17**(2): 109-115.
- Refiye GARİP, Ümran SOYOĞUL GÜRER, Burçak GÜRBÜZ, Esra DALKILIÇ, Şükrü PALANDÜZ, Fatma Nilgün AYSUNA and A. Y. ŞENER (2014). "Bazı Antibiyotiklerin Hemodiyaliz Hastalarının Polimorf Nüveli Lökosit Fonksiyonları ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması." Marmara Pharmaceutical Journal **18**(3): 139-146.
- Rein, D. and A. L. Tappel (1998). "Fluorescent lipid oxidation products and heme spectra index antioxidant efficacy in kidney tissue of hamsters." Free Radic Biol Med **24**(7-8): 1278-1284.
- Rinnerthaler, M., J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost and K. Richter (2015). "Oxidative Stress in Aging Human Skin." Biomolecules **5**(2): 545-589.
- RJ., R. (1995;). "Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain." FASEB J **9**: 526-533.
- Robinson DR (1983). "Prostaglandins and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs." Am J Med **75**(4B): 26-31.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V and Reiter RJ (2004). "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin." J Pineal Res **36**: 1-9.
- Rooney, S. and M. F. Ryan (2005). "Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of Nigella sativa, on human cancer cell lines." Anticancer Res **25**(3B): 2199-2204.

SA mahgoub and m. ramadan (2013). "Cold Pressed Nigella sativa Oil Inhibits the Growth of Foodborne Pathogens and Improves the Quality of Domiati Cheese." Journal of Food safety **33**: 470-480.

Saadat, S., M. Mohammadi, M. Fallahi, R. Keyhanmanesh and M. R. Aslani (2015). "The protective effect of alpha-hederin, the active constituent of Nigella sativa, on tracheal responsiveness and lung inflammation in ovalbumin-sensitized guinea pigs." J Physiol Sci **65**(3): 285-292.

Salem, M. L. (2005). "Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed." Int Immunopharmacol **5**(13-14): 1749-1770.

Sankaranarayanan, C. and L. Pari (2011). "Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and beta-cell damage in experimental hyperglycemic rats." Chem Biol Interact **190**(2-3): 148-154.

Sapmaz, H. I., M. Sarsilmaz, A. Godekmerdan, M. Ogeturk, U. Tas and E. Kose (2015). "Effects of formaldehyde inhalation on humoral immunity and protective effect of Nigella sativa oil: An experimental study." Toxicol Ind Health.

Schoenberger JA (1987). "Recruitment experience in the Aspirin Myocardial Infarction Study." Control Clin Trials **8**(4): 74-75.

Sharma, H., R. Kanwal, N. Bhaskaran and S. Gupta (2014). "Plant flavone apigenin binds to nucleic acid bases and reduces oxidative DNA damage in prostate epithelial cells." PLoS One **9**(3): e91588.

Shen, A. C. and R. B. Jennings (1972). "Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury." Am J Pathol **67**(3): 417-440.

Shergis JL, Zhang AL, Zhou W and X. CC (2013). "Panax ginseng in randomised controlled trials: a systematic review." Phytother Res. **27**(7): 949-965.

Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, Leonard SS, Castranova V and V. V. (1999). "Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production." Mol Cell Biochem **199**(1-2): 93-102.

Shibata S , Wagner H, Farnsworth NR and H. H. (1985). "Chemistry and pharmacology of Panax." Economic and medicinal plants research Vol. 1 London, Academic Press.

Shishtar E, Sievenpiper JL, Djedovic V, Cozma AI, Ha V, Jayalath VH, Jenkins DJ, Meija SB, de Souza RJ, Jovanovski E and V. V. (2014). "The effect of ginseng (the genus panax) on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials." PLoS One. **9**(9).

Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Ahn S, Kang S, Kim YJ, Sathishkumar N, Yang DU and Y. DC (2013). "Ginseng saponins and the treatment of osteoporosis: mini literature review." J Ginseng Res **37**(3): 261-268.

Siegel RK (1979). "Ginseng abuse syndrome: problems with the panacea. , , ." Journal of the American Medical Association **241**: 1614-1615.

Sonnenborn U and H. R. (1992). "Panax ginseng ,adverse reactions of herbal drugs. ." In: De Smet PAGM et al., eds. Springer-Verlag, Berlin. : 179-192.

Sonnenborn U and P. Y (1991). "Ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer)." British journal of phytotherapy **2**: 3-14.

Southard, J. H., D. C. Marsh, J. F. McNulty and F. O. Belzer (1987). "Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase." Surgery **101**(5): 566-570.

- Steinbacher, P. and P. Eckl (2015). "Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle." Biomolecules **5**(2): 356-377.
- Stone WL, Krishnan K, Campbell SE and P. VE. (2014). "The role of antioxidants and pro-oxidants in colon cancer." World J Gastrointest Oncol **6**(3): 55-66.
- Suddek, G. M., N. A. Ashry and N. M. Gameil (2013). "Thymoquinone attenuates cyclophosphamide-induced pulmonary injury in rats." Inflammopharmacology **21**(6): 427-435.
- Sultan, M. T., M. S. Butt, R. Karim, N. Ahmad, R. S. Ahmad and W. Ahmad (2015). "Nigella sativa fixed and essential oil improves antioxidant status through modulation of antioxidant enzymes and immunity." Pak J Pharm Sci **28**(2): 589-595.
- Sun, C., X. Lai, X. Huang and Y. Zeng (2014). "Protective effects of ginsenoside Rg1 on astrocytes and cerebral ischemic-reperfusion mice." Biol Pharm Bull **37**(12): 1891-1898.
- Tan, H., X. P. Huang and C. Q. Deng (2010). "[Effects of astragaloside and Panax notoginseng saponins combination on oxidative stress of cerebral ischemic reperfusion injury in mice]." Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao **8**(5): 448-452.
- Teke Z, Kabay B and Ö. A. (2008). "İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi." Pamukkale Tıp Dergisi **1**: 65-72.
- Ullah, I., N. Ullah, M. I. Naseer, H. Y. Lee and M. O. Kim (2012). "Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons." BMC Neurosci **13**: 11.
- Uzayisenga R, W. Ayeka PA and a. Y (2014). " Anti-diabetic potential of Panax notoginseng saponins (PNS): a review." Phytother Res. **28**(4): 510-516.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and T. J (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol
- Van De Wier, B., G. H. Koek, A. Bast and G. R. Haenen (2015). "The Potential of Flavonoids in the Treatment of Non-alcoholic Fatty Liver Disease." Crit Rev Food Sci Nutr: 0.
- Vane JR (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-235.
- Vane JR and B. RM (2003). "The mechanism of action of as-pirin. ." Thromb Res **110**(5-6): 255-258.
- Virág L and S. C (2002). "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors." Pharmacol Rev **54**: 375-429.
- Wagner H, Nörr H and W. H. (1994). "Plant adaptogens." Phytomedicine **1**(1): 63-76.
- Wang T, Di G, Yang L, Dun Y, Sun Z, Wan J, Peng B, Liu C, Xiong G, Zhang C and Y. D (2015). "Saponins from Panax japonicus attenuate D-galactose-induced cognitive impairment through its anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats." J Pharm Pharmacol. [Epub ahead of print].
- Wang W, Shen H, Xie JJ, Ling J and L. H. (2015). "Neuroprotective effect of ginseng against spinal cord injury induced oxidative stress and inflammatory responses." Int J Clin Exp Med **8**(3): 3514-3521.
- WHO (2004). "World Health Organization Medicinal plants — guidelines to promote patient safety and plant conservation for a US \$ 60 billion industry. ." **10**: 178.
- WHO (2005). "International Programme on Chemical Safety; Poisons Information Monograph: Acetylsalicylic Acid (PIM 006) ".

- Wilhelm, J. (1990). "Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation." Acta Univ Carol Med Monogr **137**: 1-53.
- Woodfin, A., C. A. Reichel, A. Khandoga, M. Corada, M. B. Voisin, C. Scheiermann, D. O. Haskard, E. Dejana, F. Krombach and S. Nourshargh (2007). "JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration." Blood **110**(6): 1848-1856.
- Xiao PG, Xing ST and W. LW. (1993). "Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiaging drugs." J Ethnopharmacol. **38**(2-3): 167-175.
- Yokozawa T, Wu Liu Z.W. and D. E. (1998). "A Study of Ginsenoside-Rd in a Renal Ischemia-Reperfusion Model." Nephron **78**(2): 201-206.
- Zaoui, A., Y. Cherrah, K. Alaoui, N. Mahassine, H. Amarouch and M. Hassar (2002). "Effects of Nigella sativa fixed oil on blood homeostasis in rat." J Ethnopharmacol **79**(1): 23-26.
- Zaoui, A., Y. Cherrah, N. Mahassini, K. Alaoui, H. Amarouch and M. Hassar (2002). "Acute and chronic toxicity of Nigella sativa fixed oil." Phytomedicine **9**(1): 69-74.
- Zhang, W., C. Smith, A. Shapiro, R. Monette, J. Hutchison and D. Stanimirovic (1999). "Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro." J Neuroimmunol **101**(2): 148-160.
- Zimmerman BJ and G. DN. (1992). "Reperfusion injury." Surg Clin North Am **72**: 65-83.
- Zivna D, Plhalova L, Praskova E, Stepanova S, Siroka Z, Sevcikova M, Blahova J, Bartoskova M, Marsalek P, Skoric M and S. Z. (2013). "Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid." Neuro Endocrinol Lett **34**(supp 2): 116-122.
- Zubair, H., H. Y. Khan, A. Sohail, S. Azim, M. F. Ullah, A. Ahmad, F. H. Sarkar and S. M. Hadi (2013). "Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants." Cell Death Dis **4**: e660.