

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ PERFÜZYONİSTLİK ANABİLİM
DALI

TİMOKİNİN'İN VASKÜLER ENDOTEL HÜCRELERİNDE
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet KOLAĞASIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih AYDIN

ŞANLIURFA

2014

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ PERFÜZYONİSTLİK ANABİLİM
DALI

TİMOKİNİN'İN VASKÜLER ENDOTEL HÜCRELERİNDE
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet KOLAĞASIOĞLU

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih AYDIN

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 13135 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2014

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ahmet KOLAĞASIOĞLU'nun hazırladığı "Timokininin Vasküler Endotel Hücrelerinde İskemi/Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Etkinliğinin Araştırılması" konulu çalışma 03.06.2014 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek

Kalp Damar Cerrahisi Perfüzyonistlik Anabilim Dalı **YÜKSEKLİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa GÖZ
Harran Üniversitesi
BAŞKAN




Doç. Dr. Abdussamed HAZAR
Harran Üniversitesi
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. M. Salih AYDIN (Danışman)
Harran Üniversitesi
ÜYE



ONAY

03/06/2014

Prof. Dr. Nurten AKSOY
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen başta bölüm başkanımız sayın Doç. Dr. Mustafa GÖZ'e, gerek tezimin konusunun seçiminde gerekse yazımında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam SayınYrd. Doç. Dr. Mehmet Salih AYDIN' a, bilgi ve deneyimlerini bizden esirgemeyen Sayın Doç. Dr.Abdussemed HAZAR'a, deney ve laboratuvar çalışmalarımızda yardımları sebebiyle SayınYrd. Doç. Dr. Aydemir KOÇARSLAN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan perfüzyonistler Sayın Ezhar KORKMAZ ve Sayın Yasemin BAKAR'a, çalışmamızın biyokimyasal çalışmasını yapan Harran Üniversitesi merkez Biyokimya laboratuvarı çalışanları, biyokimya anabilim dalı başkanı ve aynı zamanda Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü olan sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, Harran Üniversitesi Perfüzyon Tekniker Bölümü akademik kadrosunda bulunan Sayın Reşat DİKME, Mahmut PADAK, Sami AKPİRİNÇ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Personeli Ahmet ÖZDEMİR ve Kadir RASTGELDİ' yeteşekkürlerimi sunuyorum.

Ahmet KOLAĞASIOĞLU

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
GRAFİKLER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR	IX
ÖZET	XII
ABSTRAC	XIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı (İRH)	3
2.1.1. Serbest Radikaller	5
2.1.1.1.Serbest Radikal Türleri	6
2.1.1.2.Serbest Radikallerin Etkileri	7
2.1.1.3.Serbest Radikallerin Bazı Hücre ve Dokularda Meydana	7
2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)	11
2.1.3. Komplemanın Rolü	14
2.1.4. Endotel Hücresinin Rolü	14
2.2. Antioksidanlar	15
2.2.1.Antioksidan Etki Tipleri	15
2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	16
2.2.2.1.Endojen Antioksidanlar	16
2.2.2.1.1.Enzim Olan Endojen Antioksidanlar	17
2.2.2.1.1.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)	17

2.2.2.1.1.2.Katalaz	17
2.2.2.1.1.3. Glutasyon peroksidaz(GSH-Px) ve Glutasyon redüktaz(GSH-R)	17
2.2.2.1.1.4.Glutasyon S-Transferaz (GST)	18
2.2.2.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar	18
2.2.2.1.2.1.Glutasyon (GSH)	18
2.2.2.2. Eksojen Antioksidanlar	19
2.2.2.2.1.Vitamin Eksojen Antioksidanlar	19
2.2.2.2.1.1Vitamin E (α -tokoferol)	20
2.2.2.2.1.2.Vitamin C (askorbik asit)	20
2.2.2.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar	21
2.2.2.3.Ürik Asit	21
2.2.2.4.Taurin	22
2.2.2.5.Melatonin	22
2.2.2.6.Albumin	23
2.3.Aort Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon Hasarı	23
2.4.Total Antioksidan Seviye (TAS)	24
2.5.Total Oksidatif Stres (TOS)	24
2.5.1.Reaktifler	25
2.5.2.Çalışma Prensibi	25
2.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	25
2.7.Nigella Sativa (Çörek Otu)	25
2.7.1.Timokinin	27
2.7.1.1.Timokinin'in Etkileri	28
2.7.1.1.1. Antihiperlipidemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi	28
2.7.1.1.2. Antioksidatif Etkisi	30
2.7.1.1.3. Antidiyabetik Etkisi	31
2.7.1.1.4. Antitümoral ve Antikanserojenik Etkisi	32

2.7.1.1.5. Sindirim Sistemine Etkisi	33
2.7.1.1.6. İmmun Sisteme Etkisi	34
2.7.1.1.7. Analjezik ve Antiinflamatuvar Etkisi	34
2.7.1.1.8. Antibakteriyel, Antihelminetik ve Antifungal Etkileri	35
2.7.1.1.9. Sinir Sistemine Etkisi	36
2.7.1.1.10. Solunum Sistemine Etkisi	36
2.7.1.1.11. Dolaşım Sistemine Etkisi	36
2.7.1.1.12. Boşaltım Sistemine Etkisi	37
2.7.1.1.13. Karaciğeri Koruyucu Etkisi	37
2.7.1.1.14. Kemikler Üzerine Etkisi	37
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması	39
3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli	39
3.3. Thymoquinone'in Hazırlanması	40
3.4. Deney Grupları ve Protokol	40
3.5. Vasküler Endotel Yapının Histopatolojik İncelenmesi	40
3.6. TAS Ölçümü	41
3.7. TOS Ölçümü	41
3.8. OSİ Hesaplanması	41
3.9. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Grupların TAS Değerlerinin Karşılaştırılması	45
4.2. Grupların TOS Değerlerinin Karşılaştırılması	46
4.3. Grupların OSİ Değerlerinin Karşılaştırılması	46
4.4. Grupların Histopatolojik Hasar Skorlarının Karşılaştırılması	47
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56

GRAFİK DİZİNİ

SAYFA NO

Grafik-1: Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması	44
Grafik-2: Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması	45
Grafik-3: Gruplar arası OSİ değerlerinin karşılaştırılması	46



ŞEKİL DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil-1:İskemi oluşumu ve reperfüzyon sürecinin gelişimi	4
Şekil-2:Çoklu doymamış yağ asidlerininperoksidasyonu	9
Şekil-3:İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi	11
Şekil-4:Timokinin kimyasal yapısı	28



TABLODİZİNİ

SAYFA NO

Tablo-1: Reaktif oksijen bileşikleri	6
Tablo-2: Thymoquinone'in farmakolojik özelliklerinin bildirildiği çalışmaların derlemesi	38
Tablo-3: Gruplar arası TAS, TOS, OSİ	43



RESİM DİZİNİ

SAYFA NO

Resim-1: Çörek otu bitkisi	27
Resim-2: Çörek otu tohumu	27
Resim-3: Mikrovasküler klemp ile sıçan aortu oklüzyonunun vaskülerendotel Hasarıoluşturma etkisinin incelenmesi	47



KISALTMALAR

AAA	: Abdominal Aortik Anevrizma
ALI	:Akut Akciğer Yaralanmasında
ARDS	:Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
ATP	:Adenzoin Tri Fosfat
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil Sülfoksi
DOX	:Doksorubisin
GSH	:Glutasyon
GSHP	: Glutasyon Peroksidaz
GST	:Glutasyon S-Transferaz
HDL	:Yüksek Dansiteli Lipoprotein
IAA	:İnfrarenal Abdominal Aorta
ICAM	:İnterselüler Adhezyon Molekülü
IL	:İnterlökin
İ.P	:Periton İçi (intra peritonal)
İRH	:İskemi Reperfüzyon Hasarı
KDH	:Ksantin Dehidrojenazın
KO	:Ksantin Oksidaza
LDL	:Düşük Dansiteli Lipoprotein
LO	:Lipooksijenaz

LOO-	:Lipid Peroksi Radikali
LPS	:Lipopolisakkarit
LT	:Lökotrienler
MCP	:Monosit Kemoatraktan Protein
MDA	:Malondialdehit
MOF	:Çoklu Organ Yetmezliği
MTX	:Metotreksat
NAD	:Nikotinamid Adenin Dinükleotidin Okside
NO3	:Nitrat
NS	:Nigella Sativa (Çörek Otu)
OSI	:Oksidatif Stres İndeksi
PAF	:Trombosit Aktive Edici Faktör
PECAM	: Adhezyon Molekülü
PG	:Prostaglandin
PMNL	:Polimorf Nüveli Lökositler
PSGL	:P- Selektin Glikoprotein
RAAA	:Rüptüre Abdominal Aortik Anevrizmaları
ROOH	:Hidroperoksit
SH	: Sülfhidril
SIRS	: Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu
SOD	:Süperoksit Dismutaz

SOR	:Serbest Oksijen Radikal
STZ	:Streptozotosin
TAAA	:Torakoabdominal Aortik Anevrizma
TAS	:Total Antioksidan Seviye
TBHQ	:Tertbutilhidroquinon
THQ	:Timohidrokinonun
TK	:Total Kolesterol
TNF	:Tümör Nekrozis Faktör
TOS	: Total Oksidatif Stres
TQ	:Timokinin
OSİ	:Oksidatif Stres İndeksi
VCAM	:Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
VLDL	:Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

ÖZET

Timokinin'in Vasküler Endotel Hücrelerinde İskemi/Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Etkinliğinin Araştırılması

Ahmet KOLAĞASIOĞLU

Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Perfüzyonistlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Giriş: Çeşitli çalışmalarda akciğer, böbrek ve karaciğer gibi organlarda Timokinin'in (TQ) iskemi reperfüzyona karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Biz Timokinin'in abdominal aortada iskemi reperfüzyon hasarında vasküler doku üzerine olası etkisi araştırılması amaçlandı.

Materyal Metod: Onbeş sıçan sham (n:5), kontrol(n:5) ve TQ-tedavi grubu(n:5) olarak üçe ayrıldı. Kontrol ve tedavi grubuna 60 dakika abdominal aort iskemi sonrası 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Tedavi grubunda TQ reperfüzyondan 5 dakika önce 200 mg/kg intraperitoneal verildi. Kan serumunda Total antioksidan kapasite (TAS), Total oksidatif stres (TOS), Oksidatif stres indexi (OSI) ölçüldü, aort dokusu histopatolojik olarak ışık mikroskopunda incelendi.

Sonuçlar: TOS ve OSI aktivitesi sham ve tedavi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük idi ($p < 0.001$ for TOS and OSI). Kontrol grubuna göre tedavi grubu hasar skoru eşit idi.

Tartışma: Akut abdominal aort iskemi reperfüzyon sıçan modelinde Timokinin'in intraperitoneal verilmesi oksidatif stresin azalmasında etkilidir fakat aort dokusu histopatolojik olarak iskemi reperfüzyondan etkilenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, İskemi/Reperfüzyon Hasarı, Timokinin

ABSTRACT

Investigation of Efficiency of Thymoquinone on Vascular Endothelial Cells to Prevent Ischemia /Reperfusion Injury

Ahmet KOLAĞASIOĞLU

Department of Cardiothoracic Surgery-Perfusionist Master thesis

Introduction: Previous studies have demonstrated that thymoquinone (TQ) has protective effects against ischemia reperfusion injury to various organs like lung, renal, hepatic in different experimental models. We aimed to determine whether thymoquinone has favorable effects on vascular tissues and oxidative stress in abdominal aorta ischemia-reperfusion injury.

Material and methods: Fifteen rats were divided into three groups as sham (n:5), control (n:5) and TQ treatment group (n:5). Control and TQ-treatment groups underwent abdominal aorta ischemia for 60 min followed by a 120 min period of reperfusion. In the TQ-treatment group, TQ was given 5 min. before reperfusion at a dose of 20 mg/kg via an intraperitoneal route. Total antioxidant capacity (TAC), total oxidative status (TOS), and oxidative stress index (OSI) in blood serum were measured, and aort tissue histopathology were evaluated with light microscopy.

Results: TOS and OSI activity in blood samples were statistically increased in the control group compared to the sham and TQ-treatment groups ($p < 0.001$ for TOS and OSI). Control group injury scores were statistically equal compared to sham and TQ-treatment groups ($p < 0.001$ for all comparisons).

Conclusions: TQ administered intraperitoneally was effective in reducing oxidative stress in an acute abdominal aorta I/R rat model but histopathologically aorta was not affected by the injury.

Key words: Oxidative stress, Ischemia/Reperfusion Injury, Thymoquinone

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veyaorganların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlananiskemi, hücresele enerji depolarının boşalması ve toksikmetabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümünüyol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu,hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi içinyeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokununreperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemiile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (1).

Bu süreçte dokunun ihtiyacı olan oksijen ve diğer metabolitler sağlanamaz. Oluşan artık maddeler de dolaşım tarafından uzaklaştırılamayıp, doku veya organda birikir. İskemiye maruz kalınan bölgede aerobik metabolizma ile enerji sağlanamaz ve hücreler anaerobik metabolizma yoluyla enerji sağlamaya çalışırlar. İskemi sonrasında, kesilmiş olan kan akımının tekrar sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan metabolitler reperfüzyonla birlikte oksitlenerek dolaşıma karışırlar ve uzak organ hasarında neden olurlar. Buna iskemi/reperfüzyon hasarı (İRH) denir (2,3).

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresele yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (4).

Aort cerrahisinde oluşan reperfüyona, travma ile acil servise getirilen hastalarda oluşan abdominal hasarlar, aort ateroskleroz eşliğindeki akut tromboembolizm veyaabdominal aort anevrisması ve diseksiyon tamiri gibi klinik durumlarda karşılaşılabılır. Yüksek mortalite ve morbidite oranları sistemik inflamatuvar yanıt ve reperfüzyon aşamasında oluşan klinik durumlarla ilişkilidir (5,133,134,135).

İskemi reperfüzyon hasarı tedavisi için birçok ilaç ve antioksidan maddeler denenmiş ve halen üzerinde çalışılmaktadır. Son yıllarda klinikte vasküler endotel hücrelerinde İskemi reperfüzyon hasarını engellemeye yönelik birbirinden farklı yaklaşımlar denenmektedir.

Bu çalışmamızda yine çeşitli çalışmalarda antioksidan özelliği kanıtlanan Thymoquinone'in laboratouar ortamında İRH oluşturulan ratların vasküler endotel hücrelerinde iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkinliğinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılması amaçlandı.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.İskemi/Reperfüzyon Hasarı (İRH)

İskemi;bir dokunun arteriyel ya da venöz kan akımının pıhtı veya mekanik etken gibierhangi bir nedenle azalmasına bağlı yetersiz perfüzyonu sonucu dokunun oksijendenyoksun kalması ve beslenmesinin bozulmasına denir.İskemi sonucunda dokunun hipokside kalmasıyla hipoksik doku hasarı ortaya çıkar.İskemiyle beraber hücrede enerji düzeyi düşer, toksik metabolitler dokuda birikip, hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilenbiyokimyasal reaksiyonlar başlar. İskemiye bağlı hücrelerde pek çok metabolik veyapısal değişiklikler oluşmaktadır (2,3).

Reperfüzyon; iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımınıyeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanmasıve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böyleliklereperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancakoksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyonsürecini başlatır (18,19,20).

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlikettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotelhücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (21,22,23).

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişikliklerin meydana gelir. Dokuya gelen kan akımınıkesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır veadenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjilifosfat sentezi azalır.(6) Hücrede enerji depolarının boşalmasıile hücre zarında bulunan Na⁺,K⁺-ATP az pompasiinhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na⁺ ve Ca²⁺ iyon konsantrasyonlarıartar.(7) Hücre içinde Ca²⁺ iyon konsantrasyonununartışı hücre için sitotoksiktir.(8) Nitekim yinebu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimiile proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinininyapımında artış, buna karşılık antioksidanenzimlerin oluşumunda azalma olur.

Bu durum hücreyireperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar.İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımıdevam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur.Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozinve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucuyüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokudaksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerininbirikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantinoksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlardahipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyondaelektron alıcı NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotidinokside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyleKDH → KO'a dönüştüğünden hipoksantinün ürik asitedönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyondaise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır.(9)

NORMAL ŞARTLARDA:

Hipoksantin ⇨ KDH (NAD⁺ ' yi kullanarak) ⇨ Ksantin ve Ürik asit

İSKEMİDE:

ATP ⇨ Parçalanır ⇨ AMP ve ADENOZİN

ADENOZİN hücre dışına geçer ⇨ İnozin ve Hipoksantin

AMP ⇨ Hipoksantin

KDH ⇨ KO

Reperfüzyon ile:

Hipoksantin ⇨ KO (O₂ ' i kullanarak) ⇨ Ksantin + O₂

KO

Ksantin + 2O₂ + H₂O Ürik Asit + H₂O

Şekil 1: İskemi oluşumu ve reperfüzyon sürecinin gelişimi(16,17)

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücreyel ve humoral olaylar serisidir (16,17).

Özellikle;

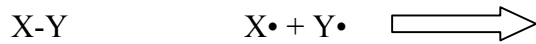
1. Serbest oksijen radikalleri
2. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
3. Kompleman sistemi
4. Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktörhasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

2.1.1. Serbest radikaller

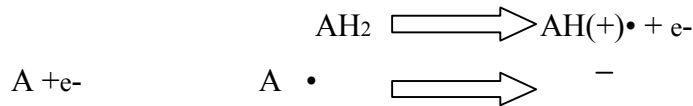
Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. (10)

Radikaller başlıca 2 yolla oluşur;

- 1) **Homolitik bölünme:** Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasındaki ortak elektronlardan birisinin homolitik bölünmesi sonucunda ortaklanmamış elektronlar taşıyan molekül veya atomlar meydana gelir:



- 2) **Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:** Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok bu yolla meydana gelir (11,12)



Radikaller diğer moleküller ile çeşitli şekillerde reaksiyona girerler. İki radikal karşılaştığında paylaşılmamış elektronlarını birleştirirler ve kovalent bir bağ

oluştururlar. Paylaşılmamış bir elektronu bulunan hidrojen atomu da radikaldir ve iki hidrojen atomu kolayca birleşerek diatomik hidrojen molekülünü oluştururlar.

Bir radikal paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir, diğer bir molekülden alabilir veya radikal olmayan bir moleküle bağlanabilir. Bu reaksiyonlardan hangisi olursa olsun radikal olmayan bir molekül sonuçta radikale dönüşür. Serbest radikaller aerobik hücre metabolizmasının bir ürünü olarak sürekli üretilir ve antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulurlar. Oksidatif stres, oksidan-antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikallerin ömürleri çok kısa olmasına rağmen protein, lipid ve nükleik asit gibi makromoleküller ile etkileşimleri sonucu, hücre yapısı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Homeostazisin sürdürülebilmesi, antioksidan kapasitede sürekli yenilenmeyi gerektirmektedir (13,14).

2.1.1.1. Serbest Radikal Türleri

Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırmak mümkündür. (Tablo 1) (14).

Tablo 1. Reaktif oksijen bileşikleri

Radikaller Radikal olmayanlar

Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Alkoksil ($\text{RO}\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Peroksil ($\text{ROO}\cdot$)	Ozon (O_3)
Süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) Lipid hidroperoksit (LOOH)	
Azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) Peroksinitrit (ONOO^-)	

2.1.1.2.Serbest Radikallerin Etkileri

Normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır (24).

Bunlardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz;

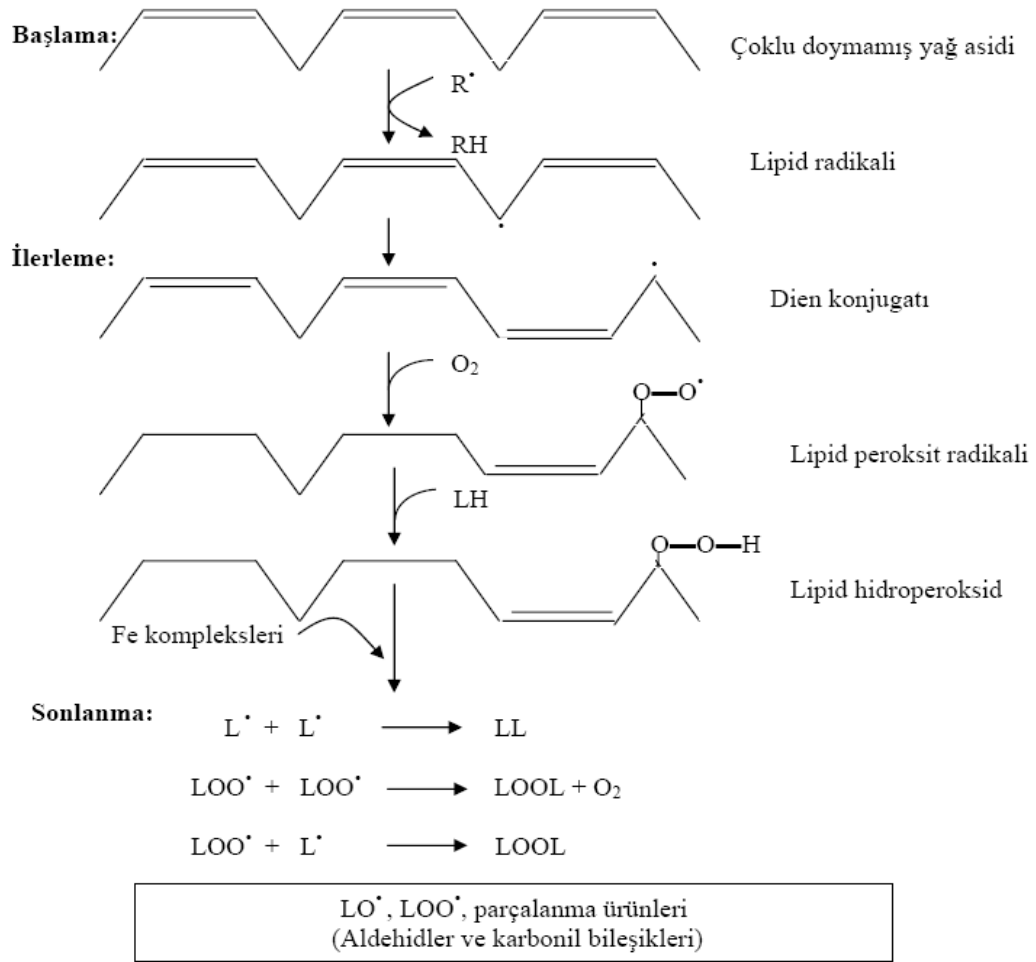
1. Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,
2. DNA' nın tahrip olması,
3. Steroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
4. Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
5. Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
6. Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
7. Protein ve lipitlerle kovalan bağlantılar yapması,
8. Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
9. Proteinlerin tahrip olması ve protein döngüsünün artması,
10. Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi,
11. Kollojen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterosklerotik değişikliklerin oluşmasıdır (32).

2.1.1.3.Serbest Radikallerin Bazı Hücre ve Dokularda Meydana Getirdiği Yıkımlar

a-)Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ

asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir türedir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO-) oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir alkil radikali oluşturur. Lipidperoksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür (19,25,26).

Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membranpotansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipidperoksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membranbileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir (25,26).



Şekil-2: Çoklu doymamış yağ asidlerinin peroksidasyonu (12,27,28).

b-)Protein Oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sülfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfütlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir (25,26).

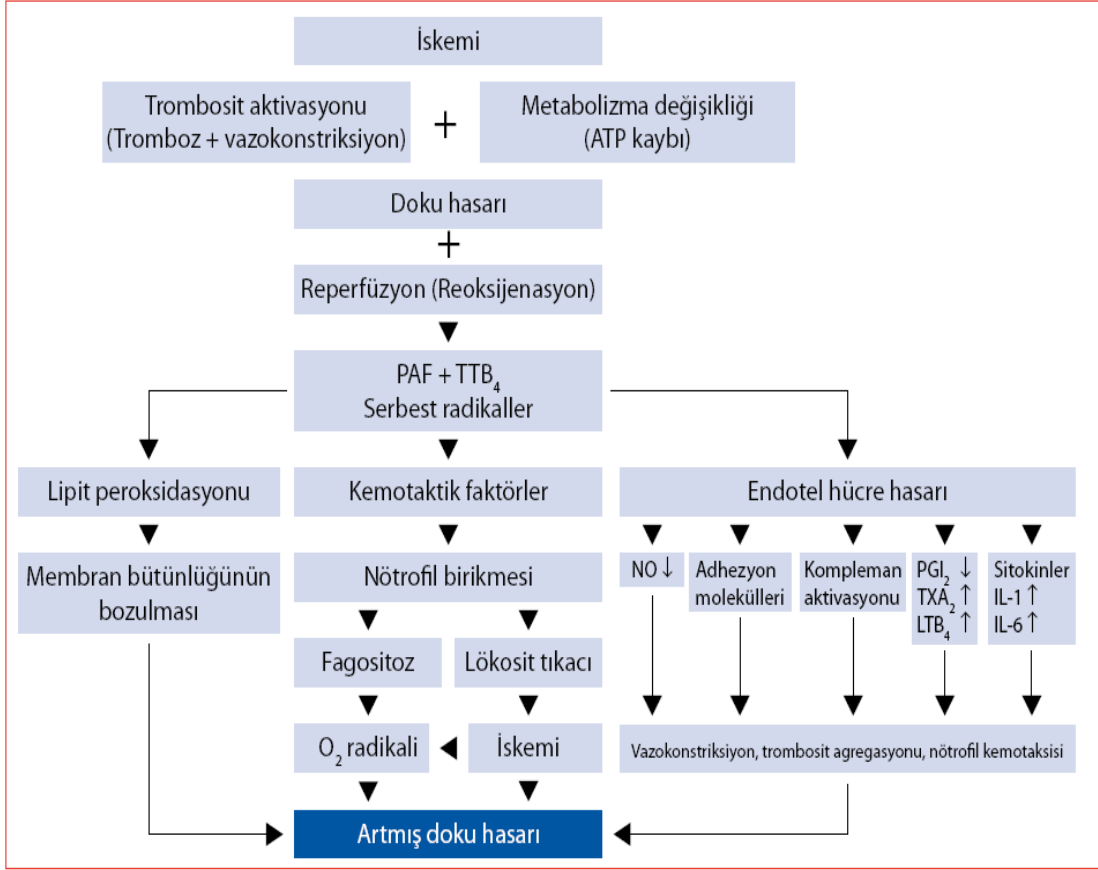
c-) DNA: Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (29,30).

d-) Karbonhidratlara Etkisi: Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile serbest glikoz oksidasyona maruz kalır. Bunun sonucunda reaktif oksidanlar ve protein reaktif dikarbonil bileşikleri üretilir. Sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asid, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (24).

e-) Kovalen Bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir (30).

f-) Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumuntransportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sülfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijenradikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibifaktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler (31).

g-) Karbonhidratlara Etkisi: Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile serbest glikoz oksidasyona maruz kalır. Bunun sonucunda reaktif oksidanlar ve protein reaktif dikarbonil bileşikleri üretilir. Sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asid, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (24).



Şekil-3: İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi.(39)

2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofilserumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyon damikrovasküler permeabiledaki artıştan başlıcanötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir.(136). İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir.(137) Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (138)

Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon
- 2) SOR salınması
- 3) Sitotoksik enzim salınması
- 4) Vasküler permeabilite artışı

5) Sitokinsalınmasında artıştır.

PMN'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır.

Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling).

İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselektin adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktif lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (139). Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlekin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF- κ B) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar (137).

Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen hücre maddeleri, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdıkları maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (1). Yapılan sonuç çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir (140). Hücre ölüm yollarındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalarla gerçekleştirilir (141,142)

Fosfolipaz A₂ aktivasyonu arasıdonik asit metabolitleri(prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.SOR üretimi gerçekleşir.Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlüaracılarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmayaveya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvaryanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı,ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir.Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşımıyoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (1,141).

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotelbağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökositkacaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına,post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damardışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonunbozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıçdöneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O₂ oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-a gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılı keden adhezyon moleküllerinin biosentezinin artmasıneden olur(142,143).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerdeksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksidedönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorikaside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik moleküle kolayca reaksiyona girebilir.

Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (144).

2.1.3. Komplemanın Rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur.

C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve emotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentez uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır (145).

Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1) İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) E-selektin P-selektin C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyarak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (146,147).

2.1.4. Endotel Hücresinin Rolü

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli rol sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumunda kendilerine taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur. (148) Endotel hücrelerinin oksidatif

stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, PAF, prostaglandinler (PG I₂, PG E₂), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A₂ (TxA₂) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendibal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (142).

Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobinin tarafından nitrate (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur.

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bureaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücre sel moleküllerin nitrozilasyonunayol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (149).

2.2. Antioksidanlar

Organizmada oksidan radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu etkisi olan hücre içi enzimatik savunma sistemleri, antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılır (33).

2.2.1. Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki (Scavenging etki): Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Antioksidan enzimler, küçük antioksidan moleküller bu tip bir etki göstermektedirler (33).

2. Bastırıcı etki (Quencher etki): Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etki “bastırıcı etki” olarak adlandırılmaktadır. Vitaminler, bu tarz bir etkiye sahiptirler (35).

3. Zincir kırıcı (Chain-breaking etki): Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye “zincir kırıcı etki” denir (33).

4. Onarıcı etki (Repair etki): Onarıcı etki üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Oksidatif hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu guruba örnek olarak verilebilir (33).

2.2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (33).

Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere antioksidan maddeler denilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ya da reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedirler. Aerobik hücrelerde pek çok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmaktadır (34).

2.2.2.1. Endojen Antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

2.2.2.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz (36).

2.2.2.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalini($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene(O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.

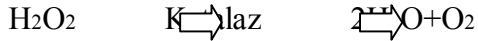


Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2 üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafından düşük tutulur. Ancak, H_2O_2 geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır (40).

2.2.2.1.1.2. Katalaz

Katalaz esas olarak peroksisomlarda, daha az olarak 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 (40).

Katalaz;



2.2.2.1.1.3. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon redüktaz (GSH-R)

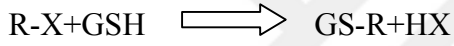
Gerek H_2O_2 ve gerekse LOOH'leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H_2O_2 ve LOOH'leri, selenyum-bağımsız tipi sadece LOOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve LOOH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



GSH-Px'in 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.(41) Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (42).

2.2.2.1.1.4. 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.(42)



2.2.2.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar

Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin(37).

2.2.2.1.2.1. 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 GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemogloblinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır.

Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin

membranlardan transportunu da sağlar.GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatifstrese karşı korumada hayati öneme sahiptir (42).

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 öneme sahip GSH'nın hayvan çalışmalarında yeterli konsantrasyonlardaki lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatojenez 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, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (43).

2.2.2.2. Eksojen Antioksidanlar

2.2.2.2.1. Vitamin Eksojen Antioksidanlar:

- 1) α -tokoferol (vitamin E)
- 2) β -karoten
- 3 Askorbik asit (vitamin C)
- 4) Folik asit (folat)

2.2.2.2.1.1. Vitamin E (α -tokoferol)

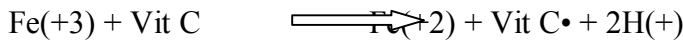
Vitamin E yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır, hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit

radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir. Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna 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 antikanserojenetki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği gösterilmiştir (44).

2.2.2.2.1.2. 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. O₂•-, HO•, singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. C vitamini kornea, lens, aköz hüme, 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 önemli olduğu gösterilmiştir (45).



Bu şekilde oluşan C vitamini radikali çok reaktif değildir, NADH tarafından indirgenir, ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarını durdurur. Karotenoidler Vitamin A'nın ön maddesi olan β-karotenin singlet oksijenle bağlandığı, süperoksit radikaliyi temizlediği ve OH•, alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve

lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Singlet O₂ uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoidlikopendir (38).

2.2.2.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar)
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C (vitamin E analogu),
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)(38).
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri.

2.2.2.3. Ürik asit

Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit, insan dokularında urat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit singlet O₂, peroksil radikalleri, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir.(38)

2.2.2.4. Taurin

Organizmada sistein ve metiyoninden sentez edilentaurin protein yapısına katılmaz ve dokuda serbest olarak bulunur. Taurinin, safra asitlerinin konjugasyonu, kolesterol atılımı, osmoregülasyon, ksenobiyotiklerindetoksifikasyonu, hücre membranının stabilizasyonu ve

hücre içi kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi önemli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Oksidan bir bileşik olan HOCl'yi N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidan hasar oluşmasını engeller (38).

Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı, albümin ise LOOH ve HOCl toplayıcısıdır. Seruloplazminolasilikle 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 demir bağlar. Sistein süperoksit ve hidroksil radikal 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 vesonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir. Desferroksamin serbest Fe³⁺'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 reaksiyonunun kırıcı etkisi vardır. (38)

2.2.2.5. Melatonin

En zararlı radikallerden •OH'ini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi prooksidan aktivitesi de yoktur. Deoksiribonükleik asid hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir (46,47,48).

2.2.2.6.Albumin

Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanmasıyla protein yapısında hasar ortaya çıkar. Ancak albumin yarı ömrü oldukça kısa bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanması ve bu proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albumin kanda serbest yağ asidlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır. Bilirubinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir (49,50).

2.3.Aort Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon Hasarı

Organ korunumuna ilişkin modern yaklaşımlara rağmen abdominal aortik anevrizmaların(AAA) tamirinde yapılan girişimler ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (151,152). İskemi hasarına bağlı olarak gelişen sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS; systemic inflammatory response syndrome) ve çoklu organ yetmezliği (MOF; multiorgan failure) lokal veya uzak doku hasarına yol açarak rüptüre abdominal aortik anevrizmalarında (RAAA; ruptured abdominal aortic aneurysm) mortalite riskini artırmaktadır. Öyle ki anevrizmaya cerrahi müdahale yapılmazdan önce MOF sıklığı %3,8 iken cerrahi girişim sonrasında %64'e yükselmiştir (150). Torakoabdominal aortik anevrizmalarına (TAAA; thoracoabdominal aortic aneurysm) yapılan cerrahi girişimler de oldukça kompleks ve zorlu müdahalelerdir. Bu girişimlerin neticesinde solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği, nörolojik hasar ve hatta ölüm bile beklenebilir. Tüm bu sonuçlar İ/R hasarına bağlı olarak gelişen sistemik enflamatuvar yanıtın sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır. Yetersiz veya sonlanmış heparin uygulaması sonucu oluşan mikrotrombuslar, aortik klemping ile gelişen iskemi ile ilişkilidir. Mikrotrombus oluşumu MOF gibi histopatolojik ve fonksiyonel değişiklikleri de beraberinde getirir. Bu girişimlerde tek sorumlu aort klemping değildir. Antikoagülasyon için kullanılan heparin doğrudan antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Heparinin antiinflamatuvar ve antikoagülasyondaki rolü çeşitli enzimler, hormonlar, biyojenik aminler ve plazma proteinleriyle ilişkilidir (151).

2.4.Total Antioksidan Seviye (TAS)

Normal şartlarda organizma, endojen ve/veya eksojen nedenlerle meydana gelen serbest radikaller ve bu radikallere bağılı olarak gelişen oksidatif stres ile mücadele eden karmaşık bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı antioksidan savunma sistemlerinin çalışarak serbest radikallerin temizlenmesinde kan çok önemlidir. Antioksidanlar kan ile vücudun tamamına taşınır ve dağıtılır (51). Total antioksidan kapasitenin büyük bir kısmı plazmada bulunan antioksidan moleküllerle oluşturulur. Serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi antioksidanların yanında yanında serbest radikalleri kaptan zincir kırıcı antioksidanlar daplazmada bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit gibi antioksidanlar ise plazmadaki total antioksidan seviyenin % 85'inden fazlasını meydana getirir. Çünkü bu antioksidanlar bilirubin, α -tokoferol, flavinoidler, indirgenmiş glutasyon ve β -karoten gibi antioksidanlara oranla plazmada daha yüksek seviyelerde bulunur. Antioksidanlar plazmada kendi aralarında da etkileşim içindedirler. Bu etkileşimler sayesinde antioksidanlar tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla antioksidan etki gösterebilmektedir. Glutasyonun askorbatı, askorbatın da α -tokoferölü yeniden aktifleştirmesi bu sinerjistik etkiye örnek olarak gösterilebilir. Bundan dolayıdır ki total antioksidan durumun belirlenmesi antioksidanların ayrı ayrı ölçülerek belirlenmesinden çok daha değerlidir (52,53).

2.5.Total Oksidatif Stres (TOS)

Vücudumuzda mevcut oksidan ve antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durum Oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stresin toplam değeri Total Oksidatif Stres (TOS) olarak ifade edilir. Bu durum, aşırı miktarda reaktif oksijenradikali ve/veya nitrojen radikallerinin oluşumu veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliğisonucu ortaya çıkar. Reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin seviyelerindeki artış ise hücreleretoksik etki yapar ve hücrenin lipid, protein ve DNA benzeri moleküllerine zarar verir. Bu gibi durumlarda damar endoteli daha az oranda etkilenir.(52,53).

2.5.1.Reaktifler

Reaktif-1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250

μ M Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif-2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

2.5.2.Çalışma Prensibi

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (55).

2.6.Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total oksidanların seviyelerinin, total antioksidanların seviyelerine bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir ve OSI değerinin yüksek olması oksidatif stresin arttığı durumlarda ortaya çıkar (52,54).

$$OSI = \frac{(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.})}{(TAS, \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}) \times 10}$$

2.7.Nigella Sativa (Çörek Otu)

Günümüzde hayvan ve insan sağlığının korunması amacıyla kullanılan ilaçların ve kimyasal maddelerin risk oluşturması nedeniyle beşeri ve veteriner hekimlik ile gıda ve çevre alanlarında yapılan araştırmaların pek çoğu hem hastalıkların tedavisinde hem de koruyucu hekimlikte bitkisel ürünlerin kullanımını teşvik etmektedir (56). Çörek otu ve tohumundan elde edilen preparatlar, ülkemizde olduğu gibi Ortadoğu ve bazı Asya ülkelerinde soğuk algınlığı, çeşitli romatizma ve iltihabi hastalıklar, idrar söktürücü, astım, gaz giderici ve sarılık gibi pek çok hastalığın alternatif tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (57,58).

Çörek otu, Ranunculacea (Düğünçiçeğigiller) familyasının Nigella sativa (NS) türü olup, bitki çeşitliliği bakımından oldukça zengin olan ülkemizde siyah tohum, siyah kimyon

veya bereket tanesi olarak bilinmektedir. Bölgenin iklimine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte NS tohumlarının yapısında, uçucu yağlar (% 0.4-0.45), sabit yağlar (% 32-40) proteinler (% 16-19.9), amino asitler, alkoloidler, tanenler, saponinler, lifler (5.5%), karbonhidratlar (% 33.9), mineraller (% 1.79-3.44), askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit bulunmaktadır. Sabit yağın yapısında doymamış yağ asitlerinden oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit ve linolenik asit bulunurken, doymuş yağ asitlerinden ise miristik asit, palmitik asit ve stearik asit bulunmaktadır. Uçucu yağın yapısında ise nigellon, karvakrol, p-cymene, d-limonen α ve β -pinen'in yanı sıra farmakolojik olarak aktif temel bileşenlerden başlıca timokinin, ditimokinin, timohidrokinon ve timol yer almaktadır (57,58).

Nigella sativa tohumları yağ ve protein açısından iyi bir kaynaktır. Tohumların analizi sonucunda % 20.85 protein,% 38.20 yağ,% 4.64 su, % 7.94 lif ve % 31.94 karbonhidrat içerdiği gösterilmiştir. Kurşun, kadmiyum ve arsenik izine rastlanılmamıştır. Potasyum, fosfor, sodium ve demir baskın elementler olarak bulunurken çinko, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakır daha düşük oranlarda tesbit edilmiştir (68).

Tohumlar potansiyel olarak yağ asitlerinin yaklaşık %84'ü oranında linoleic ve oleic asitten zengin doymamış yağ asitleri içerirken total protein içeriğinin yaklaşık %30'unu oluşturan esansiyel aminoasitleri içermesi nedeniyle önemli bir besin kaynağıdır(68,69).

Nigella sativa tohum yağları ve ekstrelerinde farmakolojik olarak aktif olan thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone ve thymol ölçümlerinde iyi kalite kontrol yöntemleri kullanılmıştır(70). Diğer aktif bileşenler ise indazol çekirdek içeren nigellidineve bronşial astma tedavisinde kullanılan, uçucu yağ fraksiyonundan izole edilen nigellonedir (71). Aynı zamanda Nigella sativada üç flavinoid ve triterpen saponin tesbit edilmiştir(70,72).

Tohumlar doğal aromatik yapıları nedeniyle İtalya, Almanya, Güney Fransa ve Asya'da yemeklerde baharat olarak kullanılmaktadır. Halk hekimliğinde ise Mısır halkı tarafından diüretik, gaz giderici olarak, astma, solunum sıkıntısı ve öksürük tedavisinde kullanılmıştır(71,72).

Yapılan çalışmalar çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antikanserojenik, antitümöral, antiülserojenik, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve analjezik, antioksidan,

hipoglisemikbaşıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğunu göstermektedir.(Resim-1, Resim-2,59,60,61,63,64,65,67)



Resim 1. Çörek otu bitkisi (Anonim 2012a)Resim 2. Çörek otu tohumu (Anonim 2012b)

2.7.1.Timokinin

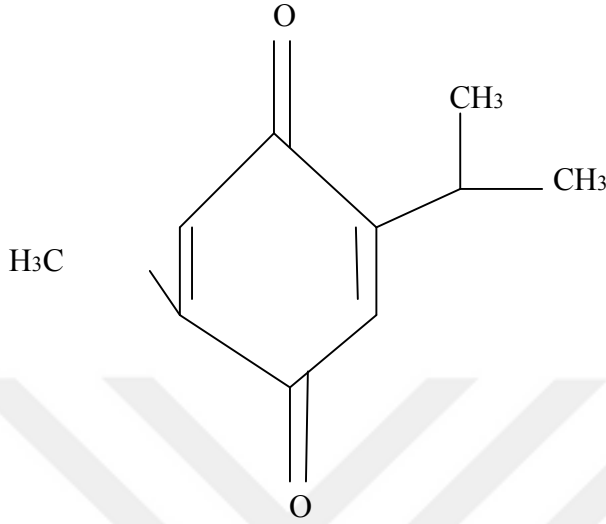
Timokinin (TQ) ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) çörek otu uçucu yağında % 18,4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir (şekil 4) (66).

Nigella Sativa'nınuçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olan thymoquinone($C_{10}H_{10}O_2$; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon (molekül ağırlığı 164,2) uzun yıllar antioksidan, anti-inflamatuar ve antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (73). Yapılan çalışmalarda thymoquinone pek çok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Thymoquinone etkili olduğu kanser türleri; göğüs adenokarsinoması, over adenokarsinoması (74). kolorektal kanser (75), insan pankreatik adenokarsinomu, rahim sarkoması (76). neoplastik keratinosit, insan osteosarkoması (77).fibrosarkoma, akciğer sarkoması olarak sıralanabilir. Ayrıca thymoquinone, androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek hormon-refraktör (cevap vermeyen) prostat kanserini inhibe ettiği bildirilmiştir (78).

Nigella sativa'nın anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-histaminik, anti-mikrobiyal, anti-tümör, hematolojik ve immünomodülatör etkileri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.

Thymoquinone'un farklı mekanizmalarla anti-oksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri

üzerinde radikal temizleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (79). Yapılan deneysel çalışmada demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (80). Hücrel glutasyonu uyararak oksidatif stresi azaltmasında diğer bir anti-oksidan özelliğidir (81).



Şekil-4: TQ'nun kimyasal yapısı (66).

2.7.1.1. Timokinin'in Etkileri

2.7.1.1.1. Antihiperlipidemik ve Antihiperkolesterolemik Etkisi

Günümüzde besinlerde giderek artan yağ içeriğinin, vücut yağ miktarındaki artışa ve obeziteye bağlı olarak hiperleptinemik, hipertrigliseridemik ve hiperkolesterolemik etkilere sebep olduğu bilinmektedir (82, 83). Yapılan çalışmalarda standart yemle beslenen ratlarda 80 mg/kg ve 10 mg/kg dozda peroz olarak verilen TQ'nun vücut ağırlığını etkilemediği bildirilirken, 50 mg/kg dozunda gavajla TQ verilmesi 6 hafta sonunda hem standart diyetle hem de yüksek yağ diyetinde canlı ağırlıkları önemli düzeyde düşürdüğü bildirilmektedir. (66,64,84). Benzer şekilde çörek otu yağının 6. haftadan itibaren canlı ağırlığını düşürdüğü ve bu düşüşün TQ'nun besin alımını azaltıcı etkisinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (85).

Moleküler düzeyde kolesterol seviyesinin düzenlenmesi, LDL reseptör geninin ekspresyonu aracılığıyla LDL'nin hücreye alınması ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG-COAR) geninin baskılanmasıyla da kolesterol sentezinin azaltılması olmak üzere başlıca iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda diyetle % 1 kolesterol ilave edilerek 8 hafta boyunca beslenen ratlarda ticari TQ'nun (20, 50, 100 mg/kg) ve çörek otu tohumlarından elde edilen zengin fraksiyonlu TQ'nun (0, 1, 1,5 g/kg) her ikisinin de canlı ağırlığını, besin alımını, plazma total kolesterol (TK) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyini önemli derecede azalttığı bildirilirken aynı zamanda LDL reseptörü mRNA ekspresyonunun arttığı buna karşın HMG-COAR'ın mRNA düzeyinin belirgin olarak baskılandığı belirtilmektedir (86,87).

Hiperkolesteroleminin, ateroskleroz, miyokardial enfarktüs ve serebral paraliz gibi hastalıkların gelişiminde bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (88). Dolaşımda yüksek dansiteli lipoproteindeki (HDL) artış dokulardaki kolesterolün azaltılmasını sağlarken LDL'deki düşüş de kardiovasküler hastalıkların gelişim riskini azaltmaktadır (89). TQ'nun hipokolesterolemik etkisi, antioksidan kapasitesinden ve gen metabolizmasında etkin rol almasından kaynaklanabilir ki, bu tür antioksidan bileşikler kısmen LDL'yi oksidasyona karşı koruyarak etki göstermektedir (85, 86,87). Nitekim farklı günlerde ve dozlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/kg/gün, i.p.) verilen TQ'nun 4. günden itibaren TK, HDL ve LDL düzeylerini belirgin olarak düşürdüğü belirtilmektedir (90). Bacak Güllü (2010) ratlarda TQ'nun standart diyetlere ilavesi ile kontrole göre HDL ve LDL, yağlı diyetle ilavesinde ise trigliserid (TG), LDL ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) düzeylerini önemli ölçüde azalttığını bildirmektedir. Ayrıca tavşanlarda TQ'nun oksidatif stresi ve aterogenezi azalttığı bildirilmektedir (91). İçme suyuna TQ ilave edilmesinin, doksorubisinin (DOX) indüklediği proteinüri ve albuminüriyi belirgin olarak engellediği ve nefrotik sendromla ilişkili hiperlipidemi ve proteinüri için TQ'nun koruyucu bir bileşik olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (64).

2.7.1.1.2. Antioksidatif Etkisi

Ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça kararsız bir yapı gösteren serbest radikallerin biyolojik yapılarda meydana getirdiği oksitleyici hasarlar, özellikle kardiyovasküler

bozukluklar ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Serbest radikaller elektriksel olarak yüklü olup, hücre membranı içinden geçerek vücuttaki nükleik asitler, proteinler ve enzimler ile reaksiyona girer ve yıkım oluştururlar (67). Çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik gösteren TQ'nun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği bildirilmektedir (93,92). DOX ile indüklenen nefropatide ise TQ'nun lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan özellik gösterdiği ve nefropatiyi baskıladığı bildirilmektedir (64). TQ ve sentetik tertbutilhidroquinon (TBHQ)'un kuvvetli antioksidan ve prooksidan etkileri olduğu ve her ikisi de konsantrasyona bağlı olarak demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilirken, TQ'nun süperoksit anyon süpürücü olarak TBHQ'dan daha aktif olduğu gösterilmiştir (92).

Sıçanlarda yapılan çalışmada koroner, serebral ve periferel damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı TQ'nun koruma sağladığı aynı zamanda TQ'nun çörek otu tohumundaki diğer bileşenlerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (80,94). Ratlarda N- nitro-L-arjinin metil esterleri (L-NAME) ile nitrik oksidin kronik inhibisyonundan sonra verilen TQ'nun glutasyon (GSH) düzeyini artırırken enzimatik ve nonenzimatik sistemlerdeki süperoksit radikallerin in vitro sentezini inhibe ettiği ve bu antioksidan aktivitesi hipertansiyon ve renal hasara karşı korumada umut verici bir bileşik olduğu belirtilmektedir (95). Ratlarda civa klorür tarafından indüklenen renal oksidatif hasarın önlenmesinde TQ'nun apoptozis ve proliferatif reaksiyonları azalttığı ve TQ'nun inorganik civa intoksikasyonunun sebep olduğu akut renal yetmezliğin korunmasında klinik önemi olduğu bildirilmektedir (96). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda kalp ve beyindeki oksidatif stres araştırılmış ve diyabetlilerde glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT)'daki belirgin azalma ile oksidatif stresin olduğu, bu düşük düzeylerin hem çörek otu yağı hem de TQ verilmesi ile iyileştirildiği belirtilmektedir (97).

Kolon içine % 3 asetik asit enjekte ederek kolit oluşturulan ratlarda TQ'nun tam bir koruyucu etki gösterdiği, bu koruyucu etkinin kısmen antioksidan etkisinden kaynaklandığı bildirilmektedir (98). Ratlarda etanol ile indüklenen akut gastritte TQ verilmesinin ülser indeksini ile malondialdehit (MDA) seviyesini azalttığı ve GSH sentezini artırdığı

belirtilmekte ve TQ'nun gastroprotektif etkinliğinin kısmen antioksidan özelliğine bağlı olduğu ortaya konmaktadır (99).

2.7.1.1.3. Anti-diyabetik Etkisi

Diyabet organizmadaki insülin sentezi yetersizliği ya da direnciden kaynaklanmakta olup kan glikoz düzeyinin yüksekliği ile karakterize metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar TQ'nun hipoglisemik ve antidiyabetik (102) etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (65, 60, 100,101).Nitekim ratlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/kg) intraperitoneal yolla verilen TQ'nun glikoz düzeylerini düşürdüğünü bildirmektedir. Timokinin insülin sekresyonu üzerindeki moleküler mekanizması henüz aydınlatılmış olmamakla birlikte, insülin sekresyonunu artırarak glikoz kullanımında artışa ve glikoneogenezi engelleyerek kan glikozunun düşmesine neden olduğu belirtilmektedir (66,100,102). Buna karşın, diyabet olmayan normal ratlara (50 mg/kg/gün, gavaj) TQ verilmesinin diyabetlilerdekinin aksine kontrol gruba göre plazma insülin düzeyini azalttığı ve plazma glikoz seviyesini de artırdığı bildirilmektedir (84).

STZ ile diyabet oluşturulan farelerde gebelik esnasında TQ verilmesinin embriyoların maturasyonu ve büyüklüklerinde artışa neden olduğu ve serbest radikalleri azaltıp embriyo malformasyon oranlarını düşürdüğü bildirilmektedir. Böylece diyabetik dişilerin gebeliklerinde kullanılan TQ'nun yararlı olduğu ortaya konmaktadır (103). Tek doz STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan ratlara enjeksiyondan 3 gün önce başlanarak 4 hafta boyunca 50 mg/kg/gün TQ oral verildiği çalışmada, TQ'nun yüksek olan serum glikoz seviyesini düşürdüğü, düşük olan serum insülin konsantrasyonunu ise arttırdığı bildirilmektedir. Belirlenen bu bulgular ışığında TQ'nun diyabetin neden olduğu oksidatif stresin azalmasında ve β -hücre bütünlüğünün korunmasında tedavi edici etki gösterdiği ve bunun sonucunda da TQ'nun oksidatif strese karşı β -hücrelerinin korunmasında klinik olarak kullanımının faydalı olabileceği belirtilmektedir (104).

TQ'nun (3 mg/kg, 3 gün) insüline bağlı diyabette (tip1) STZ'nin toksik etkisini indirgeyerek patojenik prosesi azaltmada etkili olabileceği, insüline bağlı olmayan diyabette (tip 2) ise yüksek glikoz düzeylerini normalize ederek iyileştirici etkiye sahip olabilecekleri

belirtilirken, TQ'nun bu etkisi serbest radikalleri toplayıcı ve sitoprotektif özelliklerine bağlanmaktadır (105). Benzer şekilde aynı araştırmacılar, STZ'li (45 mg/kg, i.p.) ratlara TQ (3 mg/kg, i.p. 3 ve 30 günlük iki grup) vermişler, 3. ve 30. günlerde insülin düzeylerinin STZ'li grupla karşılaştırıldığında TQ ilave edilen grupta belirgin olarak yükseldiğini ve kontrol grubundaki seviyelere yaklaştığını belirtmektedirler (101).

Glikozillenmiş hemoglobin glikoz ile hemoglobin molekülünün nonenzimatik reaksiyonu sonucu oluşmaktadır ve geçmişe yönelik kan glikozunun takibinde HbA1c düzeyleri klinik önem taşımaktadır (106). Timokinin'in total HbA1C'yi önemli derecede düşürdüğü bildirimleri bulunmaktadır (102, 66). Buna göre normal kontrol, 80 mg/kg TQ verilen normal fareler, diyabetik kontrol ve 20, 40 ve 80 mg/ kg TQ ile muamele edilmiş diyabetik fareler üzerinde yapılan çalışmada, artan TQ miktarlarının HbA1C düzeyinde düşüşe neden olduğu ve en fazla düşmenin 80 mg/kg dozda gerçekleştiği gözlenmiştir. Ayrıca TQ'nun glikoz 6-fosfataz ve fruktoz 1,6-bisfosfataz aktivitelerini düşürdüğü bildirimleri de göz önüne alındığında, TQ'nun glikozun dokularda kullanımını artırarak ve insülin salınımı aracılığıyla glikoneogenezi azaltarak etki ettiği görülmektedir(66).

2.7.1.1.4. Antitümoral ve Antikanserojenik Etkisi

Hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanan kanser, hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Pek çok *invivo* ve *invitro* araştırmalar ile NS tohumlarının ve aktif bileşenlerinin antitümöral etkileri gösterilmiştir. Araştırmalar TQ'nun göğüs ve yumurtalık adenokarsinomu, kolorektalkanser, neoplastikkeratinositler, insanosteosarkomu, fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri gibi pek çok kanser çeşidinde hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır(74,77,78,107,108). Timokinin veditimokinin, sitotoksik etkisini, hücre G1 fazında iken apoptozisi tetikleyerek durdurmaktadır. Hücre büyümesinin durdurulması ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunun artırılması ve anti-apoptotik Bcl-2 proteininin inhibe edilmesi ile sağlanmaktadır (108).

Farelerde benzopirenin indüklediği ön mide karsinomuna ve kemik iliği hücrelerindeki kromozomal bozukluklarda TQ'nun hasarlı hücreleri ve kromozom bozukluklarının frekansını belirgin olarak azalttığı bildirilmiştir (99). TQ'nun antiproliferatif ve proapoptik etkilerinin insan osteosarkoma hücrelerinde araştırıldığı çalışmada TQ, normal osteoblastlara karşı oldukça az toksisite göstermesi nedeniyle umut verici bir bileşik olarak değerlendirilmiştir (77). Ayrıca TQ'nun hepatoselüler karsinoma hücrelerini konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde yavaşlattığı ve hepatosellüler karsinom tedavisi için umut verici bir antikanser bileşiği olduğu gösterilmiştir (110). Yi ve ark (2008) TQ'nun insan umbilikal veni endotel hücre göçünü, invazyonunu, proliferasyonunu ve tüp şekillenmesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar TQ'nun tümör anjiyogenezisini ve tümör büyümesini inhibe ettiğini ve kanser tedavisi için potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. TQ'nun nükleer faktör-B'ye bağımlı antiapoptotik genleri azaltarak kemoterapötik bileşikler tarafından indüklenen pankreas hücrelerinin ölümünde etkili olduğu ve antitümoral ilaçlarla TQ'nun birlikte kullanılmasının ise büyüme inhibisyonunu artırdığı gösterilmektedir (111).

2.7.1.1.5. Sindirim Sistemine Etkisi

Erkek Wistar albino ratlarda akut alkolün neden olduğu gastrik mukozal lezyonlara karşı TQ'nun ve NS yağının gastroprotektif etkisi olduğu ve bu etkinin kısmen onların radikal süpürücü etkilerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (65). Benzer şekilde çörek otu uçucu yağının ve TQ'nun mide mukozasındaki redoks durumunun korunmasıyla ilişkili olarak gastroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (112).

2.7.1.1.6. İmmun Sisteme Etkisi

Doğal bağışıklık, makrofajlar, doğal katil hücreler, granülositler gibi hücreleri kapsarken, kazanılmış bağışıklık ise spesifik antikor salgılayan B hücreleri aracılı bağışıklığı ve CD4+ ve CD8+ T hücreleri aracılı hücresel bağışıklığı kapsamaktadır (113). Nigella sativa yağının ve TQ'nun T hücrelerine ve immün yanıtı aracılık eden öldürücü hücrelerin artışı sağladığı ve önemli immünomodülatör etki gösterdiği ifade edilmektedir (67). İnflamasyonlu

ve otoimmün hastalıklarının iyileştirilmesinde TQ'un makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini azaltarak yararlı olabileceğini ortaya koymuştur. TQ, lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan makrofajların supernatantlarında nitrit üretimini azaltmış, periton makrofajlarındaki indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein düzeyini de konsantrasyona bağlı olarak düşürmüştür (114).

2.7.1.1.7. Analjezik ve Antiinflamatuvar Etkisi

Farelerde TQ'nun ağrının erken ve geç safhalarında etkili olduğu ve ağrıyı baskıladığı bildirilmektedir (63). İnflamasyon, siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) olmak üzere başlıca iki enzim tarafından düzenlenmektedir. Bunlardan COX yolunda prostaglandinler (PG) sentezlenirken, LO yolunda ise lökotrienler (LT) sentezlenmektedir ki bunlar alerji ve inflamasyonda görev almaktadırlar. TQ, kalsiyum iyonofor ile uyarılan rat peritoneal lökositlerindeki araşidonik asit metabolizmasının hem COX hem de LO yollarını inhibe etmektedir. Bu yüzden COX ve LO'nun inhibisyonu, TQ'nun antiinflamatuvar etkilerini düzenleyen anahtar bir faktördür (115). Farelerde allerjik havayolu inflamasyonu modelinde TQ'nun, akciğer eozinofili ve kadeh hücrelerinde hiperplaziye, PGD2 ve COX-2'nin inhibisyonuna neden olduğu, böylece antiinflamatuvar etki gösterdiği belirtilmektedir (116). Ayrıca TQ'nun polimorfnükleer lökositlerden olan 5-lipooksijenazı ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit üretimini inhibe ettiği ve TQ'nun inflamatuvar hastalıkların iyileştirilmesinde etkili olabileceği bildirilmektedir (93).

Benzer bir çalışmada LPS ile indüklenen rat bazofil hücresinde TQ'nun TNF α mRNA ekspresyonunu ve protein üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği ve NF- κ B'nin nükleer transaktivasyonunu modüle ederek proinflamatuvar yanıtları azalttığı belirtilmektedir (117). Pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinde TQ'nun doz ve zamana bağlı olarak COX-2, interlökin (IL)-1beta, TNF- α sentezini azalttığı ve NF- κ B'nin inhibisyonuna paralel olarak antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğunu belirtilmektedir (118).

2.7.1.1.8. Antibakteriyel, Antihelmintik ve Antifungal Etkileri

Çörek otu esansiyel yağının iki ana bileşeni olan TQ ve timohidrokinonun (THQ) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. *S.aureus* TQ'ya yüksek derecede duyarlılık gösterdiği, buna göre TQ'nun 3 µg/ml dozunun bakteriyostatik, 6 µg/ml dozunun ise bakterisit etki için yeterli olduğu bildirilmektedir. *S.aureus*'a karşı bakteriyostatik ve bakterisit etkili olabilmesi için THQ konsantrasyonlarının sırasıyla 400 µg/ml ve 800 µg/ml olduğu ve bu miktarların TQ'nunkinden 100 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir. Diğer Gram-negatif bakteriler hem TQ ve THQ'ya daha az duyarlı bulunmuş olup onların minimum inhibitör konsantrasyonlarının ve minimum bakteriyel konsantrasyonlarının 200 ile 1600 µg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir (62). TQ ve THQ'nun antibiyotikler ile kombinasyonunun *S. aureus*'da sinerjistik etki gösterdiği bildirilmektedir (62). NS tohumlarının yağı ve bileşenlerinin *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel özellikleri araştırılmış ve kloramfenikolün pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada NS yağının antibakteriyel özelliğinin timokininden kaynaklandığı belirtilmektedir (80). NS tohumu dietil eter ekstraktının farelerde öldürücü olmayan derialtı stafilokok enfeksiyonunda, enfeksiyon bölgesine enjekte edildiğinde enfeksiyonu tamamen tedavi ettiği bildirilmektedir (119). Tropikal bir hastalık olan Şistosomiyazis ile enfekte edilen fare hücrelerinde hem çörek otu ekstraktının hem de TQ'nun Şistosomiyazis'in sebep olduğu kromozomal bozuklara karşı potansiyel koruyucu bileşikler olabileceği bildirilmektedir (120).

Çörek otu tohumu ve TQ'nun eter ekstresinin antifungal aktivitesinin araştırılmasından elde edilen bulgular deri mantar enfeksiyonlarının tedavisinde halk ilacı olarak çörek otunun kullanımını desteklemiş ve antidermatofit ilaçlar için bir kaynak oluşturmuştur (121).

2.7.1.1.9. Sinir Sistemine Etkisi

Yapılan çalışmalar, kronik toluene maruz kalan ratlarda TQ ve NS verilmesinin hipokampusdaki nörodejenerasyonlarda morfolojik düzelme sağladığını ve tedavi için kullanımlarının faydalı olabileceğini bildirmektedir (104). Benzer şekilde nöral bozuklukların patolojilerinde TQ'nun nöroprotektif etkili bir bileşik olduğu bildirilmektedir (122).

2.7.1.1.10. Solunum Sistemine Etkisi

Akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) ve akut akciğer yaralanmasında (ALI) tedavi yöntemlerinin çoğu hala destekleyici amaçlıdır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada mide suyunu ile ALI/ARDS oluşturulan ratlarda, TQ'nun hem de steroidlerin akciğer dokusunu insan mide suyunun zararlı etkilerinden koruduğunu ortaya koymaktadır (123). TQ'nun bronşiyal astım ve inflamasyon üzerinde antiinflamatuvar ve immun stimülatör etkiye sahip olduğu araştırılmış olmakla beraber, bu etkilerin mekanizmaları ve faktörleri hakkındaki bilgiler oldukça azdır. (124). El Gazzar ve ark (2006a) ovalbumin farelere havayolu ile verilmeden önce i.p enjekte edilen TQ akciğer eozinofilinde artışa sebep olduğunu bildirmektedir. Aynı zamanda TQ, akciğer dokularında allerjenin indüklediği eozinofilik inflamasyonu ve kadeh hücrelerinden mukus üretimini belirgin olarak inhibe etmiştir. Benzer bir çalışmada TQ'nun deneysel astımda antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (125).

2.7.1.1.11. Dolaşım Sistemine Etkisi

TQ'nun ratlarda doza bağlı olarak arteriyel kan basıncını ve kalp atışını azalttığı bildirilmektedir (126). Kanserin çeşitli tiplerinin tedavisi için kullanılan DOX'un, kardiyomiyopati, kalp krizi ve kardiyotoksitete gibi yan etkileri nedeniyle klinikte kullanımı kısıtlıdır. Yapılan çalışma DOX'un tek doz enjeksiyonundan 5 gün önce verilen TQ'nun (8 mg/kg/gün, p.o) ilacın antitümör aktivitesini azaltmaksızın yan etkisi olan kardiyotoksititeyi iyileştirdiğini bildirmektedir (127).

2.7.1.1.12. Boşaltım Sistemine Etkisi

Çeşitli tümörlere karşı kullanılan etkili bir kemoterapötik ilaç olarak kullanılan ancak nefrotoksite ve kemik iliği fonksiyonlarının inhibisyonu gibi yan etkileri bulunan Cisplatinin, bu olumsuz etkilerine karşı TQ'nun iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Farelere ve ratlara Cisplatinin tek doz enjeksiyonundan 5 gün önce ve 5 gün sonra verilen TQ'nun serum üre ve

kreatinin düzeyinde belirgin bir azalmaya ve kreatinin klirensi ve poliüride de belirgin bir iyileşmeye neden olduğu ortaya konmuş olup TQ'nun nefrotoksiteyi iyileştirdiği gösterilmiştir (128). Hadjzadeh ve ark (2008) ratlarda etilen glikolün neden olduğu böbrek taşları üzerine TQ'nun etkisinin araştırdığı çalışmada TQ'nun idrarda oksalatı azalttığını ve serum kalsiyum düzeylerinin belirgin olarak yükselttiğini belirlemişlerdir. Düşük dozdaki TQ'nun böbrek taşlarının tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

2.7.1.1.13. Karaciğeri Koruyucu Etkisi

Karbon tetraklorürün (CCl₄) neden olduğu hepatotoksositeye karşı TQ'nun koruyucu etki gösterdiğini ve bu etkisinin muhtemelen antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde TQ (8 mg/kg vücut ağırlığı/gün, oral)'nun karaciğer toksisitesini azalttığı görülmüştür (128). Benzer şekilde Mansour (2000) farelerde TQ'nun (16 mg/kg/gün, içme suyu); yükselmiş olan serum enzimleri (ALT, AST ve LDH) ve hepatik MDA düzeyini azaltarak hepatotoksiteyi iyileştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca TQ'nun antioksidan ve anti-inflamatuar özelliğinden dolayı alkolün indüklediği karaciğer hastalıklarının tedavisinde etkin bir bileşik olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (129). TQ'nun oral olarak verilmesinin kimyasal karsinojenlere ve toksositeye karşı TQ'nun profilaktik bir bileşik olarak kullanılabileceği de ifade edilmektedir (130).

2.7.1.1.14. Kemikler Üzerine Etkisi

Femoral bozukluklu olan hayvan modellerinde TQ'nun kemik iyileşmesindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışma sonuçları, TQ'nun önemli yaşamsal ve reproduktif organlarda belirgin bir yan etkisi olmaksızın kemik iyileşmesini arttırdığını göstermiştir (131). Budancamanak ve ark (2006) deneysel artrit üzerinde TQ ve Metotreksat'ın (MTX) koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışma sonucuna göre, MTX'e benzer olarak TQ'nun romatoid artrit tedavisi için faydalı olabileceğini göstermiştir

Özellik	Bulgular
Anti-Oksidan	-Thymoquinone invitro demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonu inhibe etmiştir -Thymoquinone ile sitümüle edilmiş lokositlerin SOR'nin yıkıcı etkilerine karşı korunduğu görülmüştür
Anti-İnflamatuvar	-Thymoquinone rat peritoneal lökositlerinde COX ve Lipooksijenaj yollarını inhibe etmiştir -Thymoquinone alerjik ensefalomyelit, artrit ve kolit modellerinde anti-inflamatuvar etki göstermiştir.
Anti-Histaminik	- Thymoquinone kobaylardan izole edilmiş trakeal ve ileu düz kasında histamin ve seratoninin etkilerini kaldırdı
Analjezik	-Thymoquinone 4 farklıanaljezi modelinde kuvvetli anti-nosiseptif etki göstermiştir
Anti-hipertansif	-Ratlarda intravenöz Thymoquinone verilmesi doza bağımlı olarak kan basıncını ve kalp atım hızını düşürmüştür
Anti-Karsinojenik	-Nigella Sativa tohumları veya Thymoquinone'i de içeren ürünleri benzopirenele indüklenmiş mide tümörlerinden koruduğu ve standart antineoplastik ilaçların sitotoksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir.
Anti-Mutajenik	-Şistozoma ile enfekte edilmiş fare dalak ve kemik iliği hücrelerinde kromozomal sapmalardan koruduğu gösterilmiştir

Tablo 2. Thymoquinone'in farmakolojik özelliklerinin bildirildiği çalışmaların derlemesi (132).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamız Dollvet 24.09.2013 tarihli hayvan etik kurul onay kararı alındıktan sonra, Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'nin 6 Temmuz 2006 tarih ve 2622 sayılı

nüshasında yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair Yönetmelik ile Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma gruplarının oluşturulması

Ortalama ağırlıkları 250-300 gram olan 15 adet Wistar-albino cinsi rat randomize olarak eşit sayıda (n = 5) 3 gruba ayrıldı. Ratlar çalışma öncesinde oda sıcaklığında ve 12 saat ışık 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Tüm ratlar standart koşullar altında şebeke suyu ve standart rat yemi ile beslendi. Girişimden 8 saat önce tüm ratların beslenmesi kesildi.

3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli

Deneyde kullanılan tüm ratlara 8 saat açlık sonrasında Ketamin 87 mg/kg intraperitoneal olarak (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve Xylazine 13 mg/kg (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany) dozlarında intraperitoneal anestezi yapıldı. Gerekli olduğunda deney süresince bir kez olmak üzere ilk dozun yarısı kadar ek doz yapılması planlandı. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, infrarenal abdominal aorta (IAA), dikkatli bir şekilde explore edildi. İAA'ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konuldu. 60 dakika sonra İAA' daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Sham grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (120 dakika) uygulandı ancak bu grupta İ/R oluşturulmadı. İ/R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; IAA'ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batın insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm ratlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 cc'lik enjektör yardımıyla sağventriküler boşluktan kan alındı. Sonrasında iskemik aort doku örneği alındı. Aort doku örnekleri; immunohistokimyasal ve hematoksilen-eosin değerlendirme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Ratlardan alınan kanlar, 5000 rpm'de 10 dakika

santrifüj edildi ve rat plazma örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 derecede saklandı.

3.3. Thymoquinone'in Hazırlanması

Amerika'da faaliyet gösteren SİGMA-ALDRİCH isimli firmadan 5 gr. % 99 saf Thymoquinone içerikli materyal satın alma yöntemiyle aracı ithalatçı firma aracılığıyla temin edildi. Alınan Thymoquinoneserum fizyolojik ile çalışmaya uygun bir şekilde enjeksiyona hazırlandı.

3.4. Deney Grupları ve Protokol

Deney üç gruptan oluştu.

Grup 1 (Sham, n=5): Çalışma boyunca anestezi uygulaması dışında hiç bir işlem gerçekleştirilmedi. Normal reperfüzyon süresine uyan 120 dakika sonunda doku ve kan örneği alındı.

Grup 2 (Kontrol, İR, n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 60 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı, ilaç verilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

Grup 3 (İR + Thymoquinone (TQ) n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 60 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi sonrası 20 mg/kg timokinin uygulandı. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

3.5. Vasküler Endotel Yapının Histopatolojik İncelenmesi

Histopatolojik inceleme için aort dokuları ayrı ayrı %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fikse edildi. Örnekler parafin bloklara gömüldü. 5 mikronmetrelik kesitler alındı. Hematoksilen eozin boyası ile boyandı. 20 objektiflik büyütme kullanıldı.(Olympus BX51 TF, USA) Histopatolojik parametre olarak interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz değerlendirildi. Yok:0 var:1 belirgin:2 olarak kabul edildi. Her örnek için tüm parametre skorları toplanarak histolojik skor belirlendi.

3.6. TASÖlçümü

Örneklerin TAS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir (45). Dokulardaki TAS sonuçları Trolox Equivalent/gram protein olarak ifade edildi.

3.7. TOS Ölçümü

Örneklerin TOS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanılır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L olarak ifade edilir (81). Dokulardaki TOS sonuçları $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/gram protein olarak ifade edildi.

3.8. OSİ Hesaplanması

Örneklerin OSİ hesaplanırken TAS değerleri 10 ile çarpılarak TOS ile birimler eşitlenir. Örneklerin içerdiği TOS düzeylerinin, örneklerin içerdiği TAS oranı OSİ olarak belirtildi (82). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

$$\text{OSİ} = \frac{(\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.})}{(\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}) \times 10}$$

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmede SPSS paket programı kullanıldı. Gruplar arası niceliksel verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup parametreleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlı bulunan gruplara tekrardan Mann-Whitney U

testi kullanıldı. Her iki test için de $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4.BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 15 rat dahil edildi ve her grupta 5 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Ratların tümüne çalışma protokolü uygulanıp, çalışma sonunda ratlardan kan ve doku örnekleri alındı ve ratlar sakrifiye edildi. Ratlardan alınan kan örneklerinde TAS, TOS ve OSİ parametreleri ölçülüp Gruplar arası istatistiksel olarak kıyaslandı (Tablo 3).

Uzman patolog tarafından yapılan histopatolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen skorlar istatistiksel olarak kıyaslandı. Tüm gruplara ait örnekleri Resim 3'te sunulmuştur. Gruplara ait histopatolojik skorlama istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır.

Tablo 3. Gruplar Arası TAS, TOS ve OSİ Karşılaştırılması

	TAS	TOS	OSİ
SHAM	1.47±0.14 ^a	77.11±10.08 ^a	5.22±0.36 ^a
KONTROL	1.39±0.08 ^a	150.16±19.96 ^b	10.63±0.90 ^b
TİMOKİNİN	1.66±0.16 ^{ab}	117.12±11.09 ^b	7.09±0.25 ^c

$X \pm S\bar{x}$ = Aritmetik ortalama±Standart hata. a, b, ve c harfleri gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=5$).

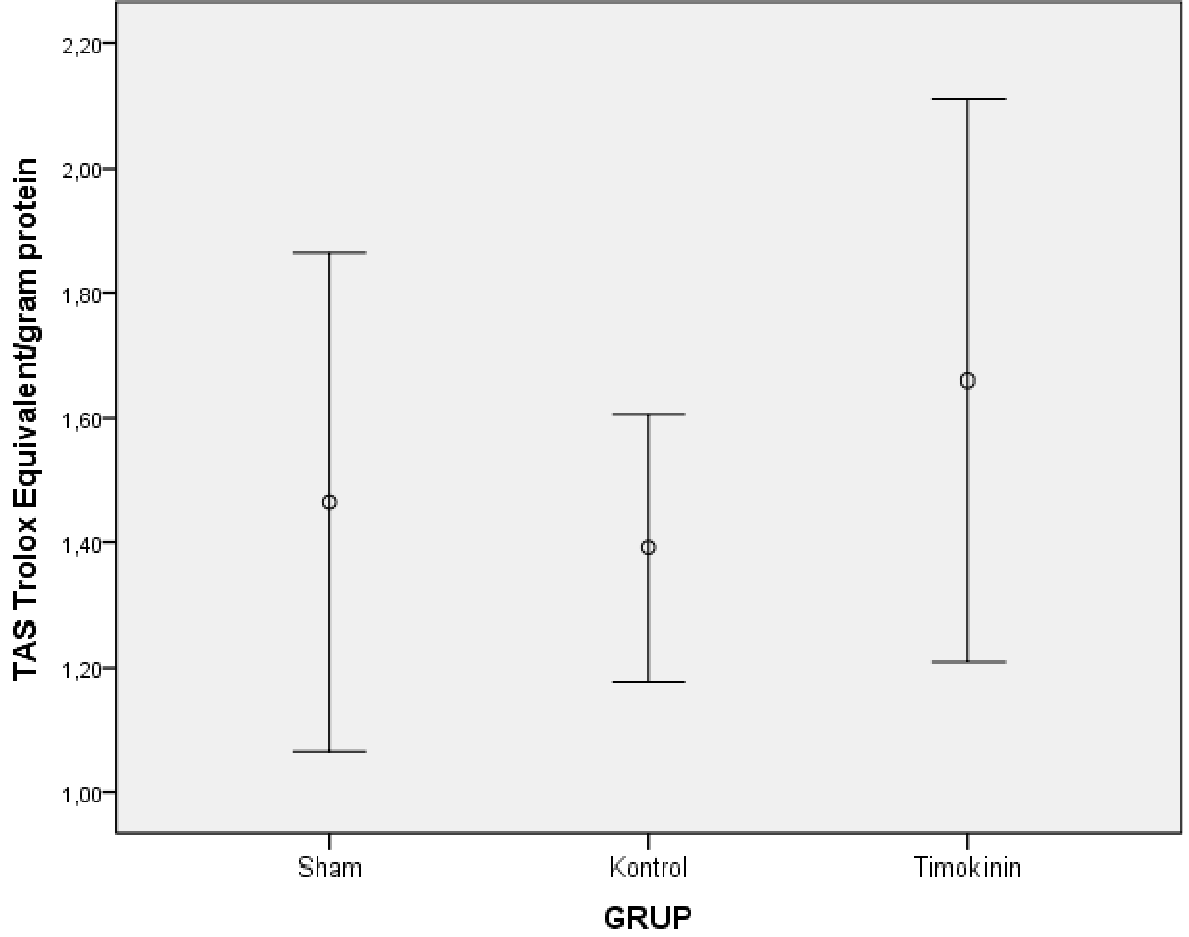
4.1. Grupların TAS Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama TAS değerleri hesaplandığında en düşük değerinin kontrol grubunda (1.39 ± 0.08 mmol Troloks Eqv./L) olduğu en yüksek değerinin ise TQ grubunda (1.66 ± 0.16 mmol Troloks Eqv./L) olduğu saptandı (Tablo 3, Grafik 1) .

TAS gruplar arasında kıyaslandığında;

1-Sham ve TQ gruplarının TAS değerleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

2-TQ grubu TAS değeri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. ($p<0.05$).



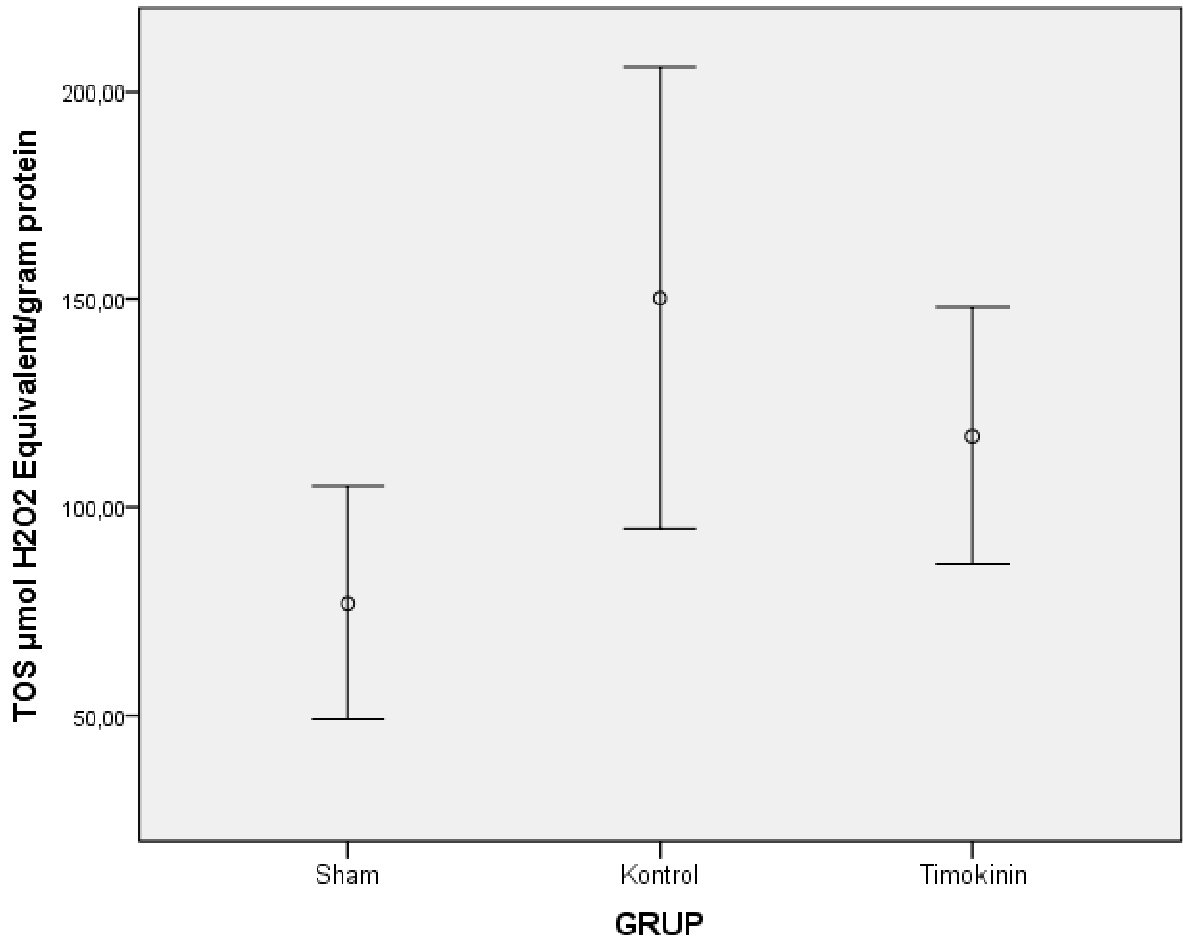
Grafik 1: Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması

4.2. Grupların TOS Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama TOS değerleri hesaplandığında en düşük değerinin Sham grubunda ($77.11 \pm 10.08 \mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eqv./L}$) olduğu en yüksek değer ise Kontrol grubunda ($150.16 \pm 19.96 \mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eqv./L}$) olduğu saptandı (Tablo 3, Grafik 2).

1-Sham ve TQ gruplarının TOS değerleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p < 0.05$).

2-Sham grubu TOS değeri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. ($p < 0.05$).



Grafik 2: Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması

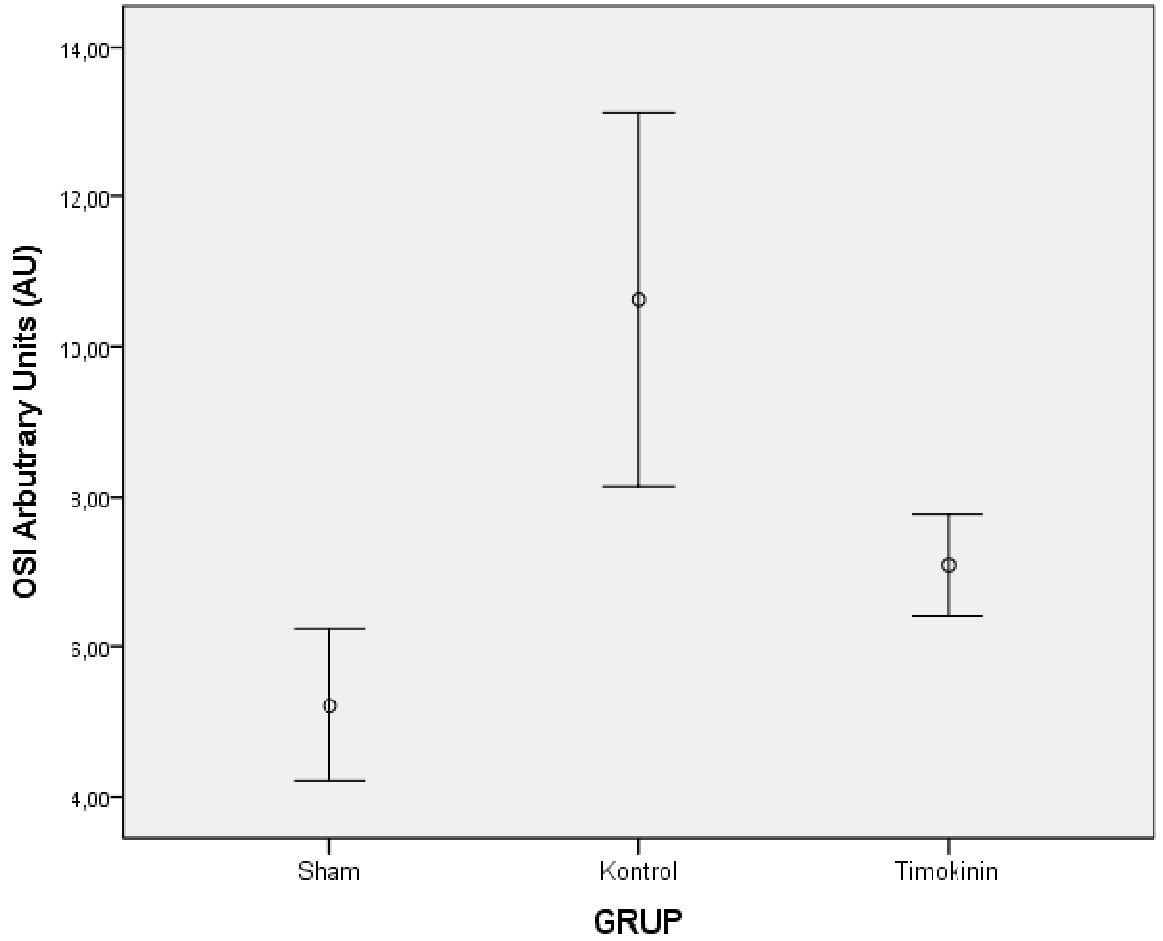
4.3. Grupların OSİ Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama OSİ değerleri hesaplandığında en düşük değerinin Sham grubunda ($5.22\pm 0.36\text{AU}$) olduğu en yüksek değerin ise Kontrol grubunda ($10.63\pm 0.90\text{AU}$) olduğu saptandı (Tablo3, Grafik 3).

OSİ gruplar arasında kıyaslandığında;

1-Sham veTQ gruplarının OSİ değerleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0.05$).

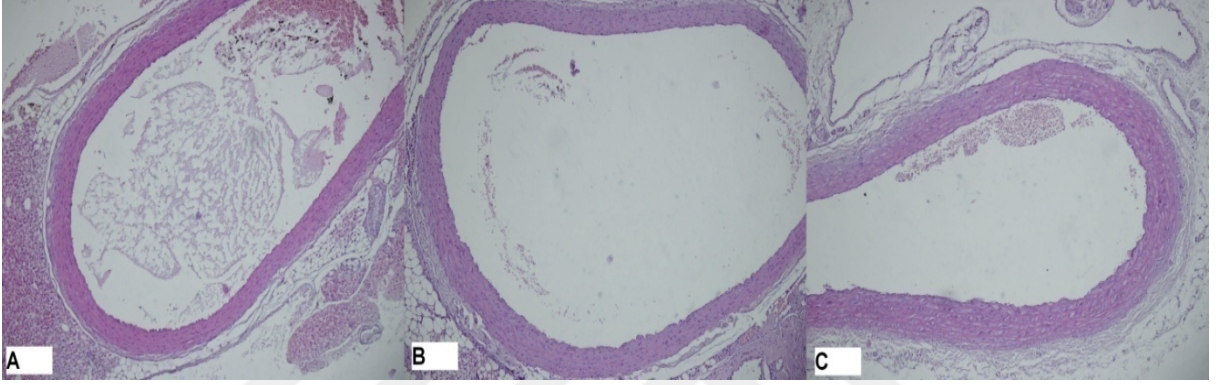
2-Sham grubu OSİ değeri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. ($p<0.05$).



Grafik 3: Gruplar arası OSİ değerlerinin karşılaştırılması

4.4. Grupların Histopatolojik Hasar Skorlarının Karşılaştırılması

Sham, Kontrol ve Timokinin gruplarından alınan aort dokuları histolojik değerlendirme için ele alındı. Her örnek için tüm parametre skorları toplanarak histolojik skor belirlendi. Elde histopatolojik görüntülerden edilen verilere göre Sham, kontrol ve timokinin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. İskemi ve ardından yapılan reperfüzyon sonucu kanda oksidan ve antioksidan parametrelerde değişiklik olmasına rağmen aort dokusunda herhangi bir patoloji tespit edilememiştir.



Resim 3. Mikrovasküler klemp ile sıçan aortu oklüzyonunun vasküler endotel hasarı oluşturma etkisinin incelenmesi

5.TARTIŞMA

Günümüzde kalp damar cerrahisi operasyonları ve diğer cerrahi operasyonların hemen hepsinde alternatifi olmayan bir uygulama olan klemp işlemi yapılmaktadır. Klemp cerrahi sahada cerrahlara birçok çalışma avantajları sağlasada diğer taraftan yaptığı iskemiile bulunduğu alandaki doku, organlara ve aynı zamanda yaptığı iskemi reperfüzyon hasarı ile uzak doku, organlara hasar verdiği yapılan bilimsel çalışmalarda kanıtlanmıştır. Oluşan bu iskemiyle beraber hücrede enerji düzeyi düşer, toksik metabolitler dokuda birikip, hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilenbiyokimyasal reaksiyonlar başlar. İskemiye bağlı hücrelerde pek çok metabolik veyapısal değişiklikler oluşmaktadır.

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veyaorganların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlananiskemi, hücrenel enerji depolarının boşalması ve toksikmetabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümünenyol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu,hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi içinyeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokununreperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemiile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (1).

Bu süreçte dokunun ihtiyacı olan oksijen ve diğer metabolitler sağlanamaz. Oluşan artık maddeler de dolaşım tarafından uzaklaştırılamayıp, doku veya organda birikir. İskemiye maruz kalınan bölgede aerobik metabolizma ile enerji sağlanamaz ve hücreler anaerobik metabolizma yoluyla enerji sağlamaya çalışırlar. İskemi sonrasında, kesilmiş olan kan akımının tekrar sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan metabolitler reperfüzyonla birlikte oksitlenerek dolaşıma karışırlar ve uzak organ hasarında neden olurlar. Buna iskemi/reperfüzyon hasarı (İRH) denir (2,3).

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içinmoleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijenradikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizmarol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazladuyarlı olan hücrenel yapılar, zar lipitleri, proteinler,nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (4).

Vasküler hemostazda endotel bütünlüğü en önemlikriterdir (153,154). Hemostazın sağlanmasında vasküler endotelhücesinin birçok rolü vardır. Membran permeabilitesinin kontrolü, vasküler tonusun nitrik oksit (NO) salgılanarak ayarlanması, endotel kaynaklı gevşeticifaktör salgılanması, vasküler endotel hücresi tarafindangerçekleştirilmektedir(155). Endotel hücreleri, vasküler düz kas büyüme faktörlerini ve dolayısı ile de kasın büyümesini kontrol eder.(156) Ayrıca fiziksel bir bariyer olarak kan pıhtılaşma faktörleri ve subendotel yerleşimli elemanların etkileşiminde kontrol sağlar. Endotel hücre hasarı bütün bu hassas dengeyi bozarak trombosit adezyonu, agregasyonu ve degranülasyonuna neden olur (157). Bu durum kan akımı azalmasında tromboza neden olur. Bunlara ek olarak trombositlerden salgılanan 'platelet derived growth factor' (PDGF) gibi potent mitojenlere bağlı olarak düz kas hücrelerinden intimala göç ve proliferasyon görülür (158,159).

Ip ve ark.(160) koroner endoteldeki hasarlanmayı üç tip olarak sınıflandırmış ve özellikle tip 3 hasarın koronerarterlerde darlığa ve tıkanmaya neden olabileceğini bildirmişlerdir. Ip ve ark.nın.(160) sınıflamasında endotel hasarlanma; tip 1: endotel tabakada fonksiyonel değişikliğe rağmen normal morfoloji, tip 2: endotel tabakada hücresel ayrılma lokal soyulma ve intimal hasar oluşmasına rağmen internal elastik lamina ve media tabakasının sağlam kalması, tip 3: endotel tabakada soyulmayla beraber subendotelial dokunun ortaya çıkması; intimal ve medial hasar olarak tanımlanmıştır.

Okazaki ve ark.nın(161) çalışmasında ise endotel hasarı beş evre olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamada;

evre 1: normal morfoloji,

evre 2 ve 3: kan hücrelerinin az veya yaygın adezyonu (tip 1 hasarın karşılığı),

evre 4: endotel hücrelerinde seyrek izole ayrılma (tip 2 hasar karşılığı),

evre 5: yaygın endotel hücresi yokluğu (tip 3 hasar karşılığı) olarak tanımlanmıştır.

Özellikle tip 3 (evre 5) hasar gelişimi ile subendotel tabakanın yaygın olarak ortaya çıkması, kan elemanlarının butabaka ile teması sonucu trombosit agregasyonuna ve trombus oluşmasına neden olacak, PDGF gibi mitojen faktörlerle düz kas proliferasyonu ve göçünü

tetikleyecek, bunların sonucu olarak da koroner cerrahi sonrasında ya da geç dönemde anastomoz alanında darlık veya tıkanmaya yol açabilecektir (154,159,160,162).

Vurgulanması gereken önemli bir diğer konu da, koroner cerrahisi uygulanan insanların kalplerindeki damarların aterosklerotik olması nedeni ile endotel fonksiyon bozukluğunun zaten var olmasıdır (163).

Kullanılan ek yöntemlerde zaten var olan endotel fonksiyon bozukluğunda da artıracaktır. Deneysel hayvan modeli çalışmalarında aterosklerotik damar endotelinden farklı olan normal damar endoteli kullanılmaktadır ve doğal olarak normal endotelin hücresel yanıtı aterosklerotik endotelin yanıtından farklı olacaktır.

Gertz ve ark.(164) çalışmalarında, tavşan karotis arterlerine geçici cerrahi klip ile oklüzyon uygulamasının endotel hücre hasarı oluşturma potansiyelini tamame kesit elektron mikroskopisi incelemesi ile araştırmışlardır.

Cerrahi klip uygulanan bölgenin elektron mikroskopisinde, endotel hücrelerinde krater oluşması ve hücre şişmesi, endotel hücrelerinde yassılaşma, hücrelerarası konneksiyonun kaybolması ve endotel hücre soyulması gözlemlenmiştir. Bu bulgulara daha çok klemp uygulanan bölgenin distalinde rastlanmıştır ve ilerleyen süreçte tromboza ve restenoza neden olabileceği bildirilmiştir (164).

Hanger ve ark. nın(165) kalp nakline giden hastalarda gerçekleştirdiği son çalışmada, intrakoroner şant yerleştirilmesi işleminin, koroner damarın etrafında elastik dikiş geçirilerek sıkılması yöntemi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek oranda endotel hasarı ve plak rüptürüne neden olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmanın alt grubunda ise kontrol grubu olarak alınan şant veya koroner damarın etrafından elastik dikiş geçirilerek sıkma işlemi uygulanmayan bölgedeki koroner endotelde orta (tip 2) veya şiddetli (tip 3) derecede endotel hasarına rastlanmamıştır.

Koroner oklüzyon için damarın etrafından elastikdikiş geçirilerek sıkma işlemi uygulanan grupta isekontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek orandaendotel hasarı gözlemlenmiştir.

Thymoquinone, Nigella Sativa'dan elde edilen aktif bileşenidir ve kanıtlanmış teröpatik özelliklerinden dolayı medikal bitkiler arasında popüler olmuştur. Anti-oksidatif, Anti-inflamatuar, anti-neoplastik, gastroproktetif, anti-epileptik, anti-histaminik gibi birçok özellik gösterir. (Tablo 2) En önemli özelliği anti-oksidan etki göstermesidir. Anyon temizleyici gibi davranıp oksijen radikallerini nötralize eder. İRH'nda meydana gelen SOR birçok hastalığın patogenezinde rol aldığından anti-oksidan özelliğinden dolayı birçok deneysel ve klinik çalışmalarda Thymoquinone ve Nigella Sativa ürünleri kullanılmıştır (132).

Ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça kararsız bir yapı gösteren serbest radikallerin biyolojik yapılarda meydana getirdiği oksitleyici hasarlar, özellikle kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Serbest radikaller elektriksel olarak yüklü olup, hücre membranı içinden geçerek vücuttaki nükleik asitler, proteinler ve enzimler ile reaksiyona girer ve yıkım oluştururlar (67). Çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik gösteren TQ'nun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü olduğu ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği bildirilmektedir (93,92). DOX ile indüklenen nefropatide ise TQ'nun lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan özellik gösterdiği ve nefropatiyi baskıladığı bildirilmektedir (64). TQ ve sentetik tertbutilhidroquinon (TBHQ)'un kuvvetli antioksidan ve prooksidan etkileri olduğu ve her ikisi de konsantrasyona bağlı olarak demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilirken, TQ'nun süperoksit anyon süpürücü olarak TBHQ'dan daha aktif olduğu gösterilmiştir (92).

Sıçanlarda yapılan çalışmada koroner, serebral ve periferel damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı TQ'nun koruma sağladığı aynı zamanda TQ'nun çörek otu tohumundaki diğer bileşenlerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (80,94). Ratlarda N- nitro-L-arjinin metil esterleri (L-NAME) ile nitrik oksidin kronik inhibisyonundan sonra verilen TQ'nun glutasyon (GSH) düzeyini artırırken enzimatik ve nonenzimatik sistemlerdeki süperoksit radikallerin in vitro sentezini inhibe ettiği

ve bu antioksidan aktivitesi hipertansiyon ve renal hasara karşı korumada umut verici bir bileşik olduğu belirtilmektedir (95). Ratlarda civa klorür tarafından indüklenen renal oksidatif hasarın önlenmesinde TQ'nun apoptozis ve proliferatif reaksiyonları azalttığı ve TQ'nun inorganik civa intoksikasyonunun sebep olduğu akut renal yetmezliğin korunmasında klinik önemi olduğu bildirilmektedir (96). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda kalp ve beyindeki oksidatif stres araştırılmış ve diyabetlilerde glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT)'daki belirgin azalma ile oksidatif stresin olduğu, bu düşük düzeylerin hem çörek otu yağı hem de TQ verilmesi ile iyileştirildiği belirtilmektedir (97).

Kolon içine % 3 asetik asit enjekte ederek kolit oluşturulan ratlarda TQ'nun tam bir koruyucu etki gösterdiği, bu koruyucu etkinin kısmen antioksidan etkisinden kaynaklandığı bildirilmektedir (98). Ratlarda etanol ile indüklenen akut gastritte TQ verilmesinin ülser indeksini ile malondialdehit (MDA) seviyesini azalttığı ve GSH sentezini artırdığı belirtilmekte ve TQ'nun gastroprotektif etkinliğinin kısmen antioksidan özelliğine bağlı olduğu ortaya konmaktadır (99).

Hayvan modelleri, insanlarda iskemik kalp hastalıklarının patogenezinin ve iyileşme sürecinin daha anlaşılabilirliği için ön araçlar olacak şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca hayvan modelleri, hem etik hem de pratik nedenlerden dolayı yeni tanı ve tedavi edici yöntemleri geliştirmek ve test etmek için tek yoldur. Araştırmacı hayvan modellerinde; türleri, tedavi süresi ve yöntemini, serum örneklerini, doku örneklerini ve en uygun koşullarda ölçüm için gerekli diğer malzemeleri seçme şansları vardır. Bu olanakları sağlamak insan deneklerle yapılan çalışmalarda imkânsız olmasa da çok zordur. Bu nedenle hayvan modeli olarak çalışmada sıçan modeli üzerinde planlandı.

Bu çalışmadaki amacımız, kalp damar cerrahisinde sıkça görülen postoperatif komplikasyonlardan biri olan iskemi reperfüzyon hasarını (İRH) ratlarda abdominal aort damarına travmatik olmayan bir mikrovasküler klempe koyarak oluşturmak ve meydana gelen İRH'ında Thymoquinone'in antioksidan özelliğini; alınan kan örneklerinde TAS, TOS, OSİ parametreleri ve vasküler endotel hücrelerdeki histopatolojik hasar üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Ratlarda abdominal aorttaya travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konularak oluşturduğumuz bu İ/R deney modelinde, pek çok çalışmada antioksidan özelliği kanıtlanan timokinin deneyimizde de bu özelliğini gösterdiğini düşünmekteyiz. TQ verdiğimiz gruptaki TAS değerini kontrole göre daha yüksek; TOS ve OSİ değerlerini ise daha düşük bulduk.

Aort dokusunda histopatolojik değişiklik bulunamaması aort dokusunun iskemi reperfüzyona dirençli olduğundan kaynaklandığı düşünüldü. Litaratür taramasında aort iskemi reperfüzyon ile çalışmalar kısıtlı olduğundan iskemiye duyarlılığı açısından bizim yayınınımızın bir örnek teşkil edeceği kanaatindeyiz.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Ratlarda abdominal aortta travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konularak oluşturduğumuz İR deney modelinde elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde;

Ratlarda klemp ile abdominal aortta oluşturduğumuz deneysel İR sonucu oksidatif stres oluşmakta ve buda lokal hasar oluşturmaktadır. Bunun üzerine Thymoquinone verildiğinde biyokimyasal olarak antioksidan özelliği ile İRH'nda koruyucu özellik gösterdiği düşüncesindeyiz

Kalp Damar cerrahisi operasyonlarda pratikte kullanılan klemp uygulaması iskemi altındaki doku ve reperfüzyondan sonra meydana gelen İR nedeniyle uzak doku ve organlarda oksidatif stresten dolayı etkilenmektedir. Timokinin yapılan diğer bilimsel çalışmalarda ve yaptığımız hayvan deneyi laboratuvar çalışmamızda da antioksidan özelliği ile bu etkiyi azalttığı görülmektedir.

Ayrıca çalışmamıza ekleyeceğimiz birkaç değişik kategori TQ antioksidan özelliği ve histopatolojik hasarı önleyici özelliği hakkında bize daha detaylı ve faydalı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Düşündüğümüz bu yöntemlerden ilki, intraperitoneal uygulama yanı sıra timokinin'i oral formda da denemek. Oral yolla TQ ile beslenen ratların intraperitoneal TQ uygulanan ratları arasındaki istatistiksel değer farkları bizlere TQ'in faydalı veriliş yolu hakkında önemli bilimsel veriler göstereceği kannatindeyiz.

Yine çalışmamıza kalpte iskemi hasarını gösteren kreatinin fosfokinaz, kreatinin kinaz MB gibi ekleyeceğimiz birkaç biyokimyasal parametre ile TQ'in histopatolojik hasarı engellemedeki etkinliği hakkında önemli bilimsel veriler vereceği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak;Yaptığımız çalışmada Thymoquinon'in diğer bilimsel çalışmalarda da görülen antioksidan özelliği ile iskemi reperfüzyona bağlı gelişen İRH'nı anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür

Klinikte meydana gelen oksidatif stres endekslerini ve hücre hasarlarını timokinin klinik alanlarda kullanılmasıyla tedavi edilebileceği kanaatindeyiz. Ancak timokinin klinik tedavide kullanılabilmesi için gelecekte yapılacak daha kapsamlı bilimsel prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- 1- Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am 1992; 72: 65-83.)
- 2- Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı Klinik Gelişim Dergisi.2009;22: 5-13.
- 3- Kandilci HB, Gümüşel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2005; 25:1 35-49.).
- 4- Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr 1990; 137:1-53.
- 5- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemiareperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. World J Surg. 2002; 26 (1):11521-2.
- 6- Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. Annu Rev Med 1991; 42: 225-46.
- 7- Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. Free Radic Res Commun 1989;7: 255-64.
- 8- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. Ann Neurol 1992; 32 Suppl: 33-42.
- 9- Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. Am J Physiol. 1988 May;254(5 Pt 1):768-74.
- 10- Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. Massachusetts: ESA Inc. 1997, 1-4
- 11- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993;49(3):481-93.
- 12- Southorn PA, Powis O. Free radical in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc 1988;63(4):381-9.

- 13-Bekereciođlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest RadikallerSendrom 1998;10(3):85-94.
- 14-Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injurymediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg1991;161(4):488-503.
- 15-Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and rolein human disease. Am J Med 1991;91(Supp 3C):14-22.
- 16-Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg 1997; 14:195-203.
- 17-Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. Fundam Clin Pharmacol 2001; 15: 293-306.
- 18-Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C,Elhan AH. Reperfusion injurydelays healing of intestinal anastomosis in a rat. Am J of Surgery 1998; 176: 348-51.
- 19-Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery 1994; 81: 637-47.
- 20-Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America1992; 72: 65-83
- 21-Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS withinand without. Circ Res. 2000;86: 117-18.
- 22-Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K,Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemimodelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımınınmortaliteye etkisi. Klinik ve Deneysel Cerrahi 2000, 8;1: 10-6.
- 23-Bathe OF, Chow AWC, Phang PT.Splachnic origin of cytokines in a porcine modelof mesenteric ischemia-reperfusion. Surgery 1998, 123;1: 79-88.
- 24-Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom 2000;9:31-9.
- 25-Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action inbiological systems. J Lipid Res. 2000; 39:1529-42.
- 26-Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid vetotal antioksidan seviyesinin(TAS) önemi.Cerrahi Tıp Bülteni 2001,2;4: 154-67.
- 27-Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan dengeyietkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1998;11:336-41.

- 28- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12 Pt2):1819-28
- 29- Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-52.
- 30- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-70
- 31- Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998,27;2: 289-307
- 32- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Hücre zedelenmesi adaptasyonu ve ölümü. Çevikbaş U (Ed.). Robbins Temel Patoloji 7th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2003 : 3-9
- 33- Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003; 666-667: 387-92
- 34- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi*, 2002; 33:110-8.
- 35- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *Free Rad Res.* 1998; 28:672-78
- 36- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- 37- Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
- 38- Akkuş İ, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yayınları, 1995; 1-60.
- 39- Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1345-52.
- 40- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.

- 41- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16: 577-86.
- 42- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
- 43- Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1988; 37: 231-49.
- 44- González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. [Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine] *Rev Invest Clin*. 2008; 60: 58-67.
- 45- Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002; 11: 79-84.
- 46- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004;75(7):765-90.
- 47- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336(3):186-95.
- 48- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17(3):347-57.
- 49- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74(1):139-62.
- 50- Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* II 1998;342-6.
- 51- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1998; 32: 1-8.
- 52- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004; 37: 112-9
- 53- Ghiselli A, Serafini M, Natella F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29: 1106-14.
- 54- Erol MK. Yoğun bakım hastalarında propofol, deksmedetomidin ve midazolam infüzyonlarının sedasyon, oksidan – antioksidan sistem üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa 2011.

- 55-Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 2005.
- 56-Dattner AM.. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to future. *Dermatol Ther*, 2003;16: 106-13.
- 57-Baytop T.. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. İ.Ü. Yayınları 1984: No:3255,
- 58-Randhawa MA, Al-Ghamdı MS. A review of the pharmaco-therapeutic effectes of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res*, 2002;41(2): 77-83.
- 59-Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwanı S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 2007;67: 7782-8.
- 60-Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999;67:135-42.
- 61-Kanter M, Demir H, Karakaya C, Özbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2005: 11(42): 6662-6.
- 62-Halawani E. Antibacterial acativity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research*, 2009;3(5-6): 148-52.
- 63-Abdel-Fattah AFM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone in mice. *European Journal of Pharmacolog*, 2000;400: 89-97.
- 64-Badary OA, Abdelnaim AB, Abdel-Wahap MH, Farid MA, Hamada FMA. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 2000;143: 219-26.
- 65-Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagı MN, Al-Bekairı AM, Elmazar MMA. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Research*, 1998;44: 56-61.
- 66-Parı L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*, 2009;85: 830-4.

- 67- Salem ML. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 2005;5(13-14): 1749-70.
- 68- Al-Jassir MS. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*. 1992; 45: 239-42
- 69- Nergiz C, Otlis S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. *Food Chemistry*. 1993; 48: 259-61.
- 70- Sayed MD. Traditional medicine in health care. *Journal of Ethnopharmacology*. 1980; 2: 19-22.
- 71- Atta-ur-Rahman, Malik S, Hasan SS, Choudhary MI, Ni C, Clardy J. Nigellidine. A new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Letters*. 1995; 36: 1993-96.
- 72- Mehta BK, Mehta P, Gupta M. A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa*. *Carbohydr Res*. 2009 Jan 5;344(1):149-51
- 73- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*. 2004;11(1):56-64.
- 74- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*. 2003; 22:107-13.
- 75- Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C, et al. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(14):5609-18.
- 76- Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res*. 1998; 18(3A):1527-32.
- 77- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2007; 6(2):160-9.
- 78- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Aug 15;67(16):7782-8.

- 79- Kruk I, Michalska T, Lichsztełd K, Kładna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*.2000;41:1059-64.
- 80- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*; 2010: 76 : 210-6.
- 81- Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi H, Desin T. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum*. 2003;39:440-5.
- 82- Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Polish J Pharmacol*, 2003: 55: 763-9.
- 83- Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, Akbari NA, Azarmie Y, Fakhrjoo A, Andalib S, Maleki-Dizaji N. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol*, 2009;126(3):525-32.
- 84- Bacak G 2010. Yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda timokinin'in plazma leptin, karnitin, paraoksanaz, tiroid hormonları, insülin ve glikoz ile lipid profiline etkilerinin araştırılması. AKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tez no: 2010-005, Afyonkarahisar.
- 85- Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002: 79: 23-26.
- 86- Al-Naqeep G, Ismail M, Yazan LS. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. *Journal of Functional Foods*, 2009;1(3): 298-303.
- 87- Ismail M, Al-Naqeep G, Wei Chan K. *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010: 48: 664-72.
- 88- Child P, Kuksis A Critical role of ring structure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro. *J Lipid Res*. . 1983: 24(9):1196-209.

- 89-Nofer J. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 2002;161(1), 1-16.
- 90-Bamosa AO, Ali BA, Al-Hawsawi Z A. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2002;46(2): 195-201.
- 91-Ragheb A, Attia A, Elbarbry F, Prasad K, Shoker A. Attenuated combined action of cyclosporine a and hyperlipidemia on atherogenesis in rabbits by thymoquinone. *eCAM*, 2009:1-9.
- 92-Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003;26(2): 87-98.
- 93-El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HPT. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002;81: 161-4.
- 94-El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats *International Journal of Cardiology*, 2004;93: 19-23.
- 95-Khattab MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res*,2007;21: 410-4.
- 96-Fouda, AMM, Daba, MHY, Dahab, GM, Sharaf El-Din, OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008;103: 109-18.
- 97-Hamdy NM, Taha R. Effects of nigella sativa oil and thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacology* 2009;8: 127-34.
- 98-Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology Letters*, 2003;143: 133-43.
- 99-Arslan S O, Gelir E, Armutçu F, Coşkun O, Gürel A, Sayan H, Çelik IL. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutrition Research*.2005: 25: 673-80.

- 100- Hawsawı ZA, Alı BA, Bamosa AO. Effect of *Nigella sativa* (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi Medicine*, 2001;21: 242-44.
- 101- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shına T, Matsuyama H, El-Sayeda M, Takewakı, T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International Immunopharmacology*, 2005b;5: 195-207.
- 102- Fararh, KM, Shimizu, Y, Shına, T, Nıkamı, H, Ghanem, MM, Takewakı, T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*, 2005;79: 219-23.
- 103- Al-Enazı MM. Effect of thymoquinone on malformations and oxidative stress-induced diabetic mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007;10(18): 3115-9.
- 104- Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res*, 2008;33: 579-88.
- 105- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shına T, Matsuyama H, Nıkamı H, Takewakı T. Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect.2005a.
- 106- Ezenwaka CE, Seales D, Surujlal R, Mathura RP. Glycated haemoglobin A1c measurement in stored whole blood sample is reliable for clinical use. *West Indian Med J*. 2009 58(1):17-20.
- 107- Galı-Muhtasıb H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol*, 2004a;25(4): 857-66.
- 108- Galı-Muhtasıb HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*, 2004b: 15: 389-99.
- 109- Badary OA, Abd-Ellah, MF, El-Mahdy, MA, Salama, SA, Hamada, FM.. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2007: 45: 88-92.

- 110- Ahmed WA, Hassan SA, Galeb FM, El-Taweel MA, Abu-Bedair FA. The in vitro promising therapeutic activity of thymoquinone on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Global Veterinaria*, 2008;2 (5): 233-41.
- 111- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*. 2009;69(13): 575-83.
- 112- El-Abhar H S, Abdallah D M, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003;84: 251-58.
- 113- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1996;9:532-62.
- 114- El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan M A, Shimizu Y, El-Sayedc MG, Minamotob, N, Takewakia T. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International Immunopharmacology*, 2002;2: 1603-11.
- 115- Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Med Chem*, 2004;19: 431-6.
- 116- El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunology Letter*, 2006;106: 72-81.
- 117- El Gazzar MA, El Mezayen R, Nicolls MR, Dreskin SC. Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NF-kappaB nuclear transactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007;177:556-64.
- 118- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)*, 2009;1(5): 373-81.
- 119- Hanafy MS and Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol*, 1991: 34, 275-78.

- 120- Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. *Mutation Research*, 2002; 516: 11-17.
- 121- Aljabre SHM, RandhawaMA, Akhtar, N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005;101: 116-19.
- 122- Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagı MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus *European Journal of Pharmacology*, 2006;543: 40-47.
- 123- Işık AF, Katib I, Bayram I, Hanefi Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2005;28: 301-5.
- 124- El Gazzar M, El Mezayen R, Mareckı JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*, 2006a: 6: 1135-42.
- 125- El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Mareckı JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006b: 1760: 1088-95.
- 126- El Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol*, 1993;24(5): 1123-31.
- 127- Nagı MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*, 2000;41(3): 283-89.
- 128- Al-Gharably N, Badary O, Nagı MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of thymoquinone against carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Res Commun Pharmacol Toxicol*, 1997;2: 41-50.
- 129- Alsaif MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *J of Med Sci*, 2007: 7(7)1164-70.

- 130- Nagi MN, Almakkı HA. Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res*, 2009;23: 1295-8
- 131- Kiruı PK, Cameron J, Benghuzzi HA Tuccı, M Patel R, Adah F, Russell G. Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomed Sci Instrum*, 2004; 40: 111-6.
- 132- Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009 Sep;20(5):741-52.
- 133- Carvalho AC, Guillaumon AT, Cintra EA, Figueiredo LC, Moreira MM, Araújo S. Plasmatic vasopressin in patients undergoing conventional infrarenal abdominal aorta aneurysm repair. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2011;26(3):40412-3.
- 134- Harkin DW, Barros D'sa AA, McCallion K, Hoper M, Halliday MI, Campbell FC. Circulating neutrophil priming and systemic inflammation in limb ischaemiareperfusioninjury. *IntAngiol* 2001;20(1):7889.
- 135- Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgeryassociated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J VascEndovascSurg* 1997;14(5):351359.
- 136- Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanismof Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration inthe Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 1996; 61: 469-72.
- 137- Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 738-47.
- 138- Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusioninjury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
- 139- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional-molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27: 2514-23.
- 140- Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:481-97.
- 141- Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-86.

- 142- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia—reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-70.
- 143- Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376): 1-43.
- 144- Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.
- 145- Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-70.
- 146- Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42: 125-38.
- 147- Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-60.
- 148- García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48:109-14.
- 149- Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
- 150- Pulathan Z., Altun, Hemşinli D., Mentşe A., Yuluğ E., Civelek A. "Role of Ethyl Pyruvate in Systemic Inflammatory Response and Lung Injury in an Experimental Model of Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm". *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID: 857109.
- 151- Yener A.M., Çiçek M.C., Genç S.B., Özkan T., Doğan E., Bilgin B.Ç., Akın T., Erdem H., Ankarali H. " Protective role of heparin in the injury of the liver and kidney on the experimental model of ischemia/reperfusion". *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2014; 9:35-6.

- 152- iong J, Zhang M, Guo W., Liu X., Yin T., Jia X., Zhang H., Xu Y., Wang L. "Early malperfusion, ischemia reperfusion injury and respiratory failure in acute complicated type B aortic dissection after thoracic endovascular repair". *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2013; 8:17-8.
- 153- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3: 2007-18.
- 154- Vanhoutte PM. The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med* 1988;319:512-3.
- 155- Billiar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995;221:339-49.
- 156- Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 1993;44: 395-418.
- 157- Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP. Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 1987;75: 636-42.
- 158- Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86: 8412-6.
- 159- Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 1994;81,1254-69.
- 160- Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15,1667-87.
- 161- Okazaki Y, Takarabe K, Murayama J, Suenaga E, Furukawa K, Rikitake K, et al. Coronary endothelial damage during off-pump CABG related to coronary-clamping and gas insufflation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19.834-9.
- 162- Hangler HB, Pfaller K, Antretter H, Dapunt OE, Bonatt JO. Coronary endothelial injury after local occlusion on the human beating heart. *Ann Thorac Surg* 2001;71:122-7.
- 163- Chavanon O, Perrault LP, Menasché P, Carrier M, Vanhoutte PM. As originally published in 1996: Endothelial effects of hemostatic devices for continuous

cardioplegia or minimally invasive operations. Updated in 1999. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1118-20.

- 164- Gertz SD, Rennels ML, Forbes MS, Kawamura J, Sunaga T, Nelson E. Endothelial cell damage by temporary arterial occlusion with surgical clips. Study of the clip site by scanning and transmission electron microscopy. *J Neurosurg* 1976;45:514-9.
- 165- Hangler H, Mueller L, Ruttman E, Antretter H, Pfaller K. Shunt or snare: coronary endothelial damage due to hemostatic devices for beating heart coronary surgery. *Ann Thorac Surg* 2008;86:1873-7.

