

K.K.T.C.  
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇÖREKOTUNUN (NIGELLA SATIVA L.) BİYOLOJİK ETKİLERİ  
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Suna YANAROĞLU

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS PROJESİ

LEFKOŞA  
2011

K.K.T.C.  
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇÖREKOTUNUN (NIGELLA SATIVA L.) BİYOLOJİK ETKİLERİ  
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Suna YANAROĞLU

Biyokimya Programı  
YÜKSEK LİSANS PROJESİ

PROJE DANIŞMANI  
Prof. Dr. GÜLDAL MEHMETÇİK

LEFKOŞA  
2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Yüksek Lisans Projesi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ  
Yakın Doğu Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Güldal MEHMETÇİK  
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Dudu ÖZKUM  
Yakın Doğu Üniversitesi

**ONAY:**

Bu proje, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Proje çalıőmamın her aşamasında bana yol gosteren, bilgi ve deneyimlerini, destek ve katkılarını esirgemeyen, değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Güldal MEHMETIK'e yardımlarından dolayı en içten teőekkürlerimi sunarım.

Projemin hazırlanması süresince her zaman yanımda olan arkadaşlarıma ve hayatım boyunca tüm yardım ve destekleri ile bugünlere gelmemi sağlayan kıymetli aileme teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Yanaroğlu, S. örekotunun (*Nigella sativa L.*) Biyolojik Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Projesi, Lefkoşa, 2011.**

*Nigella sativa* , halk arasından bilinen adıyla çörekotu, genellikle Akdeniz kıyılarında yetişen otsu bir bitkidir. Bitkinin tohumları ve tohum yağı alternatif tıpta soğuk algınlığı, baş ağrısı, romatizma ve daha pekçok rahatsızlığın tedavisinde binlerce yıldır kullanılmaktadır. *Nigella sativa* tohumlarının kimyasal içerikleri ve tohum yağının fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Uçucu yağın analizlenmesi sonucunda *Nigella sativa*'nın temel etken bileşeninin Timokinon olduğu bulunmuştur. *Nigella sativa*'nın ve temel bileşeni Timokinon'un anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-histaminik, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-tümör ve immünomodülatör etkileri gösterilmiştir ve *Nigella sativa*'nın kanın pıhtılaşması üzerindeki hematolojik etkileri tespit edilmiştir. Bunların yanısıra *Nigella sativa*'nın olası toksik etkileri araştırılmıştır. Bu alışmada *Nigella sativa*'nın söz konusu etkileri üzerinde durulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Çörekotu, *Nigella sativa*, uçucu yağ, Timokinon, anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-tümör, anti-mikrobiyal, toksisite, anti-inflamatuar, anti-histaminik, koagülasyon.

## ABSTRACT

**Yanaroğlu S. A Research on Biological Effects of Black Cummin (*Nigella sativa* L.). Near East University, Faculty of Pharmacy Biochemistry Programme, Master's Project, Nicosia, 2011.**

*Nigella sativa*, popularly known as the black cummin, is a herbaceous plant that usually grows on the Mediterranean coast. Plant seeds and seed oil are used as alternative medicine for thousands of years in the treatment of colds, headaches, rheumatism and many other disorders. Chemical content of *Nigella sativa* seeds and physicochemical properties of the seed oil were investigated. As a result of analyzing the essential oil of *Nigella Sativa*, Thymoquinone was found to be the main active ingredient. *Nigella Sativa*'s and its main ingredient Thymoquinone's anti-diabetic, anti-oxidant, anti-histaminic, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-tumor and immunomodulatory effects were investigated and haematological effects on blood clotting have been identified. In addition, the possible toxic effects of *Nigella Sativa* were also investigated. This study will focus on these effects of *Nigella Sativa*.

**Key Words:** Black cummin, *Nigella sativa*, volatile oil, Thymoquinone, anti-diabetic, anti-oxidant, anti-tumor, anti-microbial, toxicity and anti-inflammatory, anti-histaminic, coagulation.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. <i>Nigella sativa</i> 'nın kimyasal kompozisyonu ve lipid fraksiyonunun fizikokimyasal karakteristikleri	3
2.2. <i>Nigella sativa</i> 'nın temel etken maddesi: Timokinon	7
2.3. <i>Nigella sativa</i> 'nın farmasötik etkileri	7
2.3.1. Anti-Diyabetik etkiler	8
2.3.2. Anti-Oksidan Etkiler	19
2.3.3. Anti-İnflamatuvar Etkiler	24
2.3.4. Anti-Histaminik Etkiler	28
2.3.5. Anti-Mikrobiyal Etkiler	30
2.3.6. Anti-Tümör Etkiler	33
2.3.7. Hematolojik Etkiler	39
2.3.8. İmmünomodülatör Etkiler	42
2.4. <i>Nigella sativa</i> 'nın Potansiyel Toksisitesi	48
KAYNAKLAR	51

## KISALTMALAR DİZİNİ

•OH	Hidroksil Radikali
5-HPETE	5-hidroperoksieikosatetraenoik asit
a*	Tonlama
ADP	Adenozin difosfat
ALP	Alkalin fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
b*	Doygunluk
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
CC-5	Kromatografik fraksiyon 5
CCl <sub>4</sub>	Karbon tetraklorür
CD4	Cluster of differentiation 4
CD44	CD44 geni tarafından kodlanan antijen
CD62L	L-selektin
CD8	Cluster of differentiation 4
Chk2	DNA hasarına yanıt olarak aktive olan bir protein kinaz
CIE Lab	Commission Internationale de L'Eclairage , Uluslar arası Aydınlatma Komisyonu L* , a* ve b*
Con A	Konkanavalin-A
COX	Siklooksijenaz
DCFH-DA	2',7'-diklorfloresan-diasetat
DLA-assit	Dalton lenfoma
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTQ	Ditimokinon
E2F-1	E2F-1 geni tarafından kodlanan transkripsiyon faktörü
EAE	Experimental Autoimmun Ensephalomyelitis, Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit
EAK	Ehrlich Assit Karsinomu
FLAP	5-lipooksijenaz aktive edici protein



GDP	Guanin difosfat
GGT	Gamma glutamil transferaz
GSH	Glutasyon
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
ICAM-1	İnterselüler Adhezyon Molekülü - 1
IFN-g	İnterferon gamma
IgE	İmmünglobulin E
IL	İnterlökin
L*	Aydınlatma
LD50	Letal doz 50
LFA-1	Lenfosit işlev bağlantılı antijen - 1
LO	Lipoksigenaz
LPS	Lipopolisakkarit
LTA <sub>4</sub>	Lökotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Lökotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Lökotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Lökotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Lökotrien E <sub>4</sub>
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MCMV	Murin (sıçan) sitomegalovirüsü
MCP-1 (CCL2)	Monosit Kemotaktik Protein – 1 (Kimokin Ligand 2)
MIP-1a (CCL3)	Makrofaj İnflamtuar Protein – 1a (Kimokin Ligand 3)
MIP-1h (CCL4)	Makrofaj İnflamatuar Protein – 1h(Kimokin Ligand 4)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NK	Natural Killer, doğal katil hücreler
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit anyon radikali
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
p53	Protein 53
P815	Fare lenfoblast benzeri mastositoma hücre dizisi

PEPCK	Fosfoenol pirüvat karboksi kinaz
PFA	Koruma faktörü
PGE	Prostaglandinler
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PHA	Fitohemogglutinin
PHG <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RANTES (CCL5)	Aktivasyon üzerinden regüle edilen, Normal T-hücrelerinden eksprese edilen ve Salgılanan (Kimokin Ligand 5)
ROS	Reactive Oxygen Species , Reaktif Oksijen Türleri
S-180	Sarkoma 180
SDS PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi
SOD	Süperoksit dismutaz
SPF	Yüksek perdeleme gücü
STZ NA	Streptozosin Nikotinamid
STZ	Streptozotosin
TH1	T helper 1
TH2	T helper 2
THQ	Timohidrokinon
THY	Timol
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktörü - alfa
TQ	Timokinon
UDP	Urasil difosfat
UV	Ultra viyole
VCAM-1	Vazküler Hücre Adhezyon Molekülü - 1
YAC-1	Doğal katil hücrelere duyarlı fare lenfoma hücre dizisi

## ŞEKİLLER

### Sayfa

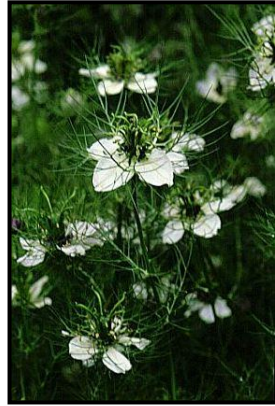
1.1.	<i>Nigella sativa</i> bitkisi	1
1.2.	<i>Nigella sativa</i> tohumları	1
2.1.	<i>Nigella sativa</i> yağının temel bileşenleri ve kimyasal gösterimleri	2
2.2.1.	Timokinonun kimyasal yapısı	7
2.3.1.1.	Timokinonun OGTT Üzerine Etkisi	14
2.3.1.2.	Fararh ve arkadaşlarının (2005) çalışmasına göre timokinonun HbA1c yüzdesi üzerine etkisi.	18
2.3.1.3.	Pari ve Sankaranarayanan'ın çalışmasına göre timokinonun HbA1c yüzdesi üzerine etkisi.	19
2.3.6.1.	<i>Nigella sativa</i> 'nın sulu ekstraktının YAC-1 lenfoma hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkisinin efektör:hedef oranı 200:1'de gösterimi.	39
2.3.8.1.	<i>Nigella sativa</i> sulu ekstaktının makrofajların NO üretimi üzerindeki doza bağımlı inhibisyon etkisi.	45
2.3.8.2.	<i>Nigella sativa</i> sulu ekstraktının splenositlerden IL4 ve IL10 (TH2 sitokinler) ve IFN $\gamma$ (TH1 sitokin) salınımı üzerine doza bağımlı etkisi	47

**TABLÖLAR****Sayfa**

<b>2.1.1.</b> Tunus ve İnan'dan toplanan <i>Nigella sativa</i> tohumlarının kimyasal içerikleri.	<b>3</b>
<b>2.1.2.</b> Tunus ve İnan'dan toplanan <i>Nigella sativa</i> tohumlarının yağ asidi kompozisyonları	<b>4</b>
<b>2.3.1.1.</b> Kontrol ve deney farelerinin plazma glukoz ve insülin düzeylerindeki değişim	<b>13</b>
<b>2.3.1.2.</b> Diyabetik farelerde timokinonun açlık kan şekeri üzerine etkisi.	<b>15</b>
<b>2.3.1.3.</b> Kontrol ve deney farelerinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz enzim aktivitelerindeki değişim.	<b>16</b>
<b>2.3.1.4.</b> Kontrol ve deney farelerinde glukoz 6-fosfataz ve Fruktoz 1,6-bisfosfataz enzim aktivitelerindeki değişim.	<b>16</b>
<b>2.3.2.1.</b> <i>Nigella sativa</i> yağı ve temel bileşeni timokinonun anti-oksidan aktiviteleri.	<b>23</b>
<b>2.3.5.1.</b> <i>Nigella sativa</i> yağı ve timokinonun antibakteriyel özellikleri.	<b>32</b>

## 1. GİRİŞ

*Nigella* (*Nigella sativa* L.) , *Ranunculaceae* familyasına mensup (Al-Gaby, 1998) ve çoğunlukla Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yetişen otsu bir bitkidir (Gad ve ark. , 1963). Halk arasında bilinen adıyla çörekotu, *Nigella sativa* türü bitkilerin kapsül içerisinde oluşan tohumudur (Bkz. Şekil 1.1. – 1.2.). Yeni bir yemeklik yağ kaynağı olarak düşünülen *Nigella* tohumu yağının insan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yeri vardır.



**Sekil 1.1.** *Nigella sativa* bitkisi.

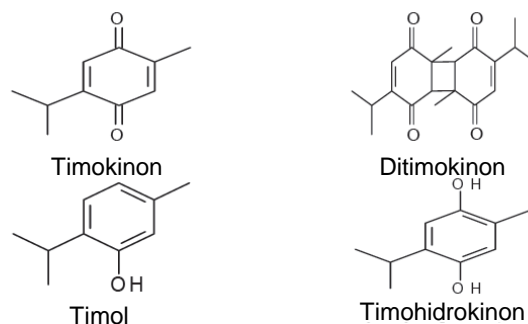


**Sekil 1.2.** *Nigella sativa* tohumları.

Çörekotu tohumu ve tohumundan elde edilen preparatlar eskiden olduğu gibi günümüzde de hala Uzakdoğu ve bazı Asya ülkelerinde halk hekimliğinde, soğuk algınlığı, baş ağrısı, astım, gaz giderici, idrar söktürücü, sarılık, çeşitli romatizma ve iltihap hastalıkları ve benzeri pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Ghamdi, 2001). Bu tohum yağının antioksidan aktivitesi (Burits & Bucar, 2000) , antitümör aktivitesi (Worthen ve ark., 1998), anti inflamatuvar aktivitesi ( Houghton ve ark., 1995), antibakteriyel aktivitesi (Morsi, 2000) ve immün sistem üzerine uyarıcı etkisi (Salem & Hossain, 2000) olduğu rapor edilmiştir. *Nigella sativa* tohumlarının kimyasal içerikleri ve tohum yağının fizikokimyasal özellikleri ile çalışmalar yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

*Nigella Sativa* tohumlarının kimyasal içerikleri bitkisinin yetiştiği coğrafi bölgeye ve iklime bağlı olarak küçük değişiklikler göstermekle birlikte tohumlar ortalama % 36 – 38 oranında sabit yağ, protein, alkaloid, saponin ve % 0.4 – 2.5 oranında uçucu yağ içerir (Ali ve ark., 2003). *Nigella sativa*'nın uçucu yağı Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizlenmiş ve temel bileşenlerinin timokinon (TQ), ditimokinon(DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) olduğu saptanmıştır (Gosheh ve ark., 1998). *Nigella sativa* tohumları, karbohidratlar, yağlar, vitaminler, mineraller, ve 9 esansiyel amino asidin sekizini içeren proteinler gibi besinsel bileşenler de ihtiva etmektedir (Omar ve ark., 1999; Al Jassir , 1992; Bhatia ve ark., 1972; Chun ve ark., 2002; Correa ve ark., 1986). *Nigella sativa* tohumun SDS PAGE ile fraksiyonlanması sonucunda molekül kütleleri 94 – 10 kDa aralığında değişen bir dizi protein bandı elde edilmiştir (Haq ve ark., 1999). Doymamış ve esansiyel yağ asitleri bakımından zengin *Nigella sativa* tohumlarının, glukoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz formlarında monosakkarit içerdikleri bulunmuştur. Total lipidlerin yağ asidi profili incelendiğinde, linoleik asidinin *Nigella*'da en bol bulunan doymamış yağ asidi olduğu tespit edilmiştir (Omar ve ark., 1999; Al-Jassir ve ark., 1992; Mahmoud ve ark., 2002; Nickavar ve ark., 2003; Ramadan & Mörsel, 2002). *Nigella sativa*'da bulunan temel fosfolipid sınıfları fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinisitol olarak sıralanır (Omar ve ark., 1999; Al-Jassir ve ark., 1992; El-Mahmoudy ve ark., 2002). Tohumlar, karaciğerde A vitaminine dönüştürülen karoten içerirler (Al-Jassir, 1992). *Nigella sativa* tohumları Kalsiyum, Potasyum ve Demir kaynağıdır (al-Gaby, 1998).



**Şekil 2.1.** *Nigella sativa* yağının temel bileşenleri ve kimyasal gösterimleri.

## 2.1. *Nigella sativa*'nın kimyasal kompozisyonu ve lipid fraksiyonunun fizikokimyasal karakteristikleri

*Nigella sativa* tohumları , dikkate değer miktarda mineral elementler içermektedir. Çörekotu tohumunda en bol bulunan element Potasyum'dur ve onu fosfor ile kalsiyum takip eder. Miktarlarındaki azalmaya göre, tohumda bulunan diğer elementler Mg, Na, Fe, Zn, Mn ve Cu'dır. *Nigella* tohumları yüksek miktarda mineral içerirler (Mn, Zn, Cu ve Fe). Buna karşın, tüketilen çörekotu miktarına göre söz konusu minerallerin nütrisyonel durumu tahmin edilememektedir (Tavruri & Dameh, 1998). Tablo 2.1.1.'de Tunus ve İran'dan toplanan *Nigella sativa* tohumlarının mineral element miktarları da dahil olmak üzere kimyasal içerikleri görülmektedir (Cheikh-Rouhou ve ark., 2007).

**Tablo 2.1.1.** Tunus ve İran'dan toplanan *Nigella sativa* tohumlarının kimyasal içerikleri.

İçerik	Tunus <i>Nigella sativa</i> tohumları	İran <i>Nigella sativa</i> tohumları
Kuru Madde (%)	91.35 ± 0.26	95.92 ± 0.70
Yağ (% kuru madde bazında)	28.48 ± 0.36	40.35 ± 0.16
Ham Protein (% kuru madde bazında)	26.7 ± 0.35	22.6 ± 0.24
Kül (% kuru madde bazında)	4.86 ± 0.06	4.41 ± 0.01
K (mg/dL kuru madde bazında)	783 ± 6.61	708 ± 7.98
Mg (mg/dL kuru madde bazında)	235 ± 4.87	260 ± 48.7
Ca (mg/dL kuru madde bazında)	572 ± 21.5	564 ± 33.4
P (mg/dL kuru madde bazında)	48.9 ± 0.04	51.9 ± 0.01
Na (mg/dL kuru madde bazında)	20.8 ± 2.21	18.5 ± 3.17
Fe (mg/dL kuru madde bazında)	8.65 ± 0.65	9.42 ± 0.88
Cu (mg/dL kuru madde bazında)	1.65 ± 0.03	1.48 ± 0.21
Zn (mg/dL kuru madde bazında)	8.04 ± 0.21	7.03 ± 0.49
Mn (mg/dL kuru madde bazında)	4.43 ± 0.11	3.37 ± 0.21
Total Karbohidrat (% kuru madde bazında)	40.0 ± 0.46	32.7 ± 0.41

Yapılan çalışmalarla *Nigella* tohumlarının yağ asidi kompozisyonları gösterilmiştir. Buna göre, linoleik, oleik ve palmitoleik asitler, çörekotu tohumundaki yağ asidi kompozisyonunun yaklaşık %74'ünü oluşturmaktadır. Bu yağ asitleri, temel doymamış yağ asitlerini ihtiva eder. Doymuş yağ asitleri ise, *Nigella* tohumlarının yaklaşık %26'sını oluşturmaktadır. Temel doymuş yağ asitleri, palmitik, stearik, behenik, miristik ve araşidik ile margarik ve lingoserik asitleri ihtiva eder. Margarik ve margaroleik asitler, *Nigella* tohumlarıyla ilgili çalışmaların pek çoğunda tespit edilmemiştir (Abdel-Aal & Attia, 1993; Atta, 2003; Babayan, 1978; Gad, 1963; Üstün ve ark., 1990). Farklı çalışmalardaki kompozisyon farklılıkları, kullanılan tohumların toplandığı bölgeye, buna bağlı genetik özelliklerine, tohumların kalitesine (olgunluk, hasata bağlı zararlar, saklama koşulları vb.), yağın işlenmesindeki değişikliklere veya lipid ekstraksiyon yöntemlerine, işlemin hassasiyetine ve miktar belirleme tekniklerine bağlıdır (Ramadan & Mörşel, 2002). Tablo 2.1.2.'de Tunus ve İran'dan toplanan *Nigella sativa* tohumlarının yağ asidi kompozisyonları g/100 g total yağ asidi cinsinden gösterilmektedir (Cheikh-Rouhou ve ark., 2007).

**Tablo 2.1.2.** Tunus ve İran'dan toplanan *Nigella sativa* tohumlarının yağ asidi kompozisyonları (g/100 g total yağ asidi).

Yağ asidi	Tunus <i>Nigella sativa</i> tohumları	İran <i>Nigella sativa</i> tohumları
Mristik C14:0	0.34 ± 0.02	0.41 ± 0.05
Palmitik C16:0	17.2 ± 0.15	18.4 ± 0.25
Palmitoleik C16:1	1.15 ± 0.05	0.78 ± 0.25
Stearik C18:0	2.84 ± 0.08	3.69 ± 0.12
Oleik C18:1	25.0 ± 0.24	23.7 ± 0.06
Linoleik C18:2	50.31 ± 0.25	49.15 ± 0.06
Linolenik C18:3	0.34 ± 0.06	0.32 ± 0.05
Araşidik C20:0	0.14 ± 0.02	0.22 ± 0.01
Eikosenoik C20:1	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.05
Behenik C22:0	1.98 ± 0.08	2.60 ± 0.05
Doymuş yağ asitleri	22.7 ± 0.37	25.5 ± 0.69
Tekli doymamış yağ asitleri	26.6 ± 0.39	25.0 ± 0.58
Çoklu doymamış yağ asitleri	50.7 ± 0.70	49.8 ± 0.20



*Nigella sativa* tohumlarının renkleri CIE Lab renk uzayının  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  parametrelerine göre incelenmiştir. Renk uzayları, bütün renkleri temsil edecek şekilde oluşturulan ve renkleri tanımlamak için kullanılan matematiksel modellerdir. Renk uzayları cihaz bağımlı ve cihaz bağımsız olmak üzere ikiye ayrılır ve cihaz bağımsız renk uzayları CIE (Commission Internationale de L'Eclairage: Uluslar arası Aydınlatma Komisyonu) tarafından geliştirilen ve bütün renkler için ölçümü sağlanan yani renkmetride kullanılan uzaylardır. CIE Lab renk uzayının bileşenleri değer ( $L^*$ :lightness), tonlama ve doygunluk ( $a^*$ ,  $b^*$ )'dir (Yılmaz, 2002). CIELab değerlerine göre *Nigella sativa* yağının açık-renkli ve sarı olduğu, fazlaca sarı pigment içerdiği tespit edilmiştir (S. Cheikh-Rouhou ve ark., 2007). Palmiye, soya fasülyesi, ayçiçeği, zeytin ve mısır gibi diğer sebze yağlarının CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) değerleri sırasıyla 63.4 – 69.5, 3.8 – 4.4 ve 9.2 – 10.4'tür (Hsu&Yu, 2002). *Nigella* tohumunun yağının  $b^*$  değeri, söz konusu sebze yağlarından daha yüksektir. Buna göre *Nigella sativa* yağı, Hsu ve Yu (2002) tarafından çalışılan sebze yağlarına göre daha fazla sarı-renktir. Bu durum, *Nigella sativa* yağında daha fazla sarı pigment (karotenoid) bulunduğunu akla getirmektedir (S. Cheikh-Rouhou ve ark., 2007).

UV absorpsiyonu, görünür bölge spektrumunun dışında olmasına rağmen renk değişiklikleri ile ilişkilidir (Mazza & Qi, 1992 ; Melton ve ark., 1994). *Nigella sativa* yağı, görece yüksek perdeleme gücü (SPF) ve koruma faktörü (PFA) derecesi ile UV radyasyonlarına karşı koruma sağlar. *Nigella sativa* yağı hem UV-A (derideki oksidatif stresin kökeni) hem de UV-B'ye karşı koruyucudur. *Nigella* tohumu yağının, özellikle 290 – 400 nm UV aralığındaki optik iletkenliği, UV-B'ye karşı güneş koruma faktörleri (SPF) ve UV-A'ya karşı koruma faktörleri olarak kullanılan hurma tohumu yağı, frambuaz tohumu yağı ve titanyum dioksit preparatları ile kıyaslanabilmiştir (Besbes ve ark., 2004; Oomah ve ark., 2000).

*Nigella sativa* yağının, insan gözünün ayırt edebileceği en düşük limit olan 450 nm'deki yüksek absorpsiyonu, bu yağdaki sarı pigment miktarının yüksek olduğuna tekabül etmektedir (S. Cheikh-Rouhou, 2007). Karotenoid içeren söz konusu sarı renkler, yağ endüstrisinde sıklıkla kullanılan birincil

renklendiriciler karoten ve annatto kullanılmaksızın tereyağı görünümünün simüle edilmesinde oldukça karlıdır(*Oomah ve ark.*, 2000).

Oksidatif stabilite, yağların kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (*Aparicio ve ark.*, 1999). Aparicio ve arkadaşları (1999) çalışmalarında zeytin yağında, Rancimat ile hesaplanan yağ stabilitesi ile yağın içeriğindeki fenollerin, oleik/linoleik asit oranının ve tokoferollerin anlamlı bir korelasyonu olduğundan bahsetmişlerdir. Rancimat ile total fenol içeriği ve oksidatif stabilite arasında yüksek direkt korelasyon olduğu gözlenmiştir (*Gutfinger, 1981; Salvador ve ark.*, 2001). Yağın kalitesi, raf ömrü ve özellikle oksidasyona olan direnciyle değerlendirilir. Bu nedenle ham tohum yağındaki fenol miktarı yağın kalitesinin değerlendirilmesinde çok önemli bir faktördür (*Cinquanta ve ark.*, 1997).

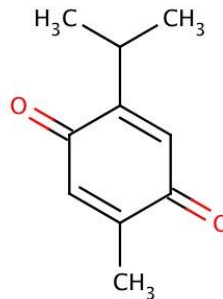
Temel Polimer Fiziğine göre, vizkozitenin molekül ağırlığına bağlı olduğu bilinmektedir (*Gloria ve ark.*, 1998). *Nigella* tohumu yağının vizkozitesi, çoğu sebze yağı vizkozitesinden oldukça düşüktür.

Zengin bir fenolik bileşik kaynağı olduğu düşünülen zeytin yağı haricinde, *Nigella* tohumu yağı, diğer sofraya yağlarından daha yüksek fenol içeriğine sahiptir. Buna göre, *Nigella sativa* yağının doğal fenolik bileşikler için potansiyel bir kaynak olduğu düşünülebilir. Fenolik bileşikler, yağa kendine özgü bir tad ve koku verir (*Caponio ve ark.*, 1999). Bunun yanı sıra, fenolik bileşikler, koroner kalp hastalığı ve kanserden korunmada pozitif etkiye sahiptir (*Owen ve ark.*, 2000; *Tuck ve ark.*, 2002).

Yağın rengi, kalitesinin değerlendirilmesindeki temel özelliklerden biridir. Renkle olan korelasyonundan dolayı, yağın klorofil pigmenti içeriği kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (*Salvador ve ark.*, 2001). Bu pigmentler otooksidasyon ve foto-oksidasyon mekanizmalarına katılır (*Gutierrez ve ark.*, 1990).

## 2.2. *Nigella sativa*'nın temel etken maddesi: Timokinon

Çörekotu uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olan timokinon ( $C_{10}H_{10}O_2$ ; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon (Bkz. Şekil 2.2.1.) (molekül ağırlığı 164.2) 2000 yılı aşkın süredir antioksidan, anti-inflamatuar ve antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır( *Trang ve ark.*, 1993; *Hosseinzadeh ve ark.*, 2004). Yapılan çalışmalarda timokinonun pek çok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Timokinonun etkili olduğu kanser türleri; göğüs adenokarsinoması, over adenokarsinoması (*Shoieb ve ark.*, 2003), kolorektal kanser (*Gali-Mutasib ve ark.*, 2004), insan pankreatik adenokarsinomu, rahim sarkoması (*Worthen ve ark.*,1998), neoplastik keratinosit (*Gali-Mutasib ve ark.*, 2004), insan osteosarkoması (*Roepke ve ark.*, 2007), fibrosarkoma, akciğer sarkoması (*Kaseb ve ark.*, 2007) olarak sıralanabilir. Ayrıca timokinonun, androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek hormon-refraktör (cevap vermeyen) prostat kanserini inhibe ettiği rapor edilmiştir (*Kaseb ve ark.*, 2007).



Şekil 2.2.1. Timokinonun kimyasal yapısı.

## 2.3. *Nigella sativa*'nın farmasötik etkileri

*Nigella sativa*'nın anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-histaminik, anti-mikrobiyal, anti-tümör, hematolojik ve immünomodülatör etkileri çeşitli çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu bölümde bu etkiler anlatılmıştır.

### 2.3.1. Anti-Diyabetik etkiler

*Diabetes Mellitus* direk veya dolaylı olarak insülin noksanlığına bağlı bir sendromdur. Pekçok sebebi olmasının yanında hastalığın şiddet derecesi değişkendir. Birçok farklı patojenik süreç *Diabetes Mellitus* gelişmesine sebep olabilir. İnsülin disülfid bağlarıyla bağlı iki polipeptid zincirinden oluşan 51 aminoasitlik bir proteindir. Pankreastaki Langerhans adacıklarının  $\beta$ -hücrelerinden büyük, tek zincirli ve inaktif pro-insülin formunda salgılanır. Pro-insülin daha sonra parçalanarak aktif hormonu meydana getirir (*Zilva & Pannal, 1975*).

İnsülin sekresyonunu etkileyen pek çok faktör vardır ve şüphesiz en önemli faktör kan şekeri düzeyidir. Kan şekeri yükseldiğinde insülin sekresyonu artar. Bazı amino asitlerin de insülin sekresyonu üzerine etkisi olduğu gözlenmiştir. Özellikle lösin ve arginin insülin sekresyonunu tetiklemektedir. Tolbutamid gibi sülfonil üre bileşikleri terapötik olarak insülin sekresyonunu arttırmaktadır. Bunların yanı sıra insülin seviyelerinin oral glukoz alımında intravenöz glukoz alımına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna göre oral yolla alınan glukoz sindirim sisteminde yol alıyor ve bağırsakta bazı hormonların salınımını tetikliyor ve sözkonusu hormonlar insülin sekresyonunu arttırıyor (*Zilva & Pannal, 1975; Gürdöl & Ademoğlu ; 2006*).

İnsülinin başta glukozun hücrelere girmesini sağlamak olmak üzere pek çok fonksiyonu vardır. Glikojenezi tetiklerken glukoneojenezi inhibe eder. Kan glukoz düzeyleri yüksek olduğunda glikojenezi tetikleyerek glukozun depo edilmesini sağlarken kan glukoz düzeyini düşürmesi mümkün olur. İnsülin lipolizi inhibe ederken lipojenezi tetikler. Ayrıca büyüme hormonu ile birlikte etki göstererek protein sentezini uyarır (*Zilva & Panna, 1975; Gürdöl & Ademoğlu, 2006*).

*Diabetes Mellitus*, temelde Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere ikiye ayrılır (*Zilva & Pannal; 1975*). Tip 1 *Diabetes Mellitus*, diyabet vakalarının %10'luk bir kısmını oluşturur ve çocuk yaş grubunda daha sık görülür. Bu sendromda insülin üretiminde görev alan pankreas  $\beta$ -hücreleri süregelen otoimmün veya otoimmün dışı sebeplerle harap olmuş durumdadır. Buna bağlı olarak insülin

üretimi azalır veya tamamen ortadan kalkar (insülojeni) ve hiperglisemi meydana gelir (*Alemzadeh ve ark., 2004; Morales ve ark., 2004; She ve ark., 1998; Norris & Wolfsdorf, 2005*). Tip 2 *Diabetes Mellitus* ise sıklıkla yetişkinlerde görülür ve diyabet vakalarının büyük bir kısmını oluşturur. Tip 2 *Diabetes Mellitus* üç şekilde ortaya çıkmaktadır; periferik dokularda insülin direnci, pankreasta insülin salınımı kusuru ve karaciğerde glukoz üretiminin artması. Tip 2 *Diabetes Mellitus*'ta glukozu karşı erken insülin cevabında bir bozukluk mevcuttur ve pankreas  $\beta$ -hücreleri glukozu tanımakta güçlük çeker. İnsülin eksikliğinden ve buna bağlı glukagon fazlalığından veya insülin etkisizliğinden dolayı karaciğerden glukoz üretimi artmaktadır ve bu durumda açlık hiperglisemisi meydana gelir (*Zilva & Panna, 1975*).

*Diabetes Mellitus*'un patojenezi ve oral hipoglisemik ajanlarla kontrol altında tutulması kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (*Rchid ve ark., 2004*). Bununla beraber, *Nigella sativa*'nın hipoglisemik etkileri de deneysel olarak indüklenmiş diyabetik hayvanlar üzerinde araştırılmıştır (*Al-Hader ve ark., 1993; Deresinski, 1995; Fararh ve ark., 2002*). *Nigella sativa*'nın temel etken maddesi timokinonun antidiyabetik etkisinin kısmen hepatik glukoneogenez aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (*Fararh ve ark., 2005*).

*Diabetes Mellitus*, birçok etiyojisi olan karmaşık bir metabolik bozukluktur. İnsülin sekresyonunun bozulması ( $\beta$ -hücreleri disfonksiyonu), insülinin etki mekanizmasının bozulması (insülin resistansı) veya her iki durumun da aynı anda ortaya çıkmasıyla, karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarını etkileyen, kronik hiperglisemi ile karakterize edilir (*Kardeşler ve ark., 2008*). Tip 2 diyabet gelişmesinde genetik ve çevresel faktörler etkilidir (*Lima ve ark., 2008*).

Tüm dünyada tip 2 *Diabetes Mellitus* insidansı artmaktadır (*Wild ve ark., 2004*). Çok fazla üretim (aşırı hepatik glikojenoliz ve glukoneojenez) ve dokularda azalmış glukoz kullanımı *Diabetes Mellitus*'taki hipergliseminin temel sebebidir (*Shirwaikar ve ark., 2006*). Normal glukoz homeostasisi, glukozun alımı (bağırsaktan emilimi), dokular tarafından kullanılması (glikoliz, pentoz fosfat yolu, sitrat çevrimi, glikojen sentezi) ve endojen olarak üretilmesi

arasındaki dengeye bağlıdır (*Meyer ve ark.*, 2002). Vücudun kandaki glukoz konsantrasyonunu sabit tutmaya çalıştığı bu yollardan kısaca bahsedilecektir.

Glikoliz, glukozun ATP üreterek pirüvata yıkıldığı bir metabolik yoldur ve on tane sitozolik enzim tarafından katabolize edilmektedir. Glikolizde glukozdan sonra oluşan tüm ara ürünler fosforillenmiş bileşiklerdir. Glikolizin birbirini izleyen tepkimeleri sırasında açığa çıkan serbest enerjinin bir kısmı ATP ve NADH şeklinde saklanır. Altı karbonlu bir bileşik olan glukozun iki molekül üç karbonlu bir bileşik olan pirüvata parçalanması on basamakta gerçekleşir. İlk beş basamak hazırlık fazı, ikinci beş basamak ise hizmet fazıdır. Hazırlık fazında glukoz fosforillenir ve gliseraldehit-3-fosfata çevrilir. Hizmet fazında ise gliseraldehit-3-fosfat oksidatif olarak pirüvata dönüşür (*Nelson & Cox*, 2005).

Metabolik yoldaki ilk reaksiyonlar enerji gerektirir. Glukozun glukoz-6-fosfata ve daha sonra fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-bisfosfata fosforillenmesi için ATP kullanılır. Bu iki reaksiyonu katalizleyen hekzokinaz ve fosfofruktokinaz enzimleri glikolitik yolun önemli kontrol noktalarıdır. Fruktoz-6-fosfatın üretimini izleyen reaksiyonlar glikolitik dizinin enerji üreten basamaklarını oluşturmaktadır. Fruktoz-1-6-bisfosfatın parçalanması, iki adet üç karbonlu şeker gliseraldehit-3-fosfatı oluşturmada, bu da 1,3-bisfosfogliserata yükseltgenmektedir. 1,3-bisfosfogliserat sonraki reaksiyonda 3-fosfogliserata dönüştürülür, bu bileşik daha sonra glikolizde ikinci yüksek enerjili bileşik olan fosfoenolpirüvata dönüşür. Glikolizin son basamağında fosfoenolpirüvatin yüksek enerjili fosfat grubu hidroliz olur ve pirüvat meydana gelir.

Ökaryotik hücrelerde glikoliz sitozolde gerçekleşir. Meydana gelen pirüvat daha sonra mitokondriye taşınır ve Koenzim A (KoA) eşliğinde oksidatif dekarboksilasyona uğrar. Pirüvatin karbonlarından bir tanesi karbondioksit olarak serbestleşirken diğer ikisi KoA'ya eklenerek asetil KoA'yı oluşturur. Bu reaksiyonda oluşan asetil KoA, oksidatif mekanizmanın merkezi yolu olan sitrat çevrimine girer (*Cooper & Hausman*, 2006) . Sitrat çevriminden daha sonra bahsedilecektir.

Glukozun polimerik depo şekilleri olan glikojen ve nişasta glikoliz reaksiyonlarında uçlarından birindeki bir glukozun glukoz-1-fosfat oluşturmak üzere fosforolitik olarak ayrılmasıyla iki basamaklı bir yol üzerinden girer. Bu fosforolitik reaksiyonu katalizleyen enzimler glikojen fosforilaz veya nişasta fosforilazdır. Daha sonra fosfoglukomutaz, glukoz-1-fosfatı glukoz-6-fosfata çevirir. Glukoz-6-fosfat glikolizdeki ilk ara üründür ve bu reaksiyonu takiben glikoliz meydana gelir .

Glukoneojenez, pirüvat, laktat, alanin gibi karbohidrat olmayan biyomoleküllerin glukozla dönüştüğü çok basamaklı bir yoldur. Omurgalılarda, karaciğer ve böbrekte gerçekleşen glukoneojenez sayesinde beyin, kas ve eritrositlerde kullanılmak üzere glukoz üretilir. Glukoneojenezdeki bazı basamakta glikolizde de aktif olan bazı enzimlerce katalizlenir. Glukoneojenezde, glikolizdeki zorunlu geri dönüşümsüz tepkimeler atlanır ve farklı enzimlerle katalizlenir. Glukozun boşuna dönüşümünü engellemek için glikoliz ve glukoneojenezdeki enzim-bağımlı reaksiyonlar birbirlerine zıt allosterik kontrol altındadır. Buna göre glikolitik tepkimeler uyarıldığında glikoneojenik tepkimeler inhibe olur, tersi de geçerlidir. İnsüline zıt etki gösteren glukagon, glikolizi yavaşlatarak ve glukoneojenezi uyararak bir seri enzimatik değişikliği tetiklemektedir.

Glikojen karaciğerde glukozun depolanma şeklidir ve diğer dokulara dağıtılmak üzere kolayca kan glukozuna çevrilebilir. Glikojen sentezinin başlangıç noktası glukoz-6-fosfattır ve sentezin başlayabilmesi için fosfoglukomutaz katalizörlüğünde glukoz-1-fosfata çevrilir. Glukoz-1-fosfat, bir şeker nükleotidi olan UDP-glukoza çevrilir. Glikojen sentaz, büyüyen bir glikojen kolunun indirgen olmayan ucuna UDP-glukozdan glukoz molekülünün  $\alpha 1 \rightarrow 4$  bağıyla takılmasını sağlar. Glikozil 4 $\rightarrow$ 6 transferaz ise glukozu dallanma noktalarında  $\alpha 1 \rightarrow 6$  bağı oluşturarak bağlar. Glikojenin sentezi ve yıkımı, glikojen sentazın (inaktifleştirilir) ve glikojen fosforilazın (aktifleştirilir) hormona bağımlı fosforillenmesiyle karşıt olarak kontroledilir.

Pentoz fosfat yolu glukozun alternatif bir oksidatif yoludur. NADPH ve pentoz fosfat üreterek, glukozun birinci karbonunda oksitlenme ve

dekarboksillenmesiyle sonuçlanır. NADPH biyosentetik tepkimelerde indirgen bir güçtür ve pentoz fosfatlar nükleotid ve nükleik asit sentezinde şart olan öncüllerdir.

Glikolizin son ürünü olan pirüvat, pirüvat dehidrogenaz kompleksiyle dehidrojenlenme ve derkarboksillenme geçirir. Pirüvat dehidrogenaz kompleksi, asetil-KoA ve CO<sub>2</sub> oluşturmak üzere beş koenzim gerektiren ve ardışık etki gösteren üç enzim içermektedir. Asetil KoA, sitratı oluşturmak üzere sitrat çevrimine girer ve sitrat sentazın etkisiyle oksaloasetata kondense olur. Sitrattan tersinir tepkimeyle izositrata dönüşümü akonitaz tarafından katalizlenir ve sonrasında izositrat dehidrogenaz tarafından katalizlenen bir tepkimeyle izositrat  $\alpha$ -ketoglutarata oksitlenir.  $\alpha$ -ketoglutarat bir dehidrojenlenme ve dekarboksillenme geçirerek süksinil-KoA'yı oluşturur. Süksinil-KoA, ADP (veya GDP) ve inorganik fosforla etkileşerek substrat düzeyindeki bir fosforillenmeyle serbest süksinat ve ATP oluşturur. Süksinat daha sonra süksinat dehidrogenazla fumarata oksitlenir. Fumarat, fumaraz katalizörlüğünde tersinir olarak L-malat'a hidratlanır ve oluşan malat sonraki çevrim için gerekli oksaloasetatı açığa çıkarmak üzere L-malat dehidrogenazla oksitlenir. Sitrat çevrimi, karbohidrat metabolizmasındaki önemli rolü haricinde çevrimin araürünlerinin bazı aminoasit ve bazı biyomoleküllerin biyosentezinde öncül olmalarından dolayı ayrıca önemlidir (*Nelson & Cox, 2005*).

Pari ve Sankaranarayanan 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *Nigella sativa* yağının temel etken maddesi timokinonun karbohidrat metabolizmasında rol alan enzimler ve hiperglisemik durum üzerine etkilerini araştırdılar. Bu çalışmada STZ-NA indüklenmiş diyabetik fareler üzerine 6 hafta boyunca ağızdan timokinon uygulanmış ve süre sonunda plazma glukoz konsantrasyonları ile insülin düzeyleri gözlenmiştir.

Timokinon yağda çözünen bir bileşiktir ve Pari ile Sankaranarayanan (2009) çalışmalarında timokinonu mısır yağında çözerek deney farelerine uygulamışlardır. Araştırmacılar fareleri normal kontrol , timokinon verilmiş normal fareler, diyabetik kontrol , kg vücut ağırlığı başına 1 mL mısır yağında çözülmüş 20 mg timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler, kg vücut ağırlığı başına 40 mg 1 mL mısır



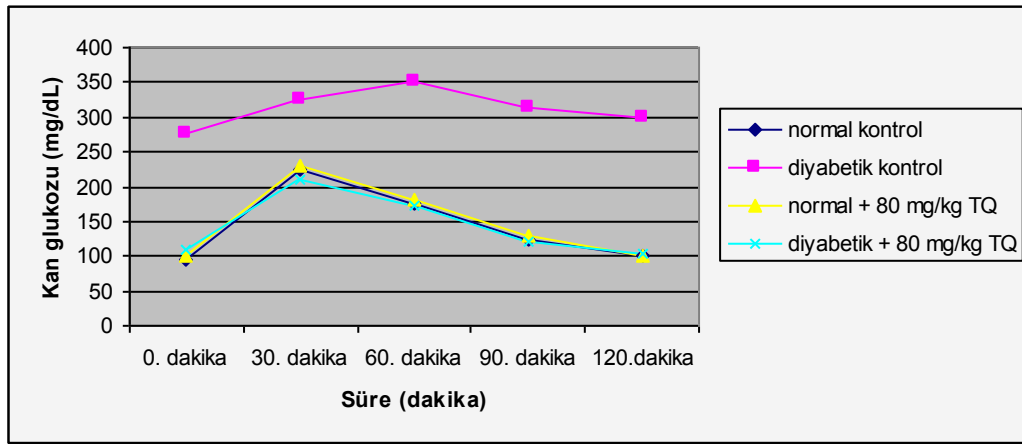
yağında çözünmüş timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler, kg vücut ağırlığı başına 1 mL mısır yağında çözünmüş 80 mg timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler olmak üzere 6 gruba ayırmışlardır. Diyabetik fareler, pankreas beta hücreleri üzerinde toksik etki göstererek insülin salınımını inhibe eden STZ (streptozotosin) indüksiyonu ile diyabetik hale getirilmiş farelerdir. Normal ve diyabetik kontrol grupları etken madde içermeyen mısır yağı olan kör çözelti ile muamele edilmiştir ve tüm gruplara deney uygulaması 45 gün sürdürülmüştür. Bu çalışma sonucunda timokinon ile muamele edilen diyabetik farelerin plazma glukoz konsantrasyonlarında belirgin bir düşüş ve insülin düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Bkz. Tablo 2.3.1.1.).

**Tablo 2.3.1.1.** Kontrol ve deney farelerinin plazma glukoz ve insülin düzeylerindeki değişim. ( $p < 0.05$ )

<b>Gruplar</b>	<b>Plazma Glukoz (mg/dL)</b>	<b>Plazma İnsülin (<math>\mu</math>U/mL)</b>
Normal kontrol	93.36 $\pm$ 7.15	16.98 $\pm$ 1.30
Normal + Timokinon (80 mg/kg)	94.30 $\pm$ 7.22	17.44 $\pm$ 1.34
Diyabetik kontrol	283.17 $\pm$ 21.68	6.46 $\pm$ 0.49
Diyabetik + Timokinon (20 mg/kg)	226.18 $\pm$ 17.31	7.95 $\pm$ 0.61
Diyabetik + Timokinon (40 mg/kg)	163.32 $\pm$ 12.57	10.25 $\pm$ 0.78
Diyabetik + Timokinon (80 mg/kg)	110.24 $\pm$ 8.31	14.95 $\pm$ 1.15

Pari ve Sankaranarayanan (2009) çalışmaları kapsamında deney farelerine Du vignaud ve Karr (1925) metoduna göre oral glukoz tolerans testi uygulamışlardır. Gece açlığından sonra kontrol ve deney farelerinden 0. dakika kan numunesi alınmış ve sonrasında farelere oral yolla 2g/kg vücut ağırlığı glukoz çözeltisi uygulanmıştır.

Glukoz çözeltisinin uygulanmasından itibaren 30. , 60., 90. ve 120. dakikalarda kan numuneleri alınarak glukoz konsantrasyonları ölçülmüştür. Çalışma sonucunda timokinonla muamele edilen diyabetik farelerin glukoz toleransının normale yakın olduğu görülmüş ve maksimum glukoz konsantrasyonu düşüşü kg vücut ağırlığı başına 80 mg timokinonla muamele edilen farelerde izlenmiştir. Timokinonla muamele edilmemiş diyabetik kontrol grubunun glukoz konsantrasyonu 2. saat sonunda da yüksek seviyelerde seyretmiştir (Bkz. Şekil 2.3.1.1.)



Şekil 2.3.1.1. Timokinonun OGTT üzerine etkisi ( $p < 0.05$ )

Pari ve Sankaranarayanan'ın (2009) çalışmalarına benzer bir çalışma 2005 yılında Fararh ve arkadaşları tarafından da yapılmıştır. Fararh ve arkadaşları dört grup deney faresi kullanmışlardır; normal kontrol, diyabetik kontrol, körle muamele edilen diyabetik fareler ve timokinonla muamele edilen diyabetik fareler. Normal fareler STZ muamelesi ile diyabetik hale getirilmişlerdir. Araştırmacılar ticari yolla temin ettikleri timokinonu dimetil sülfoksit ve normal salinde çözmüşler ve hazırladıkları çözeltiyi deney farelerine 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda gastrik yolla 30 gün boyunca uygulamışlardır. Çalışmanın başlamasından itibaren 10'ar gün arayla deney farelerinin açlık kan şekerleri ölçülmüş ve timokinon muamelesinin açlık kan şekerinde belirgin düşüğe sebep olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 2.3.1.2.).

**Tablo 2.3.1.2.** Diyabetik farelerde timokinonun açlık kan şekeri üzerine etkisi. ( $p<0.01$ )

	Normal kontrol	Diyabetik Kontrol	Diyabetik – körle muamele	Diyabetik – TQ ile muamele
Muamele öncesi (mg/dL)	109.7 ± 3.1	350.9 ± 3.0	364.7 ± 3.2	350.5 ± 4.1
10.gün (mg/dL)	101.7 ± 2.2	362.2 ± 4.6	357.5 ± 3.3	262.2 ± 3.2
20. gün /mg/dL)	99.9 ± 3.3	358.1 ± 2.4	355.3 ± 2.3	194.0 ± 3.9
30. gün (mg/dL)	105.6 ± 2.6	369.2 ± 3.1	361.7 ± 1.9	184.6 ± 3.1

Tip 2 diyabete bağlı hiperglisemi, absorpsiyon safhasında hepatik glukoz üretiminin baskılanmasındaki eksiklik ile absorpsiyon sonrası safhada aşırı glukoz üretimine bağlıdır. Tip 2 diyabette, kan glukoz düzeyi ve hepatik glukoz dengesini kontrol edilmesinde hedef hepatik glukoz metabolizmasını düzenleyen enzimlerdir.

Karaciğer kan şekeri homeostazında merkezi bir rol oynar. Diyabetik durumda, heksokinazın ve glukoz-6-fosfat dehidrogenazın aktiviteleri insülin eksikliği veya yetersizliğine bağlı olarak azalmıştır. Timokinon, insülin salınımıyla her iki enzimin de hepatik dokulardaki aktivitesini artırır. Buna bağlı olarak glukozun hücresel biyosentezde kullanımı artar ve plazma glukoz seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlenir. Pari ve Sankaranarayanan (2009) daha önce bahsedilen kontrol ve deney fare gruplarında heksokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerini ölçerek timokinonun söz konusu enzimleri aktivitelerini arttırdıklarını göstermişlerdir (Bkz. Tablo 2.3.1.3.)

**Tablo 2.3.1.3.** Kontrol ve deney farelerinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz enzim aktivitelerindeki değişim. ( $p < 0.05$ )

<b>Gruplar</b>	<b>Normal Kontrol</b>	<b>Normal + TQ (80 mg/kg)</b>	<b>Diyabetik Kontrol</b>	<b>Diyabetik + TQ (80 mg/kg)</b>
<b>Glukoz-6-fosfat dehidrohenaz</b> (Ünite/mg protein)	4.83 ± 0.15	4.78 ± 0.14	2.17 ± 0.12	3.34 ± 0.24
<b>Hekzokinaz</b> (µmol fosforillenmiş glukoz / dk/mg protein)	149.34 ± 12.59	152.28 ± 12.65	106.76 ± 7.56	134.52 ± 11.02

Glukonejenez yoluyla hepatik glukoz üretimi, Diabettes Mellitus'ta hiperglisemi oluşumuna katkı sağlar (*Ishikawa ve ark.*, 1998). Diabettes Mellitus'ta, glukoneojenez artışının, hepatik dokularda glukoneojenezden sorumlu, fosfoenol pirüvatkarboksikinaz (PEPCK), glukoz-6-fosfataz, fruktoz 1,6-bisfosfataz gibi, kilit enzimlerin ekspresyonundaki artış ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (*Van de Werve ve ark.*, 2000). Pari ve Sankaranarayanan (2009) tarafından yapılan çalışmada glukoz 6-fosfataz ve fruktoz 1,6-bisfosfataz aktiviteleri ölçülerek Tablo 2.3.1.4.'de gösterilmiştir. Çalışma sonucunda timokinonun, bu enzimlerin aktivitelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu sonuç, timokinonun, glukozun dokularda kullanımını artırarak ve insülin salınımı aracılığıyla hepatik glukoz üretimini azaltarak, bozulmuş karbohidrat metabolizmasını düzeltici etki gösterdiğini destekler niteliktedir.

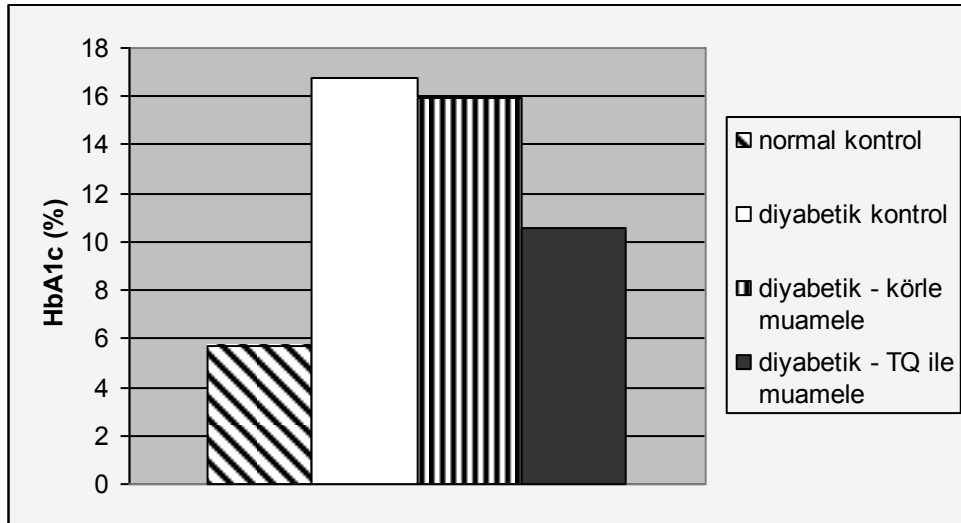
**Tablo 2.3.1.4.** Kontrol ve deney farelerinde glukoz 6-fosfataz ve Fruktoz 1,6-bisfosfataz enzim aktivitelerindeki değişim. ( $p < 0.05$ )

<b>Gruplar</b>	<b>Normal Kontrol</b>	<b>Normal + TQ (80 mg/kg)</b>	<b>Diyabetik Kontrol</b>	<b>Diyabetik + TQ (80 mg/kg)</b>
<b>Glukoz 6-fosfataz</b> (µmol Pi libere/dk/mg protein)	0.178 ± 0.016	0.174 ± 0.014	0.270 ± 0.024	0.213 ± 0.20
<b>Fruktoz 1,6-bisfosfataz</b> (µmol Pi libere/saat/mg protein)	0.354 ± 0.030	0.338 ± 0.030	0.602 ± 0.050	0.402 ± 0.030

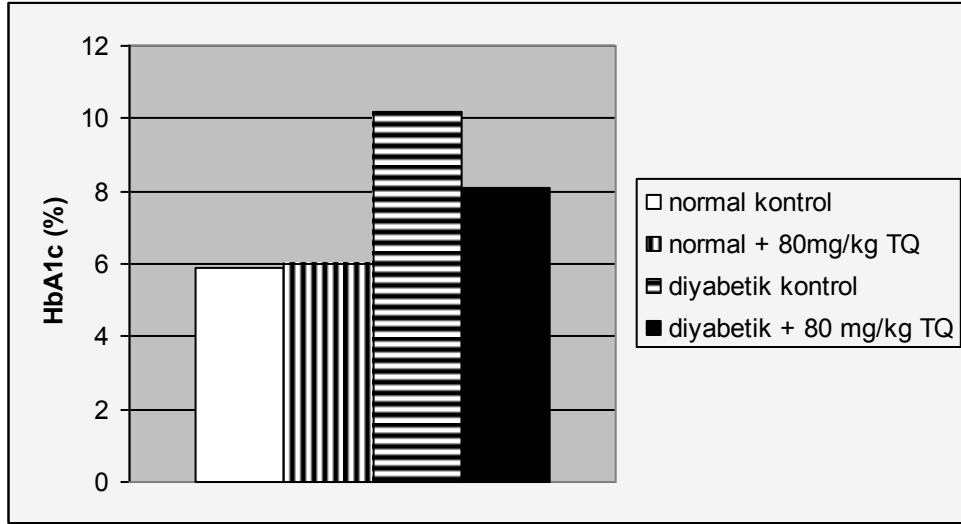
Glikozillenmiş hemoglobin, glukoz ile hemoglobin molekülünün her iki  $\beta$  zincirlerinin N-terminal aminoasitlerinin birleşmesiyle ortaya çıkan nonenzimatik bir ketoamin reaksiyonu ile meydana gelir. Erişkinlerde kandaki hemoglobinin %97'sinin HbA<sub>1</sub>, %2'sini HbA<sub>2</sub>, % 1-2'sini de HbF oluşturur. HbA<sub>1</sub>'in HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> ve HbA<sub>1c</sub> olmak üzere 3 bileşeni vardır. Bu 3 bileşenden en çok bulunanı HbA<sub>1c</sub>'dir. Glikozile proteinler, glukoz ile proteinler üzerindeki amino asitler arasında yavaş gelişen enzimatik olmayan reaksiyon sonucu posttranslasyonel olarak oluşur (*Jeppsson ve ark., 2002*). *Diabetes Mellitus*'ta vuku bulan hiperglisemi proteinlerin glukozillenme miktarı çok yükseltir. Lens proteinleri, eritrosit membran proteinleri, sinir proteinleri, albumin ve en önemlisi hemoglobin glukozillenen belli başlı vücut proteinleridir. Hemoglobinin glukozillenmesi iki basamakta gerçekleşir ve geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Glikozile hemoglobinin sentez hızı eritrositlerin maruz kaldığı glukoz miktarı ile ilişkilidir. Glukozile Hb ölçümleri HbA<sub>1</sub>'in en büyük Eritrosit zarı glukozu serbestçe geçirgen olduğundan glikozile hemoglobin, geçmiş 120 günlük süredeki (ortalama eritrosit yaşam süresi) ortalama gliseminin klinik olarak yararlı bir indeksidir. Glikozile homglobin ölçümleri HbA<sub>1</sub>'in çoğunluğunu oluşturan HbA<sub>1c</sub> ile yapılır ve sonuç total Hb yüzdesi olarak verilir (*Kennedy & Baynes, 1984; Edelstein & Brownlee, 1992*). Total HbA1C glukoz düşürücü tedaviye cevabın takibi ve uzun süreli kan şekeri kontrolünde önemli bir parametredir. HbA1C, son 2 – 3 aylık dönemdeki ortalama kan glukozuyla orantılıdır ve kan şekeri düzeyindeki kısa süreli iniş çıkışlardan etkilenmez. Buna karşın kan glukozundaki günlük veya kısa süreli oynamalar hakkında fikir verememekte ve hipoglisemik atakları yansıtmamakla birlikte uzun süreli kontrolü kontrolü değerlendirmede günümüzde en iyi yoldur (*Kennedy & Baynes, 1984; Pari & Sankaranarayanan, 2009*).

Timokinonun total HbA1C'yi önemli derecede düşürdüğü gösterilmiştir (*Fararh ve ark., 2005 ; Pari & Sankaranarayanan , 2009*). Fararh ve arkadaşları (2005) normal kontrol, diyabetik kontrol, körle muamele diyabetik fareler ve timokinonla muamele diyabetik fareler olmak üzere dört deney grubunda glikozile hemoglobin yüzdelerini 30 günlük deney sonunda ölçmüşler ve timokinonun HbA1c yüzdesini belirgin bir şekilde düşürdüğü gözlemişlerdir (Bkz. Şekil 2.3.1.2.). Benzer

şekilde Pari ve Sankaranarayanan (2009), normal kontrol , 80 mg/kg timokinon verilmiş normal fareler, diyabetik kontrol , 20 mg/ kg timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler, 40 mg/ kg timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler, 80 mg/ kg timokinon ile muamele edilmiş diyabetik fareler olmak üzere altı deney grubu üzerinde çalışmış ve artan timokinon miktarına göre HbA1C yüzdesinde belirgin düşüş gözlemişlerdir. HbA1C yüzdesindeki maksimum düşüş 80 mg/kg timokinonla muamele edilen farelerde gözlenmiştir. Şekil 2.3.1.3. bu çalışmanın sonuçlarına göre çizilmiş ve maksimal düşüş 80 mg/kg timokinon verilen grupta gözlendiğinden timokinonla muamele edilen deney gruplarından sadece bu gruba grafikte yer verilmiştir. Buna göre, timokinonun, insülin sekresyonu yoluyla uzun süreli hiperglisemi kontrolünde önemli bir etkisi vardır.



Şekil 2.3.1.2. Fararh ve arkadaşlarının (2005) çalışmasına göre timokinonun HbA1c yüzdesi üzerine etkisi.



Şekil 2.3.1.3. Pari ve Sankaranarayanan'ın çalışmasına göre timokinonun HbA1c yüzdesi üzerine etkisi.

*Nigella sativa* yağının temel bileşeni Timokinon, insülin sekresyonunu artırarak glukoz kullanımında artışa ve hepatik glukoz üretiminde azalışa sebep olur. Böylelikle bozulmuş karbohidrat metabolizmasını düzeltici yönde, diğer bir deyişle antidiyabetik etki gösterir (Pari & Sankaranarayanan, 2009). Timokinonun insülin sekresyonu üzerindeki moleküler mekanizması henüz aydınlatılmamıştır.

### 2.3.2. Anti-Oksidan Etkiler

En dış orbitallerinde en az bir ortaklanmamış elektronu bulunan atom, atom grubu veya moleküllere serbest radikaller denir (Gutteridge ve ark., 1999). Serbest radikaller, söz konusu ortaklanmamış elektronları nedeniyle oldukça kararsız bir yapı gösterirler ve lipid, protein veya karbohidrat gibi moleküllerle, hücre hasarına sebep olacak şekilde, etkileşerek kararlı yapı kazanmak isterler (Kuhn ve ark., 2003). Hücrelerdeki koruma mekanizmaları da serbest radikal oluşumuna yol açar. Karaciğer, detoksifikasyon için serbest radikalleri kullanırken, nötrofiller patojenleri yok etmek için serbest radikal oluştururlar (Lunec ve ark., 2002). Büyük ölçüde oksijen ve azot kaynaklı olan serbest radikaller, metabolizma sırasında doğal olarak oluşurlar. Karbon ve kükürt kaynaklı serbest radikaller de vardır. Metabolik faaliyetin yanı sıra radyasyon, ilaçlar, çeşitli kimyasallar gibi dış etkenler de serbest radikal oluşumuna sebep olur.

Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak anılır (*McDermott ve ark.*, 2000). En yaygın reaktif oksijen türleri süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) ve hidroksil radikalidir ( $\bullet OH$ ) (*Wilson ve ark.*, 2001 ; *Kendler ve ark.*, 1995).  $O_2^{\bullet-}$  , oksijen molekülüne bir elektron eklendiğinde meydana gelir ve reaktif oksijen türlerinin en az reaktif olanıdır ( *Kohen ve ark.*, 2002).  $O_2^{\bullet-}$  meydana geldikten sonra diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olacak ve  $H_2O$  oluşumuyla son bulacak bir reaksiyonlar zincirini başlatır. İnsan vücudunda en fazla oluşan serbest radikal  $O_2^{\bullet-}$ 'dir . Vücuttaki  $O_2^{\bullet-}$ 'nin en belirgin kaynakları olarak fagositik hücreler olan nötrofiller ve makrofajlar öne çıkmaktadır (*Gutteridge ve ark.*, 1999).

Antioksidanlar, dokulardaki oksidasyonun zararlı etkilerini önlemekten sorumlu bileşiklerdir. Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre 2 sınıfa ayrılırlar:

(1) zincir kırıcı antioksidanlar , Vitamin E ve  $\beta$ -karoten gibi. Zincir kırıcı antioksidanlar serbest radikale elektron vererek stabilizasyon yaparlar. Böylelikle radikal reaktif formunu kaybeder.

(2) Koruyucu antioksidanlar olan enzimler. Oksidanları, oksidasyon zincirini başlatmadan temizlerler (*Kuhn ve ark.*, 2003).

Anti-oksidanlar, radikal oluşumunu önleme, tetikleri biyokimyasal reaksiyonları engelleme, oluşan radikalleri ortamdan uzaklaştırma, hasar gören molekülleri onarma ve temizleme gibi radikallere karşı meydana gelmiş mekanizmalardır. Yapılan pekçok çalışma ile, timokinonun farklı mekanizmalarla antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Örneğin, El-Dakhakhny ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada timokinonun 5-hidroksieikosa-tetraenoik asit gibi 5-lipooksigenaz ürünlerinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu moleküller, kolon kanseri hücrelerinin yaşayabilmesi için gereklidir. Timokinonun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri üzerinde radikal temizleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (*Kruk ve ark.*, 2000; *Mansour ve ark.*, 2002; *Badary ve ark.*, 2003). Buna ek olarak, timokinon, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi hepatik antioksidan enzimlerde kayda değer bir azalmaya neden olur. Timokinon doksorubisin-indüklü hiperlipidemik nefropatiden muzdarip sıçanlarda, demire bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu etkin bir şekilde inhibe edebilmektedir (*Badary ve ark.*, 2000).



Bileşiğın, Deneysel Allerjik Ensefalomyelit'ten muzdarip dişi Lewis sıçanlarında glutasyonu uyararak hücrel oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (*Mohamed ve ark.*, 2003).

Pekçok epidemiyolojik çalışmada antioksidanlarca zengin gıdaların tüketilmesiyle kanser riskinin azaltılabildiği gösterilmiştir (*Borek*, 2004). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda oksidatif stresin farklı kanserlerin meydana gelmesi ve ilerlemede etkili olduğunu göstermektedir ( *Kim ve ark.*, 2004; *Pathak ve ark.*, 2005). Badary ve arkadaşları 1999 ve 2007 yıllarında timokinonun karsinogenezdeki potansiyel koruyucu etkisi üzerinde çalışmışlardır. Buna göre timokinon, lipid peroksidasyonu ve hücrel antioksidan çevreyi modüle ederek karsinogenez prosesini inhibe etmektedir.

İn vitro çalışmalar *Nigella sativa* tohumu ekstraktının yılan ve akrep zehirlerinin hemolitik aktivitelerini inhibe ettiği (*Sallal ve ark.*, 1996), eritrositleri hidrojen peroksitin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna, protein degradasyonuna, deformasyon kaybına ve osmotik frajilitenin artmasına karşı koruduğu (*Suboh ve ark.*, 2004), gırtlak kanseri hücrelerini kortisol veya lipopolisakkaritler tarafından indüklenen apoptoza (programlanmış hücre ölümü) karşı koruduğu (*Corder ve ark.*, 2003) gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Nigella sativa* tohumunu bileşenlerinin antioksidan özelliklerine bağlı olarak anti-toksik etki gösterdiği düşünülür. Nitekim pekçok in vitro çalışma bu hipotezi desteklemektedir. Ham *Nigella sativa* yağı ve fransiyonları (doğal lipidler, glikolipidler ve fosfolipidler), içerdikleri total çoklu doymamış yağ asitleri, sabunlaşmayanlar ve fosfolipidlere bağlı olarak radikal temizleyici etki göstermektedir (*Ramadan ve ark.*, 2003).

Hepotoksisite ve nefrotoksisite, L-alanin aminotransferaz (ALT), alkalel fosfataz (ALP), lipid peroksidaz (LPD) ve glutasyon (GSH) ve süperoksit dismutazı içeren antioksidan temizleme enzim sistemi gibi mediyatörlerin seviye ve aktivitelerindeki değişimlerle ilişkilidir. *Nigella sativa*'nın antioksidan etkileri, tert-bütıl hidroperoksit, karbon tetraklörür, doksorubisin, gentamisin, metiyonin, potasyum bromat, sisplatin, veya *Schistosoma mansoni* enfeksiyonu ile indüklenen farklı karaciğer ve böbrek toksisiteleri in vivo murin (sıçan) modelleri üzerinde araştırılmıştır (*El-Dakhakhny ve ark.*, 2000; *Nagi ve ark.*, 1999; *Meral ve Kanter*,

2003; Meral ve ark., 2001; Kanter ve ark., 2003; Türkdöğün ve ark., 2001; Ali, 2004; Khan ve ark., 2003). Söz konusu in vivo çalışmalarda elde edilen bulgular bir araya getirildiğinde *Nigella sativa* yağının , bileşenlerinin anti-oksidan özelliklerine bağlı olarak, anti-toksik aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır.

Karbon tetraklorür enjeksiyonundan önce sıçanların profilaktik olarak timokinonla muamele edilmesi, karbon tetraklorürün hepatoksisitesini yükselmiş serum enzim düzeylerini düşürmek ve hepatik glutatyon içeriğini belirgin düzeyde arttırmak yoluyla iyileştirmektedir (Burits ve Bucar, 2000; Enomoto ve ark., 2001). Sıçanların başka uçucu yağlarla muamelesi söz konusu enzim ve glutatyon düzeylerinde değişiklik meydana getirmemiştir. Timokinonun sıçanlarda doksorubisin ile indüklenmiş nefrotoksisite, kardiyotoksisite ve oksidatif stres üzerine etkisi gösterilmiştir. Buna göre timokinon nefrotik hiperlipidemi ve hiperproteinüri oluşumunun önler ve oksidatif stresin biyomarkerlerinin değerleri normale döner (Badary ve ark., 2000).

2009 yılında Girard-Lalancette ve arkadaşları tarafından reaktif oksijen türlerinin kullanışlı bir indikatörü olan DCFH-DA'yı kullanan hücre bazlı bir test geliştirilmiştir. Söz konusu test anti oksidan özelliklerinde tespitinde oldukça hassastır. Bourgoü ve arkadaşları (2010) Tunus'taki çörekotu tohumlarının yağı üzerinde yaptıkları çalışmada *Nigella sativa* yağı ve etken maddesi timokinonun anti-oksidan özelliklerini söz konusu test ile ölçmüş ve *Nigella sativa* esansiyel yağının ROS üretimini belirgin biçimde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. ROS inhibisyonu hücreleri oksidatif stresten korumaktadır. *Nigella sativa* yağının temel etken bileşeni olan timokinonun diğer bileşenlerin aksine *ex vivo* ortamda yüksek antioksidan aktivite gösterdiği aynı çalışmada gösterilmiştir. IC<sub>50</sub> bir biyokimyasal prosesi yarı yarıya inhibe eden madde miktarını belirtmek için kullanılan değerdir. *Kuersetin* bilinen bir antioksidandır ve bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Bkz. Tablo 2.3.2.1.).

**Tablo 2.3.2.1.** *Nigella sativa* yağı ve temel bileşeni timokinonun anti-oksidan aktiviteleri.

Test edilen bileşikler	DCFH oksidasyonunun inhibisyonu (IC <sub>50</sub> ) (µg/mL)
<i>Nigella sativa</i> yağı	1.00 ± 1.00
Timokinon	0.20 ± 0.16
Kuersetin (pozitif kontrol)	0.20 ± 0.20

*Nigella sativa* tohumları geleneksel tıpta yukarıda anlatılan anti-oksidan özelliklerine bağlı olarak kullanılmaktadır. *Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin, rastlantısal olarak çevresel veya enfeksiyona bağlı faktörlerce veya anti-kanser ilaçlarca tetiklenen oksidatif stresin aracılık ettiği toksisiteyi azalttığı görülmektedir. Örneğin, kemoterapi, siklofosfamid ve diğer anti-kanser ilaçlar, anti-kanser terapi olarak veya kanser immüterapi ile kombinasyon halinde prelinik ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Kemoterapi, olgunlaşmamış granüositlerin oldukça genişlemesine ve büyük miktarda NO (nitrik oksit) ortaya çıkmasına sebep olur. Timokinonun kemoterapinin tetiklediği nitrik okside karşı oluşan immün cevabı baskılayıcı etkileri vardır. Buna göre kemoterapiyi takiben timokinon uygulanması uygun olacaktır.

### 2.3.3. Anti-İnflamatuvar Etkiler

İnflamasyonun akut ve kronik fazlarının devamlılığı ve ilerlemesi bir miktar mediatör tarafından sağlanır. Bunlar, eikosanoidler, oksidanlar, sitokin, makrofaj ve nötrofil gibi inflamator hücreler tarafından salgılanan litik enzimlerdir (*Lefkowitz ve ark.*, 1999). Başta NO olmak üzere reaktif oksijen türleri, doku harabiyetine sebep olan bol miktarda toksik oksidatif reaksiyonlar başlatır. *Nigella sativa*'nın anti-inflamatuvar aktiviteleri hücresele NO oluşturma kapasitesinin inhibisyonu yolu ile belirlenmiştir. Pekçok dokuda nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-argininden sentezlenen NO pekçok inflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilir. Bourgo ve arkadaşları (2010) Tunus'tan toplanan *Nigella sativa* tohum yağı ve bileşenleri üzerinde çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre *Nigella sativa* yağı LPS-indüklü NO sekresyonunu %90 oranında, *Nigella sativa*'nın temel aktif bileşeni timokinon ise NO üretimini %95 oranında inhibe etmektedir. Timokinonun NO üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi uyarılabilir ROS mRNA'sı ve protein ekspresyonunu azaltma yoluyla gerçekleşmektedir (*El-Mahmoudy ve ark.*, 2002).

Reaktif oksijen türlerinin indüklediği inflamasyona ek olarak, inflamasyona sebep olan iki enzim vardır; siklooksigenaz (COX) ve lipoksigenaz (LO) (*Williams ve ark.*, 1999). COX, araşidonik asitten prostaglandinlerin ve tromboksanın oluşumunu katalizlerken, LO, lökotrienlerin oluşumunu katalizler. Prostaglandinler ve lökotrienler alerji ve inflamasyonların esas mediyatörü olarak işlev göstermektedir. Prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienlerin tümüne eikosanoidler denir (*Gürdöl & Ademoğlu*, 2006).

Araşidonik asit, 20:4 ( $\Delta^{5,8,11,14}$ ), eikosanoidlerin öncüsüdür ve memeliler için esansiyel yağ asitleri olan linoleat ve linolenattan sentezlenir. Fosfolipaz A<sub>2</sub>, pekçok memeli hücresinde bulunur ve hormonlara veya diğer uyarılara yanıt olarak membran fosfolipidlerine saldırır, gliserolün ortadaki karbonundan araşidonik asidi uzaklaştırır. Düz endoplazmik retikulum enzimleri, prostaglandin ve tromboksanların öncülü olan PGH<sub>2</sub>'nin oluşumundan başlayarak, araşidonik asiti prostaglandinlere dönüştürür. Prostaglandin H<sub>2</sub> sentaz olarak da bilinen siklooksigenaz enzimi (COX) araşidonik asitin PGH<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalizleyen iki işlevli bir enzimdir ve dönüşümü iki basamakta gerçekleştirir. İlk basamakta enzim ilk işlevi olan

siklooksigenaz aktivitesiyle yapıya moleküler oksijeni sokarak prostaglandin  $G_2$ 'yi ( $PGG_2$ ) oluşturur. İkinci basamakta ise enzim ikinci işlevi olan peroksidaz aktivitesi göstererek  $PGG_2$ 'yi  $PGH_2$ 'ye dönüştürür. Kandaki trombositlerde bulunan tromboksan sentaz  $PGH_2$ 'yi diğer tromboksanların türetildiği tromboksan  $A_2$ 'ye çevirir. Tromboksanların görevi , kan pıhtılaşmasının erken basamaklarındaki trombosit agregasyonu ve kan damarlarının daralmasıdır. Tromboksanlar ve prostaglandinler beş-altı atomlu bir halka taşımaktadırlar ve araşidonik asitten bu bileşiklerin sentezi döngüsel bir yol olarak kabul edilir. Bununla beraber araşidonik asitten lökotrienlerin oluşumu doğrusal yol olarak kabul edilmekte ve bahsi geçen döngüsel yoldan farklılık göstermektedir (*Nelson & Cox, 2005*).

Lökotrienlerin sentezi, araşidonik asite moleküler oksijenin girmesini sağlayan 5-lipoksigenazın katalizörlüğünde gerçekleşir. Lökositlerde, kalpte, beyinde, akciğerde ve dalakta bulunan 5-lipoksigenazlar sitokrom P-450 kullanan karışık-işlevli oksidazlardır (*Nelson & Cox , 2005*). Lökotrienlerin sentezi öncesinde enzim aktive edilir. Bu aktivasyon süreci  $Ca^{++}$  ve ATP bağımlıdır ve enzimin sitozolden hücre membranına translokasyonunu içerir. Translokasyon sonrasında enzim, bir nükleer membran proteini olan FLAP (5-LO aktive edici protein) ile aktive edilir. Aktif 5-LO, 5-HPETE (5-hidroperoksieikosatetraenoik asit) oluşumu ve bu metabolitin epoksi lökotrien  $A_4$ 'e dönüşümünü katalizler. 5-HPETE yarılanma süresi çok kısa olan ve stabil olmayan bir ara moleküldür. Lökotrien  $A_4$  bütün lökotrienlerin sentezinde ortak ara basamaktır. Sonrasında Lökotrien  $A_4$  ( $LTA_4$ ) , hidrolaz aracılığıyla lökotrien  $B_4$ 'e ( $LTB_4$ ) veya lökotrien  $C_4$  sentetaz aktivitesi ile peptidolökotiren  $LTC_4$ 'e dönüşür. Lökotrien  $C_4$  sentetaz, glutatyon-S-transferaz sınıfı bir enzimdir ve  $LTA_4$ 'ün glutatyon ile konjuge olarak peptidolökotrien  $LTC_4$ 'e dönüşümünü katalizler.  $LTC_4$  ekstraselüler ortama taşınır ve burada  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz katalizörlüğünde  $LTD_4$ 'e ,  $LTD_4$  de dipeptidaz katalizörlüğünde  $LTE_4$ 'e dönüştürülür.  $LTC_4$  ve metabolitleri  $LTD_4$  ile  $LTE_4$  sisteinil lökotrienler veya peptidolökotrienler olarak adlandırılmaktadır (*O'Bryne , 1997; Mayatepek & Hoffmann , 1995; Claesson & Dahlen , 1999; Chung , 1995; Ford-Hutchinson & Jakobson, 1997; Henderson , 1994; Dahlen , 1998* ).

Birçok in vitro çalışmada *Nigella sativa* yağının ve yağın aktif bileşenlerinin, söz konusu mediyatörlerin üretilmesindeki inhibe edici etkileri gösterilmiştir.

Timokinon ve *Nigella sativa*'nın ham yağının, araşidonik asit metabolizmasındaki COX ve 5-LO yolaklarını inhibe ettiği ve timokinonun etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (*Mansour & Tomhamre* , 2004; *Houghton ve ark.*, 1995). Her iki maddenin, beyin fosfolipid lipozomlarındaki enzimatik olmayan peroksidasyonu da inhibe ettiği ve yine timokinonun etkisinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna karşın, *Nigella sativa*'nın sabit yağının eikosanoid oluşumu ve lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi timokinonun etkisinden daha fazladır ve yağın içeriğindeki, doymamış yağ asitleri gibi bileşenlerin, *Nigella sativa* yağının anti-eikosanoid ve anti-oksidan etkilerinde rol aldığı düşünülür. Dahası, kalsiyum- veya iyonofor-stimüle polimorfonükleer lökositlerin yani nötrofillerin *Nigella sativa* yağının ham ekstraktı, nigellone veya timokinondan herhangi biri ile in vitro muamelesi, 5-LO ürünlerinin ve 5-hidroksieikosatetraenoik asitin oluşumunu derişime bağımlı olarak inhibe etmektedir (*El-Dakhakhny ve ark.*, 2002). Sonuç olarak, *Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin anti-inflamatuar etkisi, COX ve 5-LO yolaklarının inhibisyonu yoluyla gerçekleşmektedir.

*Nigella sativa* yağının bileşenlerinin Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) ve kolit gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda anti-inflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir. EAE, merkezi sinir sistemini etkileyen otoimmün sinir lifleri üzerindeki miyelin tabakasını yok eden bir hastalıktır. İnsan multiple sklerozunun bir hayvan modelidir. Hastalığın mediyatörü T hücreleridir ve oksidatif stres de hastalığın oluşuşum ve devamlılığında merkezi rol oynar (*Chakrabarty ve ark.*, 2003). EAE'li hayvanlar timokinonla muamele edildiğinde, timokinonla muamele edilmeyen EAE'li hayvanlara nazaran, glutasyon düzeylerinin yükseldiği ve hastalık belirtileriyle birlikte perivaküler inflamasyonun ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu durumda timokinonun EAE modeli üzerinde terapötik potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır. Buna bağılı olarak, insanlardaki mutipl skleroz tedavisinde timokinonun pozitif etkisi olduğu sonucuna varılır.

Ülseratif kolit, akut inflamasyon döngüleri, ülserasyon ve kolonik mukozadaki kanamalarla karakterize edilen bir diğerk antiinflamatuvar hastalıktır. Kolitin patojenezi tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, eikosanoid, lökotrien, trombosit aktive edici faktör ve oksijen üreten serbest radikaller gibi pek çok medyatör bu hastalığının patojenezinden sorumludur (*Nieto ve ark.*, 2000).

Campieri ve arkadaşları ile Gionchetti ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışmada anti-inflamatuar ajanların, Koch ve arkadaşları ile Choudhary ve arkadaşlarının sırasıyla 2000 ve 2001 yıllarında yaptıkları çalışmada anti-oksidan ajanların hastalığın semptomları üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir. 2003 yılında Mahgoub, sıçanlarda asetik asit ile indüklenen kolit üzerine timokinonun etkilerini araştırmıştır. Araştırmacı, hayvanlara, %3'lük asetik asit intrakolonik enjeksiyonu uygulamadan önceki 3 gün boyunca timokinon vermiş ve timokinonun asetik asit ile indüklenen kolite karşı anti-kolit bir ilaç olan sülfasalazinden daha yüksek etkiyle koruma sağladığını göstermiştir. Bu çalışmaya göre timokinonun anti-kolit etkisi, anti-oksidan ve anti-histaminik aktiviteleri tarafından sağlanmaktadır.

İnflamatuar immün cevabın keskinliği, inflamatuvar lezyonlarda inflamatuvar hücrelerin toplanmasıyla kontrol edilir. Bu proses, belirli inflamatuvar kimokinlerin ve adhezyon moleküllerinin inflamatuvar hücrelerden, ICAM-1'den, VCAM-1'den ve endotelial hücrelerden ekspresyonuyla sağlanır. Söz konusu inflamatuvar kimokinler; MCP-1 (CCL2), MIP-1a (CCL3), MIP-1h (CCL4) ve RANTES (CCL5)'dir (Kallinich ve ark., 2005; Bagglionini ve ark., 1994). Adhezyon molekülleri ise LFA-1, CD62L and CD44'dir (Cartier ve ark., 2005). *Nigella sativa*'nın immün cevap üzerine inhibisyon etkisinin potansiyel mekanizması, kimokinlerin ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu modüle etme yoluyla inflamatuvar hücrelerin işleyişinin değiştirilmesi şeklinde olduğu düşünülmektedir. Tüm bu anlatılanlarla karşın, *Nigella sativa*'nın kimokinler ve adhezyon molekülleri ile IL-1 ve TNF- $\alpha$  inflamatuvar sitokinlerinin inhibisyonu ve IL-8 kimokininin çoğaltılması üzerindeki etkisine yönelik çalışmalar literatürde yoktur. *Nigella sativa* tohumlarının farklı inflamatuvar hastalıkları üzerindeki güçlü anti-inflamatuar göz önünde bulundurularak, *Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin immün hücrelerin kimokin ve adhezyon molekülleri ekspresyonu üzerine etkileri aydınlatılmalıdır. Böylelikle *Nigella sativa*'nın terapötik imkanlarına dair bilimiz artacaktır.

### 2.3.4. Anti-Histaminik Etkiler

Histidin esansiyel bir aminoasittir ve dekarboksilaz ile piridoksal fosfat aracılığıyla histamine dönüşür. Bazofiller, mast hücreleri, mide mukozası, bağırsak ve bazı beyin kısımlarında sentezlenen histamin veziküllerde depo edilmekte ve oksijen, sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle serbestleşmektedir. Heparin-protein kompleksiyle iyonik olarak etkileşmesinin yanında bağırsaklar ve bronşlarda H<sub>1</sub> reseptörüne bağlanır ve düz kasların kasılmasına sebep olur. Ayrıca asetilkolin ve gastrin etkisiyle mide mukoza hücrelerinde salgılanır ve H<sub>2</sub> reseptörlerine bağlanarak hidroklorik asit salgılanmasını uyarır. Histaminin aşırı salgılanması vücutta allerjik reaksiyonlara sebep olur. Dahası küçük venlerde daralma yaparak kapillerlerin genişlemesine yol açan histaminin ödem ve damar yatağı hacminde artışa ve buna bağlı olarak kan basıncının düşmesi ile allerjik şoka sebep olduğu bilinmektedir. Bunların yanısıra histamin, beyinde nörotransmitter olarak görev yapmaktadır (Gürdöl & Ademoğlu, 2006).

Histamin, bronşial astım gibi durumlarla ilişkili allerjik reaksiyonlar oluşturmak üzere vücut dokularından salgılanır. *Nigella sativa* tohumlarının içerdikleri etken maddelerin, tohumların geleneksel kullanımıyla, histaminin tetiklediği inflamatuvar hastalıklar üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Bronşial astımdan muzdarip hastalara ağızdan *Nigella sativa* tohumu verildiğinde, hastaların büyük bir kısmında semptomları hafiflettiği gözlenmiştir. Bu antihistaminik etkinin *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağından izole edilen ditimokinon tarafından sağlandığı gösterilmiştir ve izole ditimokinona Nigellone denilmiştir (El-Dakhakhny M., 1965). Bu çalışmayı takiben, bronşial astımdan muzdarip çocuklara ve yetişkinlere uygulanan Nigellone tedavisinde etkin sonuçlar alınmış ve hiçbir toksik etki gözlenmemiştir. Bir klinik çalışmada, allerjik iç burun iltihabı, bronşial astım, atopik ekzama gibi allerjik hastalıklardan muzdarip kişiler, *Nigella sativa* ile tedavi edildiğinde *Nigella sativa* yağının IgE, eosinofil sayısı, plazma ve idrardaki endojen kortizol miktarını düşürdüğü gözlenmiştir (Kalus ve ark., 2003). Buna göre, *Nigella sativa* yağı, allerjik hastalıkların tedavilerine ait etkilerin ortaya çıkmasında yardımcı nitelik taşımaktadır.



*Nigella sativa* tohumunun bileşenlerinin antialerjik özellikleri anti histaminik etkileriyle ilişkilendirilebilir. İn vitro çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir. Timokinonun antihistaminik etkilerinin, kısmen araziidonik asit metabolizmasının lipoksigenaz ürünlerinin inhibisyonu ile birlikte histamin ve serotonin reseptörlerinin seçilimsiz olarak bloke edilmesi sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (*Al-Majed ve ark.*, 2001) .

Prelinik ve klinik çalışmalar ile de *Nigella sativa* tohumlarının anti-histaminik etkilerini gösterilmiştir. Bunun için, mukozadaki histamin içeriğini belirgin bir şekilde arttıran ve oral yolla etanol alınmasıyla indüklenen gastrik ülser modeli kullanılmıştır. Ülser indüksiyonundan önce *Nigella sativa* yağı verilen sıçanların ve verilmeden ülser indüklenen sıçanların gastrik mukozadaki histamin miktarları ölçülmüş ve önceden *Nigella sativa* yağı ile muamele edilen sıçanların gastrik mukozadaki histamin içerikleri daha düşük bulunmuştur. *Nigella sativa* yağıyla muamelenin, gastrik mukozadan histamin salınmasına karşı % 53.56 oranında koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (*El Dakhakhny ve ark.*, 2000). El Dakhakhny ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gösterilen histamin salgısını azaltıcı etkisi yanında, başka bir çalışmada timokinonun histamine karşı tetikleyici etki gösterdiği gösterilmiştir (*El Tahir ve ark.*, 1993). İki durum da göz önünde bulundurulduğunda *Nigella sativa* yağının içeriğinde bulunan farklı etken maddelerin histamin salınımı üzerine farklı etkileri olduğu sonucuna varılır. *Nigella sativa* ham ekstraktının Nigellone aktif bileşeni (ditimokinon) kalsiyum kanalı blokeri olarak etki gösterir ve bu etkiye bağlı olarak, *Nigella sativa* diyare, astım ve hipertansiyona karşı geleneksel terapötik olarak kullanılmaktadır.

### 2.3.5. Anti-Mikrobiyal Etkiler

*Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-helminitik ve anti-viral olmak üzere anti-mikrobiyal özellikleri olduğu rapor edilmiştir.

Murin (sıçan) sitomegalovirüsü (MCMV) immün yetmezliği olan hayvanlarda tüm vücuda yayılan ve ölümcül bir hastalığa sebep olan bir herpes virüsüdür (*Reynolds ve ark.*, 1993) ve immün yetmezliği olan insanlardaki insan sitomegalovirüsü ile benzerdir (*Moro ve ark.*, 1999). *Nigella sativa* yağının anti-oksidan etkisi, anti-viral aktivitesine katkıda bulunan başka bir mekanizma sunmaktadır. *Nigella sativa* yağının MCMV enfeksiyonuna karşı anti-viral etkileri, anti-viral tedavide yeni yollar açmaktadır. İleride yapılacak olan çalışmalarla bu etki başka viral modeller üzerinde teyit edilmeli ve bu anti-viral etkinin hangi aktif bileşenlerce sağlandığı açığa kavuşturulmalıdır.

Schistosomiasis, üçüncü dünya ülkelerinde yaygın olarak görülen tropikal parazitik bir hastalıktır. Hastalıktan korunma, hücresel ve hümoral ( vücut sıvılarından ileri gelen) bağışıklık aracılığıyla mümkün olmaktadır. Aşı denemeleri yapılmasına rağmen, kemoterapi halen insan konakçı için tek seçenektir (*Chitsulo ve ark.*, 2004) . Aboul-Ela tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada *Nigella sativa* tohumu ekstraktının ve timokinonun *S. mansoni* enfeksiyonuna karşı potansiyel koruyucu etkisi gösterilmiştir. *S. masoni* bulaşmış farelerin *Nigella sativa* yağıyla muamelesinin karaciğerdeki *S. masoni* kurtlarının sayısı azalttığı, karaciğer ve bağırsaktaki yumurta miktarını düşürdüğü görülmüştür. *Nigella sativa* yağı, Schistosomiasis tedavisinde tercih edilen Praziquantel isimli ilacın etkisini arttırdığı gösterilmiştir (*Mahmoud ve ark.*, 2002). *S. masoni* bulaşmış farelere *Nigella sativa* yağı verilmesi, serum albumin düzeyi ile ALT, ALP ve GGT aktiviteleri gibi enfeksiyona bağlı biyokimyasal ve patolojik değişimleri gidermiştir (*Mahmoud ve ark.*, 2002; *Gharib ve ark.*, 1999). Murin (sıçan) Schistosomiasis'inde, çeşitli sitokinler, granüloamatöz inflamatuvar cevabın mediyatörü olarak rol almaktadır. Buna bağlı olarak, sitokin düzeylerinin modülasyonu inflamatuvar cevabın keskinliğini düzenler. Anti-Schistosome etkilerine benzer olarak, *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağı 1:100 seyreltmeyle bile tenya, toprak solucanı, nematod (iplik kurdu) ve

bağırsak kurduna karşı anti-helminitik etki göstermektedir ( *Agarwal ve ark.*, 1979; *Akther ve Riffat*, 1991).

Anti-viral ve anti-helminitik etkilerine ek olarak *Nigella sativa* yağı , *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi pekçok bakteriye karşı antibakteriyel ve bunların yanı sıra patojenik maya *Candida albicans* ve fungusu karşı anti-fungal etki göstermektedir (*Hanafy & Hatem*, 1991; *Khan ve ark.*, 2003; *El-Fatary*, 1975; *Morsi*, 2000). *Nigella sativa*'nın bileşenlerinden ditimokinonun gram-pozitif bakterilere karşı anti-bakteriyel etki gösterdiği El-Fatary'nin 1975 tarihli çalışmasında gösterilmişti. Burada dietil eter ekstraktının, gram-pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* ve gram-negatif bakteriler olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı konsantrasyona bağımlı inhibisyonu söz konusudur. Dahası, eter ekstraktının pekçok antibiyotiğin etkisini arttırdığı gösterilmiştir (*Hanafy & Hatem*, 1991). Daha önemlisi, ekstraktın *V. Cholera*, *E. Coli* ve *Shigella dysenteriae* suçlarını da içeren ilaca dirençli bakterilere karşı daha etkin olduğu kanıtlanmıştır (*Morsi*, 2000). *In vivo* olarak *Nigella sativa* tohumu dietil eter ekstraktı farelerde öldürücü olmayan derialtı stafilokok enfeksiyonunda, enfeksiyon bölgesine enjekte edildiğinde enfeksiyonu tamamen tedavi etmektedir (*Hanafy & Hatem*, 1991). Buna göre, *Nigella sativa* tohumunun bileşenleri *in vivo* ortamda farklı konakçı faktörler aracılığıyla bakterisidal aktivite göstermektedir. Bourgou ve arkadaşları (2010) Tunus'tan toplanan *Nigella sativa* tohumlarının yağı ve bileşenlerinin *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Kloramfenikolün pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada *Nigella sativa* yağının antibakteriyel özelliğinin esas olarak timokinon içeriğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Bkz. Tablo 2.3.5.1.).

**Tablo 2.3.5.1.** *Nigella sativa* yağı ve timokinonun antibakteriyel özellikleri.

Test edilen bileşikler	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
<i>Nigella sativa</i> yağı	IC <sub>50</sub> = 12.0 ± 4.0 µg/mL	IC <sub>50</sub> = 62.0 ± 17.0 µg/mL
Timokinon	IC <sub>50</sub> = 1.8 ± 0.6 µM	IC <sub>50</sub> = 41.0 ± 19.0 µM
Kloramfenikol	IC <sub>50</sub> = 7.0 ± 1.0 µM	IC <sub>50</sub> = 0.8 ± 0.1 µM

*Candida albicans*'ın fareye aşılması, farenin karaciğer, dalak ve böbreklerinde *Candida albicans* kolonileri meydana getirir. Bu modelin kullanılarak *Nigella sativa* tohumlarının sulu ekstraktlarının anti-fungal etkileri araştırılmıştır. *Candida albicans* inokülasyonundan (aşılmasından) 24 saat sonra enfekte fareler *Nigella sativa* tohumlarının sulu ekstraktı ile 3 gün boyunca muamele edilmiştir. *Nigella sativa* muamelesiyle çalışılan tüm organlardaki fungus büyümesinin inhibe olduğu görülmüştür (*Khan ve ark.*, 2003).

Anlatılan çalışmalarda *Nigella sativa* yağı ve bileşenlerinin anti-viral, anti-helminetik, anti-bakteriyel ve anti-bakteriyel özelliklerinden bahsedilmiştir fakat ilerde yapılacak çalışmalarla *Nigella sativa*'nın anti-bakteriyel etkilerinin spesifik mekanizmaları aydınlatılmalı, tohumların bakteriyel, parazitik ve viral modellerde tek başına veya diğer ilaçlarla nasıl etki gösterdiği araştırılarak potansiyel terapötik etkileri ortaya çıkarılmalıdır.

### 2.3.6. Anti-Tümör Etkiler

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalmasdır. Sözkonusu hücreler, hücrenin yaşam döngüsü kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermez ve kontrolsüz bir biçimde çoğalıp bölünmeyi sürdürür, normal doku ve organları istila ederek tüm vücuda yayılır. Hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu ortaya çıkan hücre topluluklarına tümör denir ve tümörler malign ve benign olmak üzere iki grupta incelenir. Deride görülen basit siğiller benign tümörlere örnek verilebilir. Benign tümörler çevredeki dokuya veya vücudun diğer bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşın malign tümörler hem çevrelerindeki dokuya hem de kan veya lenfatik sistem aracılığıyla tüm vücuda yayılım gösterirler. Kanser hücrelerinin oluştukları çevre dokulara ve sonrasında tüm vücuda yayılması metastaz olarak nitelendirilir.

Kanserler, karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar olmak üzere üç ana gruba ayrılabilir. Karsinomlar, insanlarda görülen kanserlerin %90'ını oluşturur ve epitel hücre kaynaklıdır. Sarkomlar, insanlarda daha az görülür ve kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokularında meydana gelen katı tümörleri kapsar. İnsanlarda görülen kanser türlerinin %7'lik kısmını oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan hücreleri veya immün sistem hücrelerinde gelişir. Bu sınıflandırmanın haricinde kanserler tümörün geliştiği organ veya dokuya göre de sınıflandırılırlar. Meme kanseri, lenf kanseri bu sınıflandırmaya örnek gösterilebilir .

Klonalite kanserin temel özelliklerinden biridir. Buna göre tümörler normal dışı çoğalmaya başlayan tek bir hücreden gelişir. Birçok tümörün tek hücreden türediği X kromozomu inaktivasyonu analizi ile gösterilmiştir. Bununla beraber tümörlerin klonal olması, tümör gelişimine sebep olan hücrenin başlangıçta kanser hücresinin tüm özelliklerini taşıdığı anlamına gelmez. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücreler seçilime uğramakta ve bu yetenekleri daha çok kazanmış kanser hücreleri yaşamını sürdürürken diğerleri elenmektedir. Kanser gelişiminin ilk aşaması olan tümör başlangıcı tek bir hücrenin mutasyona uğrayarak normal dışı çoğalmasının

sonucunda gerçekleşir. Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu giderek büyür. Tümör ilerlemesi, sözkonusu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesiyle devam eder (*Cooper & Hausman* , 2006).

Kanserin daha iyi anlaşılması için hücre döngüsünün anlaşılması önemlidir. Embriyonik büyüme ve daha sonraki gelişme sırasında, hücre bölünmesi her dokuda meydana gelir. Ökaryotlarda hücre döngüsü dört everede gerçekleşir: M , G<sub>1</sub> , S ve G<sub>2</sub> . S sentez fazıdır ve DNA her iki yavru hücre için kopya oluşturmak üzere replike olur. G bölünmeler arasındaki boşluğu göstermektedir ve gap kelimesinin baş harfini temsil eder. G<sub>2</sub> fazında yeni proteinler sentezlenir ve hücrenin büyüklüğü yaklaşık iki katına çıkar. M mitoz fazını gösterir. M fazında maternal nükleer kılıf çatlar, eş kromozomlar hücrenin iki zıt ucuna çekilir, her bir yavru kromozom takımı yeni oluşan nükleer kılıfla kaplanır ve sitokinezle hücre ikiye bölünerek iki yavru hücre oluşur. G<sub>1</sub> bekleme fazıdır. Embriyonik veya hızlı çoğalan dokularda her bir yavru hücre G<sub>1</sub> fazı olarak adlandırılan bekleme süresi sonrasında bölünmeye devam edecektir. Bir hücre M fazından G<sub>1</sub> fazına geçtikten sonra bölünmeye devam edebilir veya bölünmesini durdurur. Hücrenin bölünmesini durdurması saatler, günler veya hücrenin tüm yaşamı boyunca sürebilir ve hücrenin pasif olarak bulunduğu bu faz G<sub>0</sub> fazı olarak adlandırılır. Terminal olarak farklılaşan hücreler G<sub>0</sub> fazındadır ve tekrar bölünmeye başlayacak olursa hücre döngüsüne G<sub>1</sub> fazından dahil olur (*Nelson & Cox* , 2005).

Hücre döngüsü kontrol noktaları ve *feedback* kontroller ile denetlenmektedir. Bunlar hücre döngüsünün farklı evrelerinde yer alan olayları koordine ederler, replike olmamış ya da hasarlı DNA'lara duyarlıdırlar ve DNA replikasyonunun tamamlanması ya da onarımı ile hücre döngüsünü ayarlarlar. Bu kontrol noktaları yavru hücrelere genomun tamamının geçmesini garanti eder. Kontrol noktalarından biri hasarlı ya da tamamen kopyalanmamış DNA'ya yanıt olarak hücreleri G<sub>2</sub> fazında durdurur. Hasarlı DNA varlığı, aynı zamanda G<sub>1</sub> ve S fazlarındaki kontrol noktalarında döngüyü durdurmaktadır. Bir diğer kontrol noktası da M fazında bulunmaktadır ve yavru kromozomların mitoz iğinde düzgün dizilmemeleri halinde mitozu durduracaktır.

Memeli hücrelerinde  $G_1$  fazının kontrol noktasındaki duraksama p53 proteininin etkisiyle gerçekleşir. ATM ve Chk2 protein kinazlardır. DNA hasarına yanıt olarak ATM ve Chk2 tarafından fosfatlanan p53 kararlı hale gelir hücredeki miktarı hızla artar. Bir transkripsiyon faktörü olan p53, hücre döngüsünü durduracak olan proteinlerin ekspresyonunu indükleyecektir.

Kanser, hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Gen ekspresyonunu hızlandıran veya kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına sebep genetik değişikliklerle anormal hücre çoğalmasına neden olan kanser öncülü genler onkogen adını alır. Hücre çoğalmasının kontrolünde bunun tam tersi mekanizmayı simgeleyen, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılayan genler ise tümör baskılayıcı genler olarak anılır. Lösemi, lenfoma, sarkoma ve beyin tümörleri ile meme, bağırsak ve akciğer karsinomları gibi birçok kanser türünde sıklıkla işlevini kaybettiği görülen gen p53'tür. p53 proteinini kodlayan bu gen sözkonusu kanserlerde mutasyona uğramış durumdadır. Bu mutasyonlar sonucunda p53 işlevini kaybeder. Hasarlı DNA'ya yanıt olarak  $G_1$ 'de duraksamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak onarılmadan yavru hücrelere geçer. Hasarlı Dna'ların kalıtımı, mutasyon sıklığında artışa ve genel bir genom kararsızlığına neden olur, bu da kanser gelişimine katkıda bulunur. Buna göre hücre döngüsünün düzenlenmesinin çok hücreli organizmaların hayatında ne kadar kritik bir öneme sahip olduğu anlaşılır.

Programlanmış hücre ölümü apoptoz olarak bilinen ve farklı morfolojik değişikliklerle karakterize edilen aktif bir süreçtir. Apoptoz sırasında kromozomal DNA genellikle nükleozomlar arasından olmak üzere kesilerek parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır ve çekirdek küçük parçalara bölünür. Sonrasında hücre büzülür ve zarla çevrilmiş parçalara ayrılır. Bu parçalara apoptotik cisimcikler denir. Sözkonusu apoptotik hücreler ve hücre parçaları hem makrofajlar hem de komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagosite edilir. Buna göre apoptoz ile ölen hücreler dokular tarafından etkin bir şekilde yok edilmiş olur .

Kaspazlar programlanmış hücre ölümünün en sondaki efektörüdür ve 100 kadar farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. Kaspazların ana hedefleri

arasında bir Dnaz inhibitörü yer alır ve aktifleştiklerinde nükleer DNA'nın parçalanmasından sorumludurlar. Memeliler Bcl-2 ailesi olarak adlandırılan bir protein ailesini kodlar. Bcl-2'nin kendisi de dahil olmak üzere Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri kaspaz aktivasyonu ve programlanmış hücre ölümü inhibitörleri olarak görev yaparlar. Bcl-2 ilk kez lenfomalarda tanımlanan bir onkogendir. Bcl-2, hücreyi ölüme götüren durumlarda apoptozu engelleyerek hücre sağ kalımını destekler. Bcl-2'nin onkogen olarak etkisi, programlı hücre ölümünün kanser gelişimi açısından önemini gösteren ilk bulgudur .

p53 geninin ürünü hem hücre döngüsünün ilerlemesini hem de apoptozu düzenlediğinden p53'ün kaybı, hücre hasarına bağlı duraklamayı ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına ve hücre genomunda kararsızlığa neden olur. Bu tür genetik kararsızlık, kanser hücrelerinin ortak özelliğidir. p53'ün apoptoz üzerindeki etkisi, Bcl-2 ailesinin, hücre ölümünü başlatan üyelerinden birini aktifleştirmesidir. Normal memeli hücrelerinde onarılamayan DNA hasarı apoptozu başlatır. Bu olay kanserleşme olasılığı yüksek, hücre için zararlı mutasyonlar taşıyan hücreleri ortadan kaldırdığından organizma için önemli avantajlar sağlar. p53'ten yoksun hücreler, DNA hasarına yol açan radyasyon veya kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi ajanların etkisiyle apoptozu girmez. DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi , tümörlerin kemoterapiye direnç göstermesine neden olur. p53'ün kaybı buna ek olarak büyüme faktörü eksikliği ya da oksijen yokluğu gibi başka uyarılara bağlı olarak gerçekleşen apoptozu da engeller. p53'ün hücre sağ kalımı üzerindeki bu etkisi, insan tümörlerinde p53 mutasyonlarının çok sık gözlenmesini açıklar (*Cooper & Hausman* , 2006).

Pekçok in vivo ve in vitro çalışma ile *Nigella sativa* tohumlarının ve aktif bileşenlerinin anti-tümör etkileri gösterilmiştir. *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağının etkileri, insanlarda görülen farklı kanserler üzerinde araştırılmış ve yağın bazılarına karşı sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (*Islam ve ark.*, 2004). Buna örnek olarak; MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinin *Nigella sativa*'nın sulu ve alkollü ekstraktlarının tek başına veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte muamele edilmesiyle , söz konusu hücre büyümesinin durduğu gösterilmiştir (*Swamy & Tan*, 2000). Buna göre *Nigella sativa*'nın, tek başına veya oksidatif stres ile birlikte, etkili bir anti-kanser ajan olduğu sonucuna varılır. *Nigella sativa* yağının anti-tümör mekanizmaları üzerine



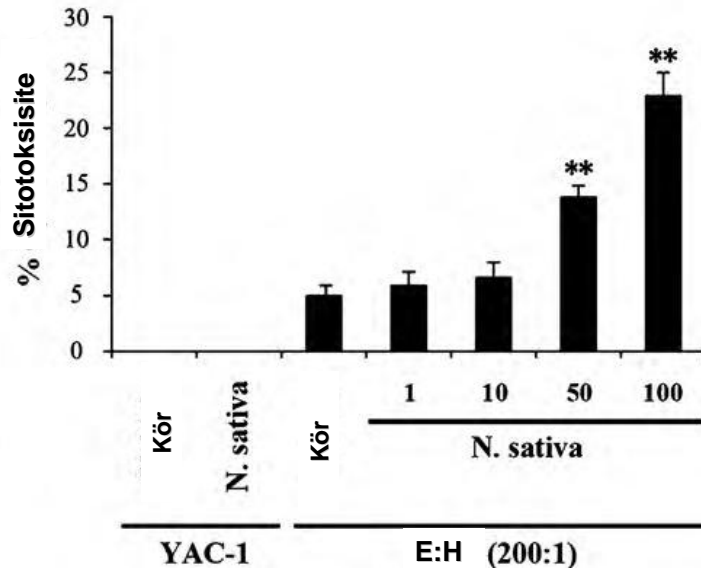
çalışmalar yapılmıştır. Buna göre, *Nigella sativa* ekstraktları, derişime bağımlı olarak, metastazı tetikleyen faktörleri inhibe eder. Bunlar; tip 4 kolajenaz, metalloproteinaz, serinproteinaz inhibitörleri (*Medenica ve ark.*, 1997); anjiojenik protein-fibroblastik büyüme faktörü (Swamy ve Tan, 2000); doku tipi plazminojen aktivatörü, ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü ve plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1 (*Awad*, 2005). Tümör hücrelerinin bu faktörleri meydana getirerek metastazlarını sürdürdükleri düşünülürse, *Nigella sativa* yağının anti-tümör etkileri, bölgesel tümör invazyonu ve metastazın in vivo inhibisyonu aracılığıyla anti-anjiojenik etkiler üzerinden ortaya çıkıyor olmalıdır.

*Nigella sativa*'nın ham ekstraktının anti-tümör etkilerinin yanında, timokinon, ditimokinon ve diğer aktif bileşenlerinin de sitotoksik etkileri vardır. Etil asetat kolon kromatografik fraksiyon 5 (CC-5)'ten ekstrakte edilen *Nigella sativa* aktif bileşeni veya ahedrin, farklı kanser hücre gruplarına karşı anti-tümör etkisi gösterilmiştir. Ahedrin, hepatoselüler karsinom, lösemik hücre, Lewis akciğer karsinomuna karşı seçicidir (*Swamy & Tan*, 2000). Timokinon ve ditimokinon farklı kanser hücre gruplarına karşı eşit sitotoksik etki gösterir. Söz konusu kanser hücre grupları, pankreatik adenokarsinom, insan rahim sarkoması ve insan lösemik hücreleridir (*Salomi ve ark.*, 1992; *Worthen ve ark.*, 1998). Timokinon ve ditimokinon, bu hücrelerin büyümesini, hücre döngüsü G1 fazında iken apoptozu tetikleyerek durdurur. Hücre büyümesinin durdurulması ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunun artırılması ve anti-apoptotik Bcl-2 proteininin inhibe edilmesi ile sağlanır (*Gali-Muhtasib ve ark.*, 2004). Bu demektir ki, timokinonun anti-neoplastik etkisi, p53'e bağımlı ve Bcl-2 proteini ile modüle edilen pro-apoptotik etkiler aracılığıyla gerçekleşir.

*Nigella sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin in vitro anti-tümör etkileri, farklı tümör modelleri üzerinde yapılan in vivo çalışmalarla teyit edilmiştir. Salomi tarafından 1992 yılında yapılan in vitro sitotoksik çalışmada *Nigella sativa*'nın ham metanol ekstraktının Ehrlich Assit Karsinomu (EAK), Dalton lenfoma (DLA-assit) ve Sarkoma-180 hücreleri (S-180 hücreleri) üzerinde yaklaşık %50 oranında sitotoksik etki yaptığı gösterilmiştir. Yine Salomi'nin 1991 tarihli çalışmasında *Nigella sativa* yağının topikal uygulanmasının farelerde kroton yağı ile indüklenmiş deri kanserinin başlama ve artmasının inhibe olduğu gösterilmiştir. *Nigella sativa* yağı tümör

boyutunu küçültmekte, karaciğer metastazını engellemekte, P815 mastositoma tümör taşıyan farelerin ölümünü geciktirmektedir (*Ait Mbarek ve ark.*, 2007). El-Kadi ve arkadaşları tarafından 1989 yılında yapılan çalışmada, sağlıklı gönüllülerde *Nigella sativa* yağı ile 4 haftalık muamelenin T helper hücrelerin T supresör (baskılayıcı) hücrelere oranını ve doğal katil hücrelerin (Natural Killer-NK) fonksiyonunu arttırdığı gözlenmiştir.

*Nigella sativa*'nın NK hücreler üzerindeki etkisi 1991'de Matzinger tarafından tanımlanan JAM testi ile araştırılmıştır. Test için YAC-1 tümör hücreleri kör solüsyon ve dört farklı dozda (1 , 10 , 50 ve 100 g/mL) sulu *Nigella sativa* ekstraktı ile efektör hücreler (NK) varlığında kültüre alınmıştır. Efektör hücreler hedef hücrelere efektör:hedef oranı 200:1 , 100:1 ve 50:1 olmak üzere üç farklı oranda uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak YAC-1 tümör hücreleri efektör NK hücrelerini içermeyen sulu *Nigella sativa* ekstraktı ile muamele edilmiştir. Kör solüsyonda NK hücrelerinin E:H oranı 200:1 olduğunda YAC-1 tümör hücrelerinde %5 oranında sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. *Nigella sativa*'nın dozu arttıkça sitotoksik etkisinin de arttığı görülmektedir sulu ekstraktı YAC-1 tümör hücrelerindeki NK sitotoksik aktivitesini belirgin bir şekilde arttırmaktadır. Şekil 2.3.6.1.'de E:H oranı 200:1 olduğunda köre karşı, artan *Nigella sativa* dozlarına göre sitotoksik etki yüzdeleri değerlendirilmiştir. Özellikle dikkat edilmelidir ki *Nigella sativa*'nın sulu ekstraktının YAC-1 tümör hücreleri üzerine direk sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. *Nigella sativa*, doğrudan bir sitotoksik etki yerine NK aktivitesini artırma yetisi sayesinde YAC-1 tümör hücrelerini ölümünü tetiklemektedir (*Majdalawieh ve ark.*, 2010).



**Şekil 2.3.6.1.** *Nigella sativa*'nın sulu ekstraktının YAC-1 lenfoma hücreleri üzerindeki doza bağımlı sitotoksik etkisinin efektör:hedef oranı 200:1'de gösterimi.

### 2.3.7. Hematolojik Etkiler

Pekçok doğal ürünün hematolojik etkileri ortaya çıkarılmıştır. Enomoto ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada *Nigella sativa*'nın trombosit agregasyonu, kanın koagülasyonu ve fibrinoliz aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Trombositler 2 – 4 µm çapında, çekirdeksiz, disk biçiminde hücre parçacıklarıdır ve kanın pıhtılaşmasını sağlamak ve kan damarlarındaki çatlakların onarılmasına yardımcı olarak kan kaybına engel olurlar (*Junqueira & Carneiro*, 2006). Hemostaz, bütünlüğü bozulmuş bir damardan kanamanın kendiliğinden durmasına verilen isimdir. Hemostaz, birincil ve ikincil olmak üzere iki proseste gerçekleşir. Üç aşamada gerçekleşen birincil hemostazın ilk aşamasında fibrin çözünmeyen bir bağ oluşturacak şekilde kümeleşerek yaralanan damar bölgesinde kanama durdurulur. İkinci aşamada trombositler hasarlı damar bölgesine yapışarak tıkaç oluşturur. Son aşamada ise hasarlı damarın vazokonstriksiyonu ile kanın damar

dışına akışı yavaşlatılır. İkincil hemostaz ise yaklaşık yirmi plazma proteininin katıldığı koagülasyon prosesidir.

Bağ dokusunun en önemli proteinlerinden biri olan kollajen endotelin bütünlüğünde bir bozulma olduğunda açığa çıkacaktır. Kan dolaşımında von Willebrand faktörler denilen glikoproteinler bulunmaktadır ve endotel bütünlüğünde bahsi geçen bozulma meydana geldiğinde von Willebrand faktörleri bir yandan kollajene diğer yandan da trombositlerin glikoprotein Ib/IX/V reseptörleri aracılığı ile trombositlere bağlanır. Bu proses sayesinde trombositlerin bir yandan adhezyonu sağlanırken diğer yandan aktive olurlar. Aktif trombositler yapılarında bulunan aktin ve miyozin ile hasarlı bölgede iğne şeklinde çıkıntılar oluşturup bölgeyi kaplarken glikoprotein Iıb/IIIa reseptörü yapısal değişikliğe uğrar ve kan dolaşımındaki fibrinojene karşı yüksek affinite kazanır. Trombositler fibrinojen aracılığıyla birbirlerine bağlanır ve agregate olurlar. Trombosit agregasyonu trombositlerden ADP ve tromboksan A<sub>2</sub> salınımıyla otokatalitik olarak gerçekleşir. Önceden bahsedildiği gibi bu işlem primer hemostaz olarak tanımlanır. Küçük hasarlarda bu işlem yeterlidir fakat kanamanın büyük olduğu durumlarda sekonder hemostazın yani pıhtılaşma faktörlerinin de devreye girmesi gerekecektir. Pıhtılaşma sisteminin aktifleşmesi ve sürmesi fosfolipid bir yüzeye gereksinim gösterir. Bu fosfolipid yüzey trombositler tarafından sağlandığından dolayı trombositler hemostaz ve trombozda kilit öneme sahiptir (*Yenerel , 2009; Gürdöl & Ademoğlu , 2006*).

Fibrinojen, ikişer çift  $\alpha$  ,  $\beta$  ve  $\gamma$  zincirlerinden oluşan polipeptidlerin N terminallerinden disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmasından oluşan bir proteindir.  $\alpha\alpha^1$  ve  $\beta\beta^1$  altbirimlerinin N-terminalleri aynı yüktedir ve birbirlerini iterler. Bu itme kuvveti fibrinojenin agregasyonunu önler. Fibrinojenin fibrin olmasını sağlayan trombin dolaşımında protrombin halinde bulunur ve protrombinin N-terminal bölgesinde bulunan on  $\gamma$ -karboksiglutamat kalıntılarına Ca<sup>++</sup> bağlanır. Pıhtılaşmanın erken döneminde aktif faktör X-aktif faktör V ve protrombinden bir protrombinaz kompleksi oluşur. Protrombine bağlanan Ca<sup>++</sup> iki proteinin membran yüzeylerine ve yaralanma bölgesine bağlanmasını kolaylaştırır. Protrombinaz kompleksi iki proteolitik ayrılmayla protrombinin aktiflenmesini sağlar. Protrombin aktiflendikten sonra ayrılmalar gerçekleşir ve trombin meydana gelir. Trombin, fibrinojeni bir arada tutan bağları açarak fibrin moleküllerinin yumuşak pıhtı halinde agregate olmasına yol

açar. Oluşan yumuşak pıhtı aktif faktör III'ün kataliziyle oluşan kovalent çapraz bağlarla stabilize edilerek güçlendirilir. Transglutaminidaz olan aktif faktör III fibrinin çapraz bağlanmasını ve sert pıhtı oluşumunu gerçekleştirir (*Gürdöl & Ademoğlu, 2006*).

Plazmin doku plazminojen aktivatörü etkisiyle plazminojenden oluşan bir proteindir. Plazmin tarafından hemostatik tıkaçtaki fibrinin bir seri reaksiyonla eritilerek uzaklaştırılır. Bu proses fibrinoliz adını alır ve plazminojenin aktiflenmesi, plazminin inaktive edilmesi ve fibrin sindirimi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir (*Gürdöl & Ademoğlu, 2006*).

Enomoto ve arkadaşları (2000), öncelikle *Nigella sativa* yağını çözünürleştirmek için n-hekzan ve metanol ile muamele etmişler, tavşan kanı kullanarak *Nigella sativa* yağının trombosit agregasyonu ile koagülasyon üzerindeki inhibisyon etkilerini ve fibrin tabaka yöntemiyle de fibrinolizi araştırmışlardır. Araşidonik asit ve adenozin difosfat (ADP) bu çalışmada trombosit agregasyonunu indükleyici ajanlar olarak kullanılmıştır. Bu çalışma ile *Nigella sativa* yağının kan pıhtılaşması üzerinde yüksek inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. Sonrasında *Nigella sativa* yağının metanolde çözünen kısmının kan pıhtılaşması ve trombosit agregasyonu üzerindeki inhibisyon etkisinin diğer kısımlarına göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. *Nigella sativa* yağının metanolde çözünen kısmı silika jel kolon kromatografisi ile I'den X'e kadar on fraksiyona ayrılmıştır. Her fraksiyon tekrar tetkik edilmiş ve III ile IV numaralı fraksiyonların araşidonik asit indüklü trombosit agregasyonunda yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. II ve IX numaralı fraksiyonlar ise kan pıhtılaşmasının inhibisyonunda güçlü etki göstermiştir. Bunların yanısıra tüm fraksiyonlar düşük de olsa fibrinolizi ilerletici ve ADP indüklü trombosit agregasyonunu inhibe edici etki göstermiştir.

Enomoto ve arkadaşları (2000) çalışmalarının devamında III ve IV numaralı fraksiyonları kolon kromatografisi ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırmıştır ve elde ettikleri bileşikleri tanımlamışlardır. Bu çalışma sonunda araşidonik asit indüklü trombosit agregasyonu üzerinde inhibisyon etkisi gösteren biri yeni, diğer ikisi ise önceden bilinen üç bileşik izole etmişlerdir. Elde ettikleri yeni bileşiği kütle spektroskopisi ile analizlediklerinde 2-(2-metoksipropil)-5metil-1,4-

benzenediol olarak tanımlamışlardır. Diğer iki bileşiğin ise timol ve karvakrol olduklarını tespit etmişlerdir. Sonrasında elde edilen üç bileşiğin hidroksil grupları asetillenmiş ve sözkonusu asetillenmiş bileşiklerle aralarında ,önceki kısımlarda sıkça söz ettiğimiz, timokinonun da bulunduğu beş analog bileşiğin araşidonik asit indüklü trombosit agregasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda, aromatik hidroksil grupları bulunan sözkonusu üç bileşiğin ve onların asetillenmiş formlarının trombositin çaresi olarak kabul edilen aspirinden 30 kat daha fazla inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

### 2.3.8. İmmünomodülatör Etkiler

Bağışıklık, patojen bulaşmış moleküler paternleri tanıyabilen doğal bağışıklık ve spesifik antijenleri tanıyabilen kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki çeşide ayrılabilir (*Medzhitov & Janeway, 2000*). Doğal bağışıklık, makrofajlar, doğal katil hücreler (natural killers) , granüositler gibi spesifik olmayan hücreleri kapsarken kazanılmış bağışıklık, antijen spesifik antikor salgılayan B hücreleri aracılı salgısal bağışıklığı ve CD4<sup>+</sup> (helper) CD8<sup>+</sup> (sitolitik) T hücreleri aracılı hücresele bağışıklığı kapsamaktadır (*Lucey ve ark., 1996*). CD4<sup>+</sup> T helper hücreler immün cevabın düzenlenmesinden sorumluyken CD8<sup>+</sup> T hücreleri enfeksiyon veya kanser içeren bölgelere litik etki gösteren öldürücü hücrelerdir. T hücrelerinin bu iki türü enfeksiyonların giderilmesi ve kanserin kontrol altına alınmasında kritik öneme sahip hücrelerdir.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarla *Nigella sativa*'nın immün yanıt üzerine etkileri olduğu saptanmıştır. Dört hafta boyunca *Nigella sativa* ile muamele edilen deneklerin büyük bir çoğunluğunda CD4 ve CD8 T hücreleri oranının %55 kadar, doğal katil hücrelerin ise %30 kadar arttığı Haq ve arkadaşlarının 1995 ve 1999 çalışmalarında gösterilmiştir. Haq ve arkadaşları tarafından yapılan söz konusu çalışmalarda *Nigella sativa* tohumlarının ve tüm protein içeriklerinin immünomodülatör özellikleri in vitro araştırılmıştır. Tüm *Nigella sativa* tohumlarının ve çözünür fraksiyonlarının, farklı mitojenlere karşı insan periferik kanı

mononükleer hücrelerinin yanıtı üzerine etkileri tetkik edilmiş ve bileşenlerin T hücre mütojenleri olan fitohemogglutinin (PHA) veya Konkanavalin-A (Con A)'ya karşı insan periferal kan mononükleer hücre yanıtında belirgin bir tetikleyici etki gözlenmemiştir. Buna karşın, *Nigella sativa* bileşenlerinin bir araya toplanmış allojenik hücrelere karşı mononükleer hücre cevabını tetiklediği bulunmuştur. Dahası, karışık lenfosit kültürlerinde *Nigella sativa*'nın saflaştırılmış dört farklı proteininin tetikleyici etki göstermiştir. T hücrelerinin proliferasyonu üzerinde tetikleyici etki gösteren *Nigella sativa* yağının B hücreleri üzerinde tetikleyici etkiye sahip olmadığı Swamy ve Tan tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada vurgulanmaktadır. Bu bulgulara göre *Nigella sativa* yağının ana bileşenleri T hücre aracılı hücre sel bağışıklığı tetikleyici etki gösterirken diğer bileşenleri B hücre aracılı humoral bağışıklığı baskılamaktadır. Bulgular değerlendirildiğinde *Nigella sativa*'nın hücre sel bağışıklığı tetikleyici etkisinin immün yanıtın doğasına bağlı olduğu sonucuna varılabilir (Salem, 2005).

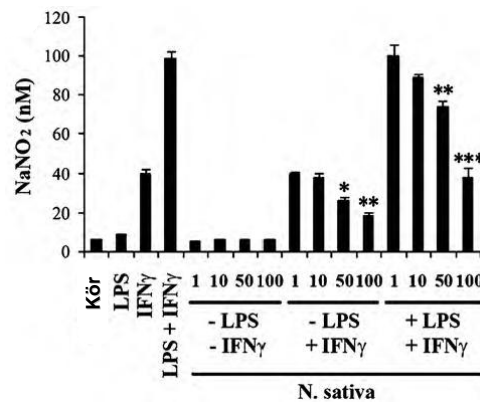
In vitro çalışmaları destekler nitelikte in vivo çalışmalarda da *Nigella sativa* yağının T hücre bağışıklığı üzerine olan tetikleyici etkileri gözlenmiştir. Abuharfeil ve arkadaşları (2001) *Nigella sativa* tohumlarının sulu ekstraktlarının dalak menşeli doğal katil hücre sayısını iki kat kadar arttırdığını ve bu doğal katil hücrelerin YAC-1 tümör hedeflerine karşı sitotoksitelerinin normal kontrol doğal katil hücrelerin sitotoksitelerine nazaran daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Buna ek olarak Farahr ve arkadaşlarının 2004'teki çalışmaları *Nigella sativa* yağının oral yolla alınmasının makrofaj ve doğal katil hücre sayısını arttırarak bağışıklığa destek olduğunu göstermektedir. Farahr ve arkadaşları streptozotosin (STZ) indüklü diyabetik farelerin bir kısmına 6 hafta boyunca oral yolla *Nigella sativa* vermişler, kontrol grubuna vermemişler ve 6 hafta sonunda *Nigella sativa* verilmemiş diyabetik farelerle söz konusu farelerin periferik kanlarındaki makrofaj, lenfosit ve doğal katil hücre sayılarına bakmışlardır. *Nigella sativa*, T hücre fonksiyonunun yaşa bağlı olarak azalması üzerinde de iyileştirici etki göstermektedir. *Nigella sativa*'nın gıdalarla tüketimi yaşlılarda diyetle alınan lipidlerin toplam miktarını ve tipini değiştirerek immün yanıtı arttırmaktadır (Hummel , 1993). *Nigella sativa* yağı , n-6 PUFA a-linoleik asit (18:3n-6) ve n-3 PUFA a-linoleik asit (18:3n-3) ve stearidonik asit (18:4n-3) yağ asitleri bakımından zengindir (Laakso & Voutilainen, 1996).

*Nigella sativa* tohumlarının yağ asidi kompozisyonu günlük diyetle alınması önerilen n-3 ve n-6 yağ asitlerini kapsamaktadır (Yehuda & Carasso, 1993). Wu ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada *Nigella sativa* yağını diyetleriyle alan sağlıklı yaşlı kişilerin immün cevabının geliştiğini ve bu durumun T hücreleri aktivasyonu ile bağlantılı faktörlerdeki değişiklikler aracılığıyla gerçekleştiğini bulmuşlardır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık (hipersensitivite) deri testleri, hücre aracılı immün fonksiyonun tespitinde geniş kullanıma sahiptir ve gecikmiş tip aşırı duyarlılığın azalması, morbidite ve mortalitedeki artışla bağlantılıdır. Christou ve arkadaşlarının 1989 tarihli çalışmalarına göre *Nigella sativa* yağı, ön ilaveli ölçümler veya plasebo grubu ile kıyaslandığında gecikmiş tip aşırı duyarlılık testi uygulanmasından 24 saat sonra spesifik antijenlere yanıt olarak endürasyon çapını belirgin bir şekilde arttırmaktadır.

T hücre aracılı immün yanıt üzerindeki artırıcı etkilerinin yanısıra *Nigella sativa* bileşenlerinin B hücre aracılı bağışıklık üzerine azaltıcı etkisi olduğunu gösteren in vitro çalışmalardan daha önce bahsedilmiştir. Islam ve arkadaşlarının 2004 tarihli çalışmaları in vivo ortamda da bahsi geçen hipotezi destekler niteliktedir. Söz konusu çalışmada *Nigella sativa*'nın uçucu yağının, tifoid TH antijeni aşılama sıçanlardaki antijen spesifik yanıtları üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, *Nigella sativa* yağı verilen sıçanların tifoid aşılama yanıtı olarak antikor üretimlerinin yaklaşık iki kat azaldığı görülmüştür. İn vivo ve in vitro çalışmalar göstermektedir ki *Nigella sativa* bileşenleri hücreli bağışıklığı tetikler ve artırırken humoral bağışıklığı baskılamaktadır. İleride yapılacak çalışmalarla bu hipotez doğrulanmalı ve her iki etkiye sebep olan *Nigella sativa* bileşenleri tanımlanmalıdır. Buna bağlı olarak *Nigella sativa*'nın immünomodülatör etkileri hastalığa aracılık eden immün yanıtın doğası göz önünde bulundurularak ölçülmelidir. Çünkü prostaglandinler (PGE), lökotrien B4 (LTB4) ve oksidatif stres medyatörleri, lenfosit proliferasyonunu düşürücü etki gösterir (Shapiro ve ark., 1993; Meydani ve ark., 1990). Bununla beraber *Nigella sativa* yağı bu medyatörlerin üretimini azaltmaktadır ve tüm bunlar *Nigella sativa* yağının hücre aracılı bağışıklığı artırıcı etkilerinin kısmen de olsa anti inflamatuvar etkileri ile bağlantılı olduğunu akla getirmektedir (Salem, 2005).



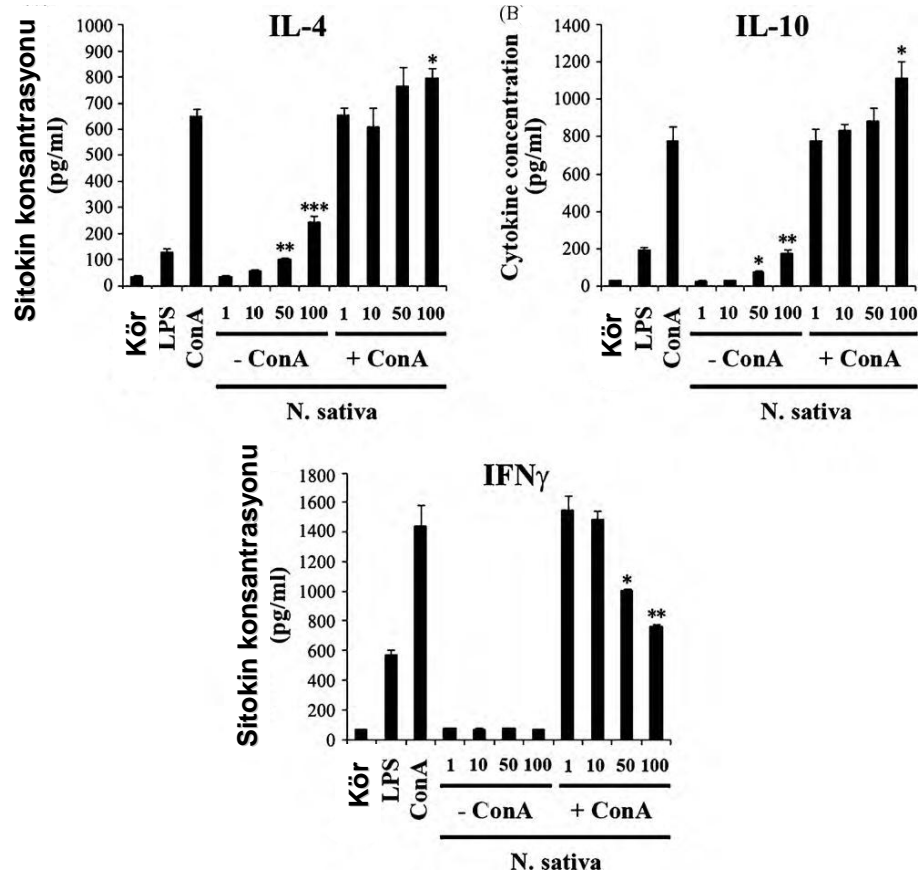
Sitokinlerin nitelikleri ve nicelikleri bağışıklığın başlatılması ve sonlandırılmasında kritik öneme sahiptir. CD4 T helper hücreler aktive olduktan sonra ya IL-2, IL-12, IFN-g ve TNF-a salgılayan TH1-tip hücelere veya IL-4,IL-5, IL-10 ve IL-13 salgılayan TH2-tip hücelere farklılaşırlar. TH1 ve TH2 sitokinleri arasındaki denge inflamatuvar yanıtın hücresele veya humoral yanıtı karşı yöneliminde kritiktir. TH1/TH2 oranına etkileyecek herhangi bir faktör yanıtın sonucunu da etkileyecektir (Lucey ve ark., 1996). *Nigella sativa* sulu ekstraktının makrofajlar üzerindeki immünomodülatör etkileri 2010 yılında Majdalawieh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada araştırılmıştır. BALB/c farelerinin makrofajları kör solüsyonda, LPS’de, IFN $\gamma$ ’da, LPS ve IFN $\gamma$ ’nın kombinasyonunda ve *Nigella sativa* sulu ekstraktının LPS ve/ya IFN $\gamma$  varlığında dört farklı dozunda (1 , 10 , 50 , 100  $\mu$ g/mL) kültüre alınmıştır. Kültüre alınmış makrofajların NaNO<sub>2</sub> üretimleri Griess testi le ölçülmüştür. Çalışma sonunda makrofajların kör solüsyonla, LPS ile, IFN $\gamma$  ile ve LPS-IFN $\gamma$  kombinasyonu ile muamele edilmiklerine sırasıyla 6 , 9 , 40 ve 100 M NaNO<sub>2</sub> ürettikleri bulunmuştur. Sadece IFN $\gamma$  ile muamele edilen makrofajlarla kıyaslandığında *Nigella sativa* sulu ekstraktının doza bağımlı NO üretimi inhibisyonunu tetiklediği dikkati çekmektedir ki 50  $\mu$ g/mL ve 100  $\mu$ g/mL’deki söz konusu inhibisyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $P=0.012$  ve  $P=0.002$ ). Bunun yanısıra araştırmacılar *Nigella sativa* sulu ekstraktının hem LPS hem de IFN $\gamma$  varlığındaki NO üretimini de istatistiksel anlamlı olarak belirgin bir şekilde inhibe ettiği bulgularına ulaşmışlardır (Bkz. Şekil 2.3.8.1.) .



Şekil 2.3.8.1. *Nigella sativa* sulu ekstaktının makrofajların NO üretimi üzerindeki doza bağımlı inhibisyon etkisi.

Haq ve arkadaşları (1995) *Nigella sativa* tohumu proteinlerinin sitokin üretimi üzerine etkilerini araştırdıklarında , söz konusu proteinlerin allojenik hücrelerin varlığında da yokluğunda da lenfosit kültürlerindeki IL-3 ve IL-1 üretimi arttırdığını tespit etmişlerdir. Buna karşın aynı koşullar altında kültüre alındıklarında, *Nigella sativa* tohumlarının veya herhangi çözünür fraksiyonlarının IL-2 ve IL-4 üretimi üzerine hiçbir etkisi tespit edilmemiştir. Haq ve arkadaşlarının 1999 tarihli çalışmalarında aktiflenmemiş veya mitojenle aktiflenmiş periferik kan mononükleer hücreleri tarafından TNF-a üretimi üzerine *Nigella sativa* ve fraksiyonlanmış proteinlerinin tetikleyici etkisinden bahsedilmiştir. *Nigella sativa*'nın sitokin üretimi üzerine etkisinin tohumun doğasına ve içeriğinin miktarına bağlı olduğu gibi sitokinlerin doğasına da bağlı olduğu açıktır.

Majdalawieh ve arkadaşları (2010) *Nigella sativa*'nın TH1 ve TH2 üzerindeki immünomodülatör etkilerini araştırmışlardır. Buna göre araştırmacılar splenositlerden IL4 ve IL10 (TH2 sitokinler) ve IFN $\gamma$  (TH1 sitokin) sekresyonlarını kör solüsyon, LPS varlığı, ConA varlığı ve ConA varlığında ve yokluğunda *Nigella sativa* sulu ekstraktının dört farklı dozunda (1 , 10 , 50 ve 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ölçmüşlerdir.Çalışma sonucunda *Nigella sativa* sulu ekstraktının düşük dozlarının belirgin bir etkisi saptanmazken TH2 sitokinler üzerinde *Nigella sativa*'nın 50  $\mu\text{g/mL}$  ve 100  $\mu\text{g/mL}$  dozlarında istatistiksel anlamlı artış gözlenmiştir. Diğer yandan ConA bulunmayan ortamda splenositlerde TH1 sekresyonu olmadığı dikkat çekerken ConA bulunan ortamda *Nigella sativa* sulu ekstraktının artan dozlarında istatistiksel anlamlı düşüş sağladığı görülmüştür (Bkz. Şekil 2.3.8.2.). Buna göre *Nigella sativa* sulu ekstraktı doza bağımlı olarak IL4 ve IL10 (TH2 sitokinler) sitokinlerinin salınımını stimüle ederken IFN $\gamma$ 'nın (TH1 sitokin) sekresyonunu inhibe etmektedir. Bulgulara bağlı olarak *Nigella sativa*'nın immün cevabın TH1/TH2 dengesini düzenleyebildiği sonucuna varılabilir.



**Şekil 2.3.8.2.** *Nigella sativa* sulu ekstraktının splenositlerden IL4 ve IL10 (TH2 sitokinler) ve IFN $\gamma$  (TH1 sitokin) salınımı üzerine doza bağımlı etkisi.

Fonksiyonel immün yanıt doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki etkileşime bağımlıdır. Bağışıklığın bu iki kolu arasındaki bağlantıyı sağlayan araçlar ise dentritik hücrelerdir. Dentritik hücreler antijenlerin T hücrelerine yönlendirilmesi ve sunulmasına en etkili elemanlar oldukları ve patojenik T hücre popülasyonlarının aktivasyon ve/ya regülasyonunda kritik rol oynadıkları Manfredi ve arkadaşlarının 2005 tarihli çalışmalarında vurgulanmıştır. Olgunlaşmamış dentritik hücreler efektör T hücre cevaplarının aktivasyonunu baskılayan düzenleyici T hücrelerin gelişimini teşvik ederken olgun dentritik hücreler, IL-12 ve TNF-a'ları üzerinden, efektör T hücrelerin gelişimini teşvik etmektedir (Akbari & Umetsu, 2005). Pekçok anti inflamatuvar ilaç etkilerini dentritik hücre fonksiyonlarının modülasyonu üzerinden gösterir. Estradiol hormonu doğal bir antiinflamatuvar ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Salem ve arkadaşları 2000 ve 2004 yıllarında yaptıkları

çalışmalarda doğal estradiolun T hücre aracılı bağışıklık üzerindeki anti-inflamatuar etkilerini gözlemlemişlerdir. Buna göre estradiolün T hücre aracılı bağışıklık üzerindeki anti-inflamatuar etkileri estradiol ile muamele edilen farelerde dentritik hücrelerin antijene hassas T hücrelerinin optimal proliferasyonunu arttırmakta yetersiz kalışına bağlıdır. EAE merkezi sinir sistemini etkileyen bir hastalık olan beyin inflamasyonunun hayvan modelidir. EAE genel olarak T hücre aracılı otoimmün hastalıkların bir prototipidir. 5-aminoimidazol-4karboksimid ribonükleozid, yeni geliştirilmiş sentetik bir anti-inflamatuar ilaçtır. Söz konusu ilaç deneysel otoimmün ensefalomyelit inflamasyon modeli üzerindeki etki etmekte ve bu etki dentritik hücreler ile T hücreleri çapraz konuşumunun direk inhibisyonu aracılığı ile gerçekteşmektedir (*Nath ve ark., 2005*).

Dentritik hücrelerin fonksiyonel durumunun modülasyonu immün yanıtın nitelik ve niceliğini etkiler. *Nigella sativa*'nın anti-inflamatuar etkilerine aracılık eden potansiyel mekanizma dentritik hücrelerin fonksiyonlarının modülasyonudur. *Nigella sativa* ve ürünlerinin dentritik hücrelerin fenotipleri, sitokin üretmeleri ve fonksiyonları üzerine olan etkileri hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla aydınlatılmalıdır. *Nigella sativa*'nın immunomodülatör etkilerinin daha iyi anlaşılması daha etkin immünoterapötik uygulamaların yolunu açacağından önemlidir (*Salem , 2005*).

#### **2.4. *Nigella sativa*'nın Potansiyel Toksisitesi**

*Nigella sativa* tohumlarının ham yağı ve ekstraktları ile etken maddesi Timokinonun bilinen terapötik etkileri buraya kadar anlatılmıştır. Bunlarla beraber tıpta kullanılan bitkilerin toksisitesi, insanlara yönelik terapötik uygulamalarının kabulünde kritik öneme sahiptir. Literatürde *Nigella sativa* tohumları ve bileşenlerinin olası toksik etkileri üzerine yapılmış pek fazla çalışmaya rastlanmamaktadır. 1991'de Tennekoon ve arkadaşları *Nigella sativa* tohumlarının sulu ekstraktını 14 gün boyunca erkek Sprague Dawley sıçanlarına oral yolla uygulamış ve anahtar hepatik enzimlerin düzeylerindeki değişimi ve histopatolojik değişimleri ölçererek tohumların olası toksik etkilerini araştırmışlardır. Gamma glutamil transferaz (GGT) peptidlerden ve diğer bileşiklerden  $\gamma$ -glutamil grubunu

transfer eden bir enzimdir. GGT, kas hücreleri hariç tüm hücrelerde ve serumda bulunmaktadır ve serumdaki temel kaynağı hepatobilier sistemdir. GGT, alkol ve ilaçların karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin ortaya konmasında oldukça önemlidir. Alanin aminotransferaz (ALT – SGPT) , ketoasitlerle aminoasitlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen transaminazlardan biridir. Söz konusu reaksiyonda alanin amino asitinin amino grubu  $\alpha$ -ketoglutarat keto asidine transfer edilir. Böylelikle amino asit olan alanin keto asit olan pirüvata, keto asit olan  $\alpha$ -ketoglutarat ise amino asit olan glutamata dönüşür. Normalde serumda ALT konsantrasyonu oldukça düşüktür. Karaciğer üzerindeki toksik etkiler ALT'nin serumdaki konsantrasyonunu artırır (Mehmetoğlu , 2007). Tennekoon ve arkadaşları (1991) gözle görülür patolojik değişiklik olmaksızın *Nigella sativa* ekstraktıyla muamele sonrası sıçanların serum GGT ve ALT konsantrasyonlarında belirgin artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Teste tabi tutulan bir popülasyondaki bireylerin yarısını belirli bir sürede öldüren toksik madde dozuna LD50 (Lethal Dose %50) denir. Zaoui ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada *Nigella sativa*'nın olası toksik etkilerini, deneysel fare grubunun LD50 değerlerini saptayarak ve biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değişimlerini inceleyerek tespit etmeye çalışmışlardır. Farelerin akut toksisite için LD50 değerleri tek dozda ve oral yolla alımda 28.8 mL/kg vücut ağırlığı, yine tek dozda ve intraperitoneal uygulamada 2.06 mL/kg vücut ağırlığı olarak saptanmıştır. Kronik toksisite için sıçanlar 12 hafta boyunca günlük olarak oral yolla *Nigella sativa* ekstraktına tabi tutulmuş ve LD50 değerlerinin 2mL/kg vücut ağırlığı olduğu bulunmuştur. *Nigella sativa* yağı ile 12 haftalık muamele sonunda anahtar hepatik enzimlerin düzeylerinde değişim ve herhangi histopatolojik modifikasyon gözlenmemiştir. Buna karşın serum kolesterol, trigliserid ve glukoz düzeyleri ile lökosit ve trombosit sayısında kontrol gruplarıyla kıyaslandığında belirgin bir düşüş, hematokrit ve hemogloblin düzeylerinde ise belirgin bir artış olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında *Nigella sativa* ile muamele edilen farelerin kilo alımının da yavaşladığı gözlenmiştir.

*Nigella sativa*'nın toksik olmayan etkileriyle uyumlu olarak, Salim & Fukushima (2003) Fischer 344 sıçanlarını 14 hafta boyunca *Nigella sativa* ham yağı ile muamele etmiş ve karaciğer, böbrek, dalak ve diğer herhangi bir organda, kan

veya idrar biyokimyasal parametrelerinde ve kilo alımda herhangi bir patolojik değişiklik tespit etmemişlerdir. Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda yüksek LD50 değerleri, hepatik enzimlerin stabilitesi, organ bütünlüğü *Nigella sativa*'nın toksik olmadığına işaret etmektedir ve *Nigella sativa*'nın sabit yağının terapötik dozları geniş bir marjinde güvenilirdir. Bununla beraber *Nigella sativa* yağının hemogloblin metabolizmasını değiştirdiği ve lökosit ile trombosit sayısını düşürdüğü göz ardı edilmemelidir. Ayrıca, LD50'nin intraperitoneal uygulamada oral uygulamaya oranla yaklaşık 20 kat küçük olduğu hatırlanırsa *Nigella sativa*'nın uygulanış yolu toksisitesini etkilediği görülür ve bu durum oral alımının sistemik alıma göre daha güvenilir olduğuna işaret eder. Hemogloblin metabolizmasındaki değişim ve lökosit ile trombosit sayılarındaki düşme *Nigella sativa*'nın bileşenlerinden birinin etkisiyle olmalıdır. *Nigella sativa*'nin anti-inflamatuar etkilerinden sorumlu en önemli bileşenin timokinon olması söz konusu hematolojik etkilere sebep olan bileşenin olasılıkla timokinon olduğunu düşündürmektedir. Timokinonun 4 , 8, 12.5 , 25 ve 50 mg/kg olmak üzere farklı dozlarda intraperitoneal uygulanması biyokimyasal parametrelerin CCl<sub>4</sub>-indüklü değişikliklerini etkilememektedir fakat daha yüksek dozları ölümcüldür ki timokinonun LD50'si 2001 tarihli Mansour ve arkadaşlarının çalışmasında 90.3 mg/kg olarak verilmiştir. Timokinon, sadece CCl<sub>4</sub>'ten önce 12.5 mg/kg dozunda enjekte edildiğinde etkindir. Bu çalışma sonucunda timokinonun belirgin bir dozunun (örneğin, 12.5 mg/kg, intraperitoneal) anti-oksidan olarak önemli rol oynadığı ve kimyasal yolla indüklenen hepatik hasara karşı etkin bir koruyucu ajan olarak davrandığı tespit edilmiştir. Buna karşın timokinonun daha yüksek dozları hepatik hasara yol açacak oksidatif stresi arttıracaktır. İleride yapılacak çalışmalarla *Nigella sativa* yağının, ekstraktlarının ve hatta aktif bileşenlerinin olası toksik etkilerinin üzerinde daha fazla durulmalıdır. Farklı hayvan türleri üzerinde, farklı dozlar, farklı uygulama yolları ve uygulama süreleri ile yeni çalışmalar yapılmalıdır (Salem , 2005).

**KAYNAKLAR**

Abdel-Aal ESM, Attia RS. (1993). Characterization of black cumin (*Nigella sativa*) seeds. 2-Proteins. Alexandria Science Exchange;14: 483–496.

Aboul-Ela EI. (2002) Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. Mutat Res; 516:11 – 7.

Abuharfeil NM, Salim M, Von Kleist S. (2001) Augmentation of natural killer cell activity in vivo against tumour cells by some wild plants from Jordan. Phytother Res;15:109–13.

Akbari O, Umetsu DT. (2005) Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. Curr Allergy Asthma Rep;5:56–61.

al-Gaby AM. (1998) Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. Nahrung; 42:290–4.

Al-Ghamdi MS. (2001) The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. J Ethnopharmacol;76:45– 8.

Al-Jassir MS. (1992) Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. Food Chem;45:239– 42.

Aparicio R, Roda ., Albi MA, Gutie´rrez F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4150–4155.

Atta MB. (2003). Some characteristics of *nigella* (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, 83, 63–68.

Babayán VK, Koottungal D, Halaby GA. (1978). Proximate analysis, fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Food Science*, 43, 1315–1319.

Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Lognay G, Drira N-E, Attia H. (2004). Quality characteristics and oxidative stability of date seed oil during storage. *Food Science and Technology International*; 10: 333–338.

Bhatia IS, Bajaj KL. (1972) Tannins in black-plum (*Syzygium cumini* L.) seeds. *Biochem J* ;128:56.

Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. (2010) Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany* ; 76 : 210-216.

Burtis M, Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*; 14: 323 – 328.

Caponio F, Alloggio V, Gomes T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*; 64: 203–209.

Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H. (2007) *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*; 101: 673 – 681.

Chitsulo L, Loverde P, Engels D. (2004) Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol*;2:12– 3.



Christou NV, Tellado-Rodriguez J, Chartrand L, Giannas B, Kapadia B, Meakins J, *ve ark.*. (1989) Estimating mortality risk in preoperative patients using immunologic, nutritional, and acute-phase response variables. *Ann Surg* ;210:69–77.

Chun H, Shin DH, Hong BS, Cho WD, Cho HY, Yang HC. (2002) Biochemical properties of polysaccharides from black pepper. *Biol Pharm Bull*;25:1203– 8.

Cinquanta L, Esti M, La Notte E. (1997). Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74, 1259–1264.

Cooper GM, Hausman RE. (2006) *Hücre Moleküler Yaklaşım* (M. Sakızlı ve N. Atabey, Çev.) . İzmir Tıp Kitabevi. 3. Baskı.

Correa AD, Jokl L, Carlsson R. (1986) Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its fractions. *Arch Latinoam Nutr*;36:466– 76.

Du Vigneaud V, Karr WG. (1925) Carbohydrates utilization rate of disappearance of D-glucose from the blood. *Journal of Biological Chemistry*;66, 281-300.

El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N. (2002) Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol*;2:1603– 11.

Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. (2004) Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci*;77:123– 9.

Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. (2005) Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci*;79:219-23.

Gad A M, El-Dakhakni M, Hassan M. (1963) Studies on the chemical composition of Egyptian *Nigella sativa* L. oil . *Planta. Medica*; 11; 134 – 138.

Gloria H, Aguilera JM. (1998). Assessment of the quality of heated oils by differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1363–1368.

Gutiérrez F. (1989). Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes : comparación entre el método A.O.M. y el método Rancimat. *Grasas y aceites*, 40, 1–5.

Gürdöl F, Ademoğlu E . (2006) *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 1. Baskı.

Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, al-Sedairy ST. (1995) *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*;30:147– 55.

Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. (1999) Immunomodulatory effect *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Int J Immunopharmacol* ; 21:283 – 95.

Houghton PJ, Zarka R, De La Heras B, Hoult JRS. (1995) Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*; 61: 33 – 36.

Hsu SY, Yu SH. (2002) Comparisons on 11 plant oil fat substitutes for low-fat kung-wans. *Journal of Food Engineering*, 51, 215–220.

Hummell DS. (1993) Dietary lipids and immune function. *Prog Food Nutr Sci*;17:287– 329.

Junqueira LC , Carneiro J. (2006) Temel Histoloji (Y. Aytekin ve S. Solakoğlu, Çev.) . Nobel Tıp Kitabevi.1. Baskı.

Laakso P, Voutilainen P. (1996) Analysis of triacylglycerols by silver-ion high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids*;31:1311 –22.

Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. (1996) Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*;9:532–62.

Nelson DL , Cox MM. (2005) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (N. Kılıç , Çev.) . Palme Yayıncılık. 3. Baskıdan çeviri.

Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. (2002) The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol*;79:1–11.

Majdalawieh AH, Hmaidan R, Carr IR. (2010) *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokineprofile, macrophage function and NK anti-tumor activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 131: 268 – 275.

Manfredi AA, Sabbadini MG, Rovere-Querini P. (2005) Dendritic cells and the shadow line between autoimmunity and disease. *Arthritis Rheum*;52:11 – 5.

Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al- Shabanah OA, Al-Sawaf HA. (2001) Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on

carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*; 110: 239–251.

Matzinger P. (1991) A simple assay for DNA fragment and cell death. *Journal of Immunological Methods*; 145:185 – 192.

Mazza G, Qi H. (1992) Effect after-cooking darkening inhibitors on stability of frying oil and quality of French fries. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69, 847–853.

Mehmetoğlu İ. (2007) *Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı*. Nobel Tıp Kitabevi. 4.Baskı.

Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB. (1990) Antioxidants and the aging immune response. *Adv Exp Med Biol*;262: 57–67.

Morikawa T, Xu F, Kashima Y, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M. (2004) Novel dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Org Lett*;6:869–72.

Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M. (2004) *Nigellamines* A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*;52:494–7.

Morsi NM. (2000) Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiologica Polonica*; 49: 641–649.

Nath N, Giri S, Prasad R, Salem ML, Singh AK, Singh aI. (2005) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator

with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*;175.

Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. (2003) Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch [C]*;58:629–31.

Omar A, Ghosheh S, Abdulghani A, Houdi A, Crookscor PA. (1999) High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L). *J Pharm Biomed Anal*;19:757-62.

Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69, 187–193.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsh H (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235–1247.

Pari L, Sankaranarayanan C. (2009) Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*, 85; 830 – 834.

Ramadan MF, Morsel JT. (2002) Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung* ;46:240–4.

Salem ML. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*; 5: 1749 – 1770.

Salem ML, Kadima AN, Zhou Y, Nguyen CL, Rubinstein MP, Demcheva M, *ve ark.*. (2004) Paracrine release of IL-12 stimulates IFN-gamma production and dramatically enhances the antigen-specific T cell response after

vaccination with a novel peptide-based cancer vaccine. *J Immunol*;172:5159-64.

Salem ML. (2004) Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*;3:97–104.

Salem ML, Hossain MS. (2000) In vivo acute depletion of CD8(+) T cells before murine cytomegalovirus infection upregulated innate antiviral activity of natural killer cells. *International Journal of Immunopharmacology*; 22: 707 – 718.

Salem ML, Hossain MS, Nomoto K. (2000) Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNFalpha and IFN-gamma. *Int Arch Allergy Immunol*; 121:235– 45.

Salim EI, Fukushima S. (2003) Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*;45:195– 202.

Salvador MD, Aranda F, Go´mez-Alonso S, Fregapane G. (2001) Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. Composition, quality and oxidative stability. *Food Chemistry*, 74, 267–274.

Shapiro AC, Wu D, Meydani SN. (1993) Eicosanoids derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response. *Prostaglandins*;45:229– 40.

Takruri HMH, Dameh MAF. (1998) Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). Journal of the Sciences of Food Agriculture, 76, 404–410.

Tennekoon KH, Jeevathayaparan S, Kurukulasooriya AP, Karunanayake EH. (1991) Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. J Ethnopharmacol; 31:283– 9.

Tuck KL, Hayball PJ. (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 636–644.

Üstun G, Kent L, Çekin N, Cilvelekoglu H (1990) Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (Black cumin) seed oil. Journal of American Oil Chemists Society, 67, 958–960.

Worthen DR, Grosheh OA, Crooks PA. (1998) The in vitro anti-tumor activity some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. Anticancer Research; 18 : 1527 – 1532.

Wu D, Meydani M, Leka LS, Nightingale Z, Handelman GJ, Blumberg JB, *ve ark.*. (1999) Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects. Am J Clin Nutr; 70:536–43.

Yehuda S, Carasso RL. (1993) Modulation of learning, pain thresholds, and thermoregulation in the rat by preparations of free purified alpha-linolenic and linoleic acids: determination of the optimal omega 3-to-omega 6 ratio. Proc Natl Acad Sci U S A; 90:10345 – 9.

Yenerel MN (2009) Kanamalı hastalarda hızlı tanı ve tedavi. Antalya İç Hastalıkları Kongresi.

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