

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) İLE AKCİĞER HASARI
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA ÇÖREK OTU (*Nigella sativa* L.)'NİN
KASPAZ-3, KASPAZ-9, ERK, AKT PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU
VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Didem BOYDAK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN

MAYIS-2015

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) İLE AKCİĞER HASARI OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA ÇÖREK OTU (*Nigella sativa* L.)'NİN KASPAZ-3, KASPAZ-9, ERK, AKT
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİDEM BOYDAK
(112110104)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27.04.2015

Tezin Savunulduğu Tarih: 15.05.2015

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN (F.Ü.)
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN (E.Ü.)
Prof. Dr. Sevdâ KIRBAĞ (F.Ü.)



MAYIS-2015

ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tezinde, ratlarda karbon tetraklorür ile akciğer hasarı oluşturulmuş ve ratlara çörek otu bitki ekstraktı verilerek bu bitkinin ratlar üzerinde deneysel olarak etkileri incelenmiştir.

Bu yüksek lisans tezimin oluşum aşamasında ve tüm yüksek lisans eğitimimde gerek teorik gerek pratik alanda bana her zaman yol gösteren, yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN'a; çalışmamıza değerli katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU ve çalışma ekibine; bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne (FÜBAP, F.F. 13.18); çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz FÜDAM'ın değerli çalışanlarına; çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı Arş.Gör. Muhammed İsmail CAN'a ve Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarıma teşekkür ediyorum. Ayrıca eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Elazığ-2015

Didem BOYDAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖN SÖZ	I
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğerin Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri	1
1.2. Karbon Tetraklorür (CCl ₄)'ün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması	2
1.3. Apoptozis.....	3
1.3.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt).....	5
1.4. Çörek otu ve Antioksidan Özellikleri	8
1.5. Lipit Peroksidasyonu.....	10
2. MATERYAL VE METOT	11
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çörek Otu	11
2.2. Metot	11
2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları.....	11
2.2.2. CCl ₄ Uygulaması	12
2.2.3. Çörek Otu Ekstraktının Hazırlanması	12
2.2.4. Akciğer Doku MDA Ölçümleri	13
2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri.....	13
2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi	13
2.2.7. Agaroz Jel Elektrophorezi ile DNA Hasarının Analizi	14
2.2.7.1. Akciğer Dokusundan DNA İzolasyonu	14
2.2.9. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi	15
2.2.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	15
2.2.9.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	16
2.2.10. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt Proteinlerinin Analizi.....	19
2.2.11. TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi.....	19

2.2.12.	İstatistiksel Analizler	20
3.	BULGULAR.....	21
3.1.	Canlı Ağırlık Değişimi ve Su Tüketimi	21
3.2.	DNA Hasarının Analizi	23
3.3.	MDA Ölçüm Sonuçları	23
3.4.	TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar	25
3.5.	Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar).....	27
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	30
5.	ÖNERİLER.....	35
6.	KAYNAKLAR	36
	ÖZ GEÇMİŞ	44

ÖZET

Çörek otu (*Nigella sativa* L.) akciğer üzerinde etkili olan bitkilerden biri olup yüzyıllardır tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, karbon tetraklorür (CCl₄) ile ratlarda oluşturulan akciğer hasarına karşı, çörek otunun, koruyucu bir rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. 28 adet erkek Wistar albino (n=28, 8 haftalık) rat kullanılmıştır. Ratlar, 4 gruba ayrılmış ve her grupta 7 rat yer almıştır. Gruplar: (i) Negatif Kontrol (NK): Normal su tüketen, CCl₄ ve çörek otu verilmeyen grup; (ii) Pozitif Kontrol (PK): Normal su tüketen, CCl₄ verilmeyen fakat çörek otu verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Normal su tüketen ve CCl₄ verilen grup (1,5 ml/kg canlı ağırlığı, ip); CCl₄ + çörek otu Grubu (CCl₄ +ÇO): CCl₄ ve çörek otu verilen grup (1,5 ml/kg canlı ağırlığı, ip). Kaspaz-3, kaspaz-9, erk, akt protein sentezlerine western blotlama ile bakılmıştır. Akciğer dokusundaki apoptozis düzeyi TUNEL metodu incelemeleriyle; DNA fragmantasyonu ise agaroz jel elektroforeziyle tespit edilmiştir. Plazma ve Akciğer dokusunda MDA tayini spektrofotometre ile yapılmıştır. Sonuç olarak, CCl₄ + ÇO grubunda CCl₄ grubuna göre; MDA miktarı azalmış; kaspaz-3, kaspaz-9 sentezi artmış, erk ve akt proteinlerinin ekspresyon düzeyi azalmıştır. CCl₄ + ÇO grubunda, CCl₄ grubuna göre apoptotic indeks (TUNEL sonuçları) düşmüş ve normal değerlere yaklaşmıştır. Bu sonuçlar da göstermektedir ki çörek otu bitkisi ratlarda akciğeri, hasara karşı korumaktadır ve bu bulgular, insanlar üzerinde yapılacak olan çalışmalara da yol gösterici olabilecektir.

Anahtar kelimeler: çörek otu, akciğer, DNA hasarı, apoptosis, kaspaz-3, kaspaz-9, erk, akt.

SUMMARY

THE EFFECT OF BLACK CUMIN (*Nigella sativa* L.) ON THE CASPASE-3, CASPASE-9, ERK, AKT PROTEIN EXPRESSION AND DNA DAMAGE IN RATS WITH CARBON TETRACHLORIDE (CCl₄)-INDUCED LUNG DAMAGE

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is one of the plants that are effective on the lung, are used for treatment for centuries. The aim of this study was to examine whether Black cumin (*Nigella sativa* L.) plays a protective role against the damage in the lung by administering carbontetrachloride (CCl₄) to rats. 28 male Wistar albino (n=28, 8 weeks old) rats have been used in the study. Groups were divided into four, and 7 rats involved in each group. The groups were: (i) Negative Control (NC): Normal water consuming group to which no CCl₄ and *Black cumin* (BC) is administered; (ii) Positive Control (PC): Normal water consuming group to which no CCl₄ is administered but BC is administered; (iii) CCl₄ Group: Normal water consuming and group to which CCl₄ is administered (1.5 ml/kg live weight, ip); (iv) CCl₄ + BC group: CCl₄ and BC administered group (1.5 ml/kg live weight, ip). Caspase -3, caspase -9, erk, akt protein syntheses were examined via western blotting. Tissue apoptotic index was examined via TUNEL method. The DNA fragmentation was detected by agarose gel electrophoresis. MDA (malondialdehyde) determination in plasma and lung tissue was made using spectrophotometer. As Results; MDA amount has decreased, caspase-3, caspase-9 has increased and erk, akt has decreased in the CCl₄ + BC group in comparison to CCl₄ group whereas it was observed in the CCl₄+BC group that the apoptotic index (TUNEL results) decreases in comparison with the CCl₄ group thus approaching normal values. These results show that BC plant protects the rat lung against damage and these findings, may be guiding in researchers which conducted on humans.

Key Words: Black cumin, lung, DNA damage, apoptosis, caspase-3, caspase-9, erk, akt.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Akciğer (URL-1, 2015).....	2
Şekil 2. Apoptozis geçiren bir hücre (URL-3, 2015).....	4
Şekil 3. Bir hücredeki apoptozis aşamaları (URL-4, 2015).....	4
Şekil 4. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları (URL-5, 2015).	5
Şekil 5. Çörek otu tohumu (URL-6, 2015).	9
Şekil 6. Çörek otu tohumu tanesi (URL-7, 2015).....	9
Şekil 7. Çörek otu bitkisi (URL-8, 2015).....	9
Şekil 8. Çörek otu bitkisi (URL-9, 2015).....	10
Şekil 9. Çalışmada kullanılan deney hayvanları.....	21
Şekil 10. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları.	22
Şekil 11. Gruplara göre günlük su tüketim oranları.	22
Şekil 12. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.....	23
Şekil 13. MDA standart eğrisi.....	24
Şekil 14. Akciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması	24
Şekil 15. Plazmada gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması	25
Şekil 16. Negatif Kontrol grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.....	25
Şekil 17. Pozitif Kontrol grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.....	26
Şekil 18. CCl ₄ grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).	26
Şekil 19. CCl ₄ + ÇO grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).	26
Şekil 20. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri.....	27
Şekil 21. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri.....	28
Şekil 22. Gruplara göre erk protein ekspresyon düzeyleri.....	28
Şekil 23. Gruplara göre akt protein ekspresyon düzeyleri.....	28

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Araştırma Grupları (n=7)	12
Tablo 2. TUNEL Boyama Prosedürü	20
Tablo 3. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları ve günlük su tüketimi.....	21
Tablo 4. Çalışma gruplarından elde edilen akciğer doku MDA düzeyleri.....	23
Tablo 5. Çalışma gruplarında elde edilen plazma MDA düzeyleri.....	24
Tablo 6. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%).	27

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Apaf	: Apoptozis proteaz aktive edici faktör
CA	: Canlı ağırlık
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
ÇO	: Çörek otu
BC	: <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
FÜDAM	: Fırat üniversitesi deney hayvanları araştırma merkezi
GSH	: Glutasyon
CCl₄	: Karbon tetraklorür
MDA	: Malondialdehit
NK	: Negatif kontrol
SAB	: Örnek uygulama tamponu
PK	: Pozitif kontrol
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme
PKB	: Protein Kinaz B
ERK	: Hücreler arası düzenleyici protein
MAPK	: Mitojen protein kinaz
AKT	: Protein kinaz
HER	: İnsan epidermal büyüme faktörü
ATP	: Adenozin tri fosfat
CCl₄+ÇO	: Karbontetraklorür + Çörekotu

1. GİRİŞ

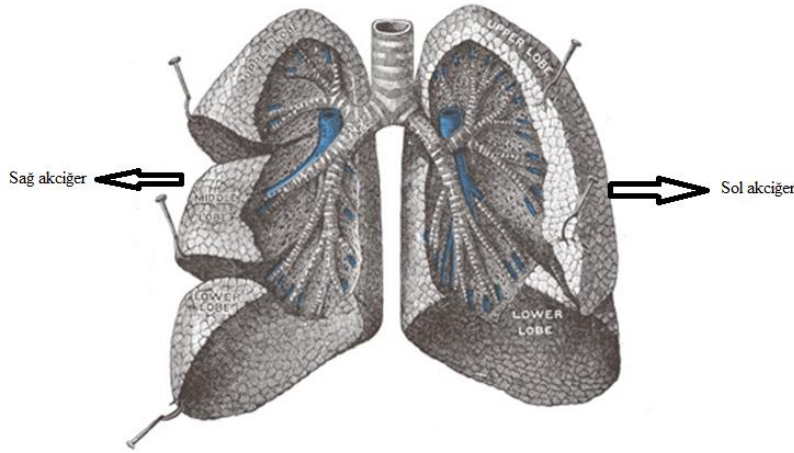
Günümüzde deney hayvanları ile yapılan birçok klinik çalışma, serbest radikallerin hücreler üzerindeki birçok toksik etkisini ve antioksidan sistemlerin bu toksik etkiler üzerindeki iyileştirici etkilerini gözler önüne sermiştir. Serbest radikaller, nitrik oksit, hidroksil, süperoksit ve lipit peroksit gibi kimyasal yapılara sahiptirler. (Li vd., 2011; Waisundara ve Hoon 2014; Al-Saeedi ve Hossain, 2015). Serbest radikaller ve zararlı kimyasal maddeler, hücrelerin DNA, protein, enzimler, lipitler, karbohidratlar ve başka molekül gruplarıyla reaksiyona girerek onların metabolizmalarını etkilemektedirler. Vücutta tüm sistemler düzenli çalıştığında düşük seviyede ortaya çıkan bu etkiler, antioksidan maddeler ve bazı temizleyici enzimlerle etkisiz kılınabilmektedir (Omata vd., 2010; Kumar vd., 2013). Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, dokularda hasar oluşturmak için etkili modellerden biri olan karbon tetraklorür (CCl_4), oksidatif stresi indükleyen ve dokularda hasara yol açan zehirli bir kimyasaldır. Yapılan çeşitli araştırmalar CCl_4 'ün, akciğer, kalp, böbrek, beyin, karaciğer gibi birçok dokuda ve kanda serbest radikal üretimine neden olduğunu göstermiştir (Vuda vd., 2012; Aslan ve Can, 2014). Çabuk buharlaşma özelliği olan, saydam, yanıcı olmayan ve yoğun bir sıvı olan CCl_4 'ün güçlü bir stabilitesi vardır. Bu madde, doğal olarak bulunabildiği gibi birçok kimyasal reaksiyonun sonucu olarak da ortaya çıkabilir (Stehbens, 2003).

Eski çağlardan beri, tıbbi bitkiler olarak bilinen bazı bitkiler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geçtiğimiz yüzyılda biyoloji biliminde yaşanan gelişmelerle beraber, bitkilerde yer alan antioksidan maddeler ve bunların ayrıntılı kimyasal içerikleri de öğrenilmeye başlanınca insanlar birçok bitkiden tedavi amaçlı yararlanmaya başlamıştır. Çörek otu da bu bitkilerden biri olup yüzyıllardır tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Beheshti vd., 2015; Darakhshan vd., 2015) ve son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar dikkate alındığında özellikle akciğer üzerindeki koruyucu etkileri de dikkat çekicidir.

1.1. Akciğerin Histolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Süngerimsi yapısı ve nemli epiteli ile solunum yüzeyi olarak işlev gören memeli akciğerleri, göğüs boşluğunda yer almaktadır. Memelilerin çoğunda akciğer, gaz değişiminin olduğu çok sayıda alveolden (hava keseciği) meydana gelmiştir. Bu sayede,

solunum yüzeyi artırılır ve vücutta çok az yer kaplar. Sol ve sağ akciğer olmak üzere iki akciğer olup sağ akciğer üç bölmeli, sol akciğer ise iki bölmeli bir yapıya sahiptir. Alt kısmında hemen kalbin bulunmasından dolayı sol akciğer sağ akciğere göre daha küçüktür. Her bir akciğerdeki alveol sayısı yaklaşık 300 milyon kadardır ve her birinin çapı 0.25 mm kadardır. Bundan dolayı, akciğerlerde yaklaşık 70-100 m²'lik bir yüzey oluşur (Campbell ve Reece, 2006; Aktümsek, 2007).



Şekil 1. Akciğer (URL-1, 2015).

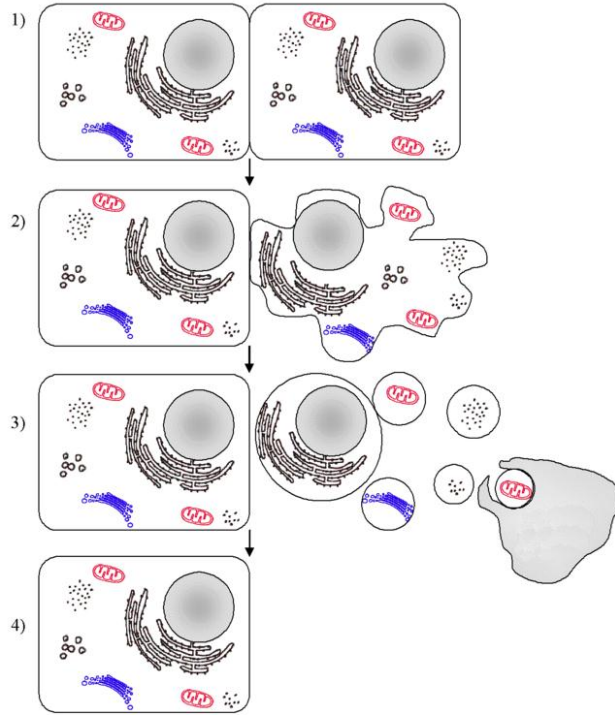
1.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)'ün Genel Özellikleri ve Etki Mekanizması

Karbon tetraklorür, vücutta ciddi düzeyde toksik etkiler oluşturabilen ve deneysel olarak hasar oluşturmada sıkça kullanılan kimyasallardan biridir (Vuda vd., 2012; Vatakuti vd., 2015). Solunum, yutma ya da dermal absorpsiyonla kolayca vücuda alınabilir ve gastrointestinal kanaldan oldukça hızlı emilebilir. İnsanlarda CCl₄'ün önemli bir kısmı yağ dokusuna yerleşir. Ardından, buradan ayrılıp akciğerlere doğru hareket eder. Metabolize olan CCl₄'ün yaklaşık % 4'ü nefesle dışarı verilir, diğer kısmı ise protein ve hücre içi moleküllerle etkileşime girer. Yapılan bazı araştırmalarda, bu maddenin fazla solunmasının kanser riskini artırdığı gösterilmiştir (Tanrıverdi, 2005; Al-Dbass vd., 2012; Aslan ve Can 2014; Can, 2014). Karbon tetraklorür, çabuk buharlaşma özelliği olan, saydam, yoğun, yanıcı olmayan bir sıvıdır. Bu maddenin güçlü bir stabilitesi vardır. Doğal olarak bulunabildiği gibi birçok kimyasal reaksiyonun sonucu olarak da ortaya çıkabilmektedir. (Stehbens, 2003). Düzgün tetraedron molekül yapısı olup merkezinde karbon atomu bulunur. Apolar yapıdadır. Suda çözünmez; ancak alkol gibi apolar çözücülerde çözünür.

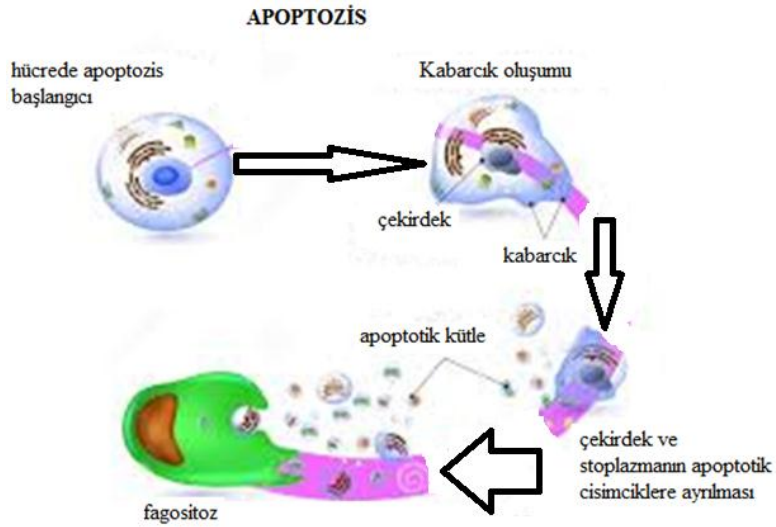
CCl_4 , katalizör varlığında karbon sülfürün kuru klor gazıyla ısıtılmasından elde edilir. Bu madde, sanayi çözücüsü ve yağ giderici başka bazı maddelerin elde edilmesinde ara madde olarak kullanılmaktadır. İyi bir kimyasal çözücüdür. Yangın söndürücülerin önemli bir bileşenidir. Ayrıca, tahılların buharlanmasında ve böcek öldürücü olarak ziraat alanında da kullanılmaktadır (Can, 2014; URL-2). CCl_4 , lipit peroksidasyonu meydana getirerek oksidatif hasarlara sebep olmaktadır. CCl_4 , oluşturduğu bu serbest radikallerle lipit peroksidasyonunu indükler ve lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde ayraç olarak kullanılan MDA seviyelerinde artışa yol açar, bunlardan başka mast hücrelerinde hasara sebep olur (Lin vd., 2008; Al-Dbass vd., 2012; Can, 2014). Lipit peroksidasyonu ardından lipit bozulmasına bağlı olarak endoplazmik retikulumun foksiyonu ve yapısı bozulmaktadır. ER şişmeye başlar ve ribozomlar GER'den ayrılmaya başlar. Lipoporoteini yapımını gerçekleştiremeyen hücrelerde lipit birikimi söz konusu olur. Mitokondriler de hasar görür ve plazma geçirgenliği artarak hücreler şişer. Sonunda da hücre ölümü gerçekleşir (Tanrıverdi, 2005).

1.3. Apoptozis

Eski Yunan dilinde sonbaharda sararmış yaprakların dökülmesi manasında kullanılan apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı, programlı hücre ölümü demektir. Bu süreç, doku homeostazının korunmasında önemli bir role sahiptir. Ayrıca fetal gelişim ve erişkin dokulardaki birçok fizyolojik olayda da rolü vardır. Embriyogenezis, menstrüasyonda endometrial hücrelerin yıkımı, timusun (tiroit bezinin altında bulunan bez) gelişimi sırasında otoreaktif (fazla duyarlı) T hücrelerinin yok edilmesi bunlardan birkaçıdır (Yüksel vd., 2009). Fizyolojik bir işlem olan apoptozis, normal gelişim esnasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribatı sırasında özel hücrelerin kaybindan sorumludur (Thompson, 1994; Hugle ve Fulda, 2015). Apoptozis oranının az olması durumunda hücre sayısı artarken, bilakis, apoptozis oranı arttığında hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı oluşmuş olur (Thompson, 1994; Altunkaynak ve Özbek, 2008; Can, 2014).



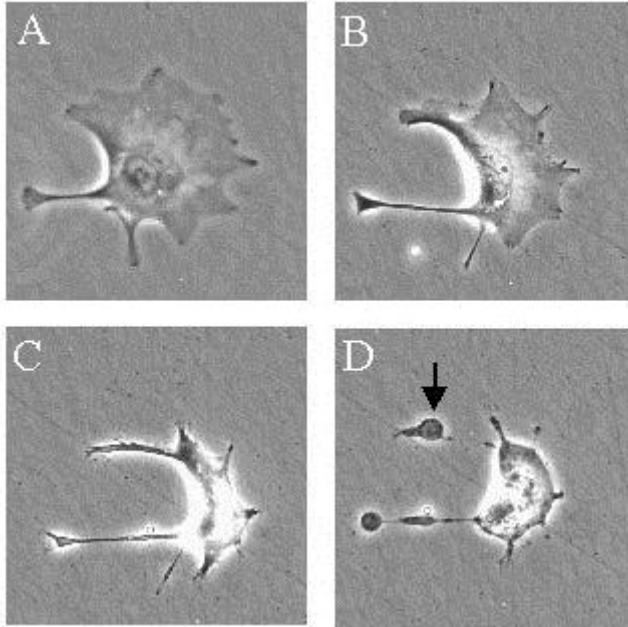
Şekil 2. Apoptozis geçiren bir hücre (URL-3, 2015)



Şekil 3. Bir hücredeki apoptozis aşamaları (URL-4, 2015).

Bir hücre, ölmek için uygun bir sinyal aldığı zaman, hücresel proteinlerin ve DNA'nın parçalanmasına ve sonuçta hücrenin ölmesine sebep olan, birbirini izleyen protein aktivasyon olayı gerçekleşir. Ölen hücrelerden gelen sinyaller, ölü hücrelerden

artakalan artıkları yutup sindirmek için komşu hücelere bilgi verir ve böylelikle embriyonun zararlı enzimlerden ve metabolitlerden arınmış olarak kalması sağlanmış olur (Campbell ve Reece, 2006). Hücre tipine göre yaşam süresi değişmektedir. Ancak travma ve kaza neticesinde meydana gelen nekrozis haricinde oluşan tüm hücre ölümleri apoptozis ile gerçekleşmektedir. Programlanmış hücre ölümü, dengelenmiş hücre çoğalması ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin, insanlarda 5×10^{11} civarında kan hücresi her gün programlanmış hücre ölümü vasıtasıyla kandan elimine edilmektedir. Apoptozis, özellikle doku homeostasisi ve istenmeyen etkilere karşı doku bütünlüğünün gerçekleştirilmesinde önemlidir (Lüleyap, 2008; Aslan, 2011; Hugle ve Fulda, 2015).



Şekil 4. Apoptozise uğrayan bir hücrenin ölüm aşamaları (URL-5, 2015).

1.3.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt)

Programlı hücre ölümü olarak bilinen ve fizyolojik bir işlem olan apoptozis, doku homeostasisinin korunmasında önemli bir role sahiptir. Apoptozis, normal gelişim sırasında ve olgun organizmada bazı hücre çeşitlerinin tahribatı esnasında özel hücrelerin kaybından sorumludur. Apoptozis oranı az olduğunda hücre sayısı artarken, apoptozis oranı arttığında ise hücre sayısı azalır ve istenmeyen bir doku tahribatı söz konusu olur. Meydana gelen apoptozis oranı ise çeşitli yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir (Thompson, 1994;

Altunkaynak ve Özbek, 2008; Hugle ve Fulda, 2015). Organizmada DNA hasarı meydana geldiği zaman, hasarın söz konusu olduğu hücre, apoptozise yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır. Böylelikle, DNA'larında zararlı mutasyonlara sahip olan hücrelerin kanserleşme ihtimali ortadan kalkmış olur (Tuzcu vd., 2012). Mekanizması son yıllarda yeni metotlarla daha da aydınlatılan apoptozis ve apoptozis genetiği ile ilgili birçok güncel çalışma yapılmaktadır. Bunun sebepleri arasında, birçok toksik ilacın hücre ölümünü bu şekilde gerçekleştirmesi ve bu esnada onkoproteinler ve tümör supresör genlerinin beraber çalışması sayılabilir. Apoptozis mekanizmasında kaspaz-3, kaspaz-9, erk ve akt proteinleri önemli bir yere sahiptir (Korsmeyer, 1999; Aslan ve Can, 2014; Hugle ve Fulda, 2015; Kim vd., 2015). Moleküler biyolojide, hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar (Erk'lar) ya da klasik Map kinazlar (mitojen protein kinaz), farklılaşmış hücrelerde mayoz, mitoz ve mitoz sonrası fonksiyonların düzenlenmesini kapsayan fonksiyonlarla ilgisi olan, büyük ölçüde hücre içi sinyal protein kinazları olan molekülüdür. Büyüme faktörleri, sitokinler, virüs enfeksiyonu, çift reseptörlü heterotrimerik G proteini, dönüştürücü ajanlar ve karsinojenleri (kanseri yapıcılar) içeren birçok farklı uyarıcı Erk yolunu aktive eder (Nishioka vd., 2006; Geng vd., 2015; Comer vd., 2015).

“Hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar” terimi bazen aktif mitojen protein kinaz (Mapk) ile eş anlamlı kullanılır; ancak son zamanlarda daha çok memeli Mapk ailesinin özel bir alt kümesi için benimsenmiştir. Mapk/Erk yolunda, aktif mitojen protein kinaz (Mkk, Mek ya da Map2k) tarafından takip edilen Ras, c-Raf'ı aktive eder ve daha sonra Mapk1/2'yı aktif yapar. Erk aktivitesi, poli (ADP-riboz) ve polimeraz (PARP) ayrılması, DNA kondensasyonu veya fragmentasyonu gibi bazı apoptotik olaylarla ilişkilidir (Cagnol ve Chambard, 2009). Ras, tirozin kinazların reseptörü ve Grb2/Sos yoluyla büyüme hormonları tarafından sıklıkla aktive edilir; ayrıca diğer sinyalleri de alabilir. Erk'ların Erk1 ve bazı akış yönündeki protein kinazlar gibi birçok transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği bilinmektedir. Erk yolunun bozulması, özellikle Ras, c-Raf ve Her2 gibi reseptörlerin kanserlerinde yaygındır (Lu ve Xu, 2006; Seomun ve Joo, 2008; Comer vd., 2015). Aynı zamanda Protein Kinaz B (Pkb) olarak bilinen Akt, glukoz metabolizması, apoptozis, hücre çoğalması, transkripsiyon ve hücre göçü gibi çoklu hücresel süreçlerde anahtar rol oynamaktadır (Schmitz vd., 2008; Comer vd., 2015; Kim vd., 2015). Akt1, apoptotik süreçlerle inhibe edilmekle hücre hayatta kalmayı kapsar. Akt1, aynı zamanda protein sentez yolunu indükleyebilir ve böylece çizgili kas hipertrofisine (aşırı büyümesi) ve genel kas gelişmesine yol açan hücresel yolda anahtar bir sinyal proteindir. Akt1'in tam

delesyonuyla modellenen farelerde büyüme gecikmesi ortaya çıkmış ve testisler ve timus gibi dokularda doğal apoptozis artmıştır. Apoptozisi engelleyebildiği ve böylece hücre hayatta kalımını desteklediği için Akt1 birçok kanser çeşidinde büyük bir faktör olarak tanımlanmıştır. Akt1 orijinal olarak retrovirüs Akt8'e dönüştürücüde onkogen olarak belirlenmiştir (Schmitz vd., 2008; İnci vd., 2009; Gözüaçık vd., 2011; Geng vd., 2015; Ma vd., 2015). Akt2, insülin sinyal yolunda önemli bir proteindir. Glukoz taşınmasını indüklemeye gereklidir. Akt1 yönünden eksik ancak Akt2 yönünden normal bir farede glukoz homeostasisi normaldir; fakat gelişmede Akt1'in olağan rolüyle incelenen hayvanların daha küçük olduğu görülmüştür. Tersine, Akt2'si olmayan ancak Akt1'i normal olan bir fare, hafif gelişme eksikliğine sahiptir ve diyabetik bir fenotip (insülin direnci) sergiler. Akt3'ün rolü, beyinde çoğunlukla ifade edilmesi bilinmesine rağmen, daha az belirgindir. Akt3 eksikliği olan farelerde daha küçük beyin olduğu rapor edilmiştir (Schmitz vd., 2008; Seomun ve Joo, 2008).

Kaspazlar, normal şartlarda sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunmaktadır. Ancak proteolitik parçalanmanın ardından aktif hale gelirler ve kaspaz aktivasyonu başlar. İlk etapta kaspazlar mitokondride membran hasarı oluştururlar ve buna bağlı olarak zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine sebep olan hasarlar meydana gelir. Aynı zamanda sitokrom C'nin prokaspaz zimojenlerini de aktif hale getirmektedir (Altunkaynak ve Özbek, 2008; Feng vd., 2011; Aslan ve Can, 2014; Accorsi vd., 2015). Hücrede sitozolde lokalize olan kaspazlar, başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak ikiye ayrılırlar ve sistein proteazlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Apoptoziste, özellikle aspartat kalıntılarından olan peptitleri yıkıma uğratmaktadırlar ve temel fonksiyonları ise DNA polimeraz enzim aktivitesini engelleyerek hücrenin apoptozise uğrayıp yok olmasını sağlamaktır (Aslan, 2011). Mitokondri, normal koşullarda ATP oluşturmak için sitokrom c ihtiva eder. Mitokondrial stres şartlarında serbest duruma gelen sitokrom c, apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli bir rol üstlenmektedir. Bu yolda, kontrolü mitokondri tarafından yapılan apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır. Kofaktör nükleotit trifosfat ile aktive edilen sitokrom c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktifleştirir. Aktif hale gelen kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Yılmaz, 2005; Kuwahata vd., 2012).

1.4. Çörek otu ve Antioksidan Özellikleri

Yüzyıllardan beri birçok hastalığın tedavisinde bazı bitkilerden yararlanılmaktadır. Biyoloji biliminde yaşanan gelişmelere paralel olarak birçok bitkinin kimyasal içeriği ve koruyucu etkileri aydınlatılmış ve tıbbi bitkiler adı altında birçok bitki sınıflandırılarak tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Çörek otu da bu bitkilerden biridir ve çok eski zamanlardan beri iyileştirici özelliklerinden yararlanılmaya devam etmektedir. Hücre ve doku hasarlarını önlemedeki fonksiyonlarından dolayı, antioksidan özelliğe sahip bitkilerle son yıllarda birçok çalışma yapılmaktadır. Çörek otu bitki ekstraktı da bronkodilatör, antitümör gibi tedavi edici özelliklere sahiptir ve serbest radikal tutucu fonksiyonuyla güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (Harzallah, 2011). Ahmad vd., trake ve solunum yolundaki iyileştirici özelliklerinden dolayı *Nigella sativa*'yı solunumu kolaylaştırıcı akciğer koruyucu mucizevi bir bitki olarak tanımlamışlardır (Ahmad vd., 2013). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar dikkate alındığında, çörek otunun özellikle akciğer üzerindeki koruyucu etkilerinin dikkate değer olduğu düşünülmektedir. Ranunculaceae (dügünçeğigiller) familyasının *Nigella sativa* türüne ait bitkilerin kapsül içinde oluşan tohumu olan çörek otu, dünyanın birçok bölgesinde yaklaşık 2000 yıldan beri tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, çörek otu ekstraktının antibakteriyel, antidiyabetik, bronkodilatör, antitümoral, antiastmatik gibi birçok iyileştirici etkisinin olduğunu göstermiştir (Aqel ve Shaheen, 1996; Şahin vd., 2003; Heshmati vd., 2015; Beheshti vd., 2015; Darakhshan vd., 2015). Çörek otu etken maddesi timokinon, tohumun uçucu yağında bulunmaktadır. Çörek otu tohumlarının içeriğinde % 0,38 ile % 0,49 uçucu yağ bulunmaktadır (Türker ve Bayrak, 1997; Harzallah, 2011). Aynı zamanda, çörek otunun etken maddesi olan timokinonun izole edilmiş rat hepatositlerinde oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir İnsan vücudunda birçok hayati fonksiyonu bulunan akciğerde meydana gelebilecek hasarların, insan hayatını ne kadar olumsuz etkileyebileceği göz önüne alındığında, çörek otu gibi akciğer koruyucu bir bitkinin ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır (Daba ve Rahman, 1998; Heshmati vd., 2015; Beheshti vd., 2015; Darakhshan vd., 2015).



Şekil 5. Çörek otu tohumu (URL-6, 2015).



Şekil 6. Çörek otu tohumu tanesi (URL-7, 2015).



Şekil 7. Çörek otu bitkisi (URL-8, 2015).



Şekil 8. Çörek otu bitkisi (URL-9, 2015).

1.5. Lipit Peroksidasyonu

Hücrede serbest radikal hasarı için önemli bölge olan hücre membranında kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca etkileşerek peroksidasyon ürünlerini açığa çıkarmaktadır. Lipit peroksidasyonu, membranlarda yer alan PUFA (poliansatüre yağ asitleri)'nın, serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, peroksitler, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığı zaman birçoğu biyolojik açıdan aktif aldehit meydana gelmektedir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da ilk baştaki etki alanlarından diffüze olarak hücrenin diğer kısımlarına zararı yayarak doku hasarına ve birçok hastalığa sebep olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun en önemli ve son ürünü MDA (malondialdehit)'dir. Oluşan MDA, hücre zarlarından iyon alışverişine etki göstererek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olur, böylece iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz neticelere yol açar (Benzer ve Ozan, 2003; Lin vd., 2008; Al-Dbass vd., 2012; Can, 2014).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çörek Otu

Hayvansal dokulardan DNA izolasyon kiti Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit, Cat. No. 51304, ABD)'den temin edilmiştir. Western blot aşamasında kullanılan primer antikorlar BioVision (ABD)'den; sekonder antikor ise Santa Cruz Biotechnology (ABD)'den temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (Almanya), Bio-Rad (ABD), BioShop (Kanada) ve Merck (ABD)'ten sağlanmıştır. Ratların günlük içme sularına kaynatarak katmak suretiyle, toz halindeki çörek otu tohumları Öz Gıda Organik ve Yöresel Ürünler Ltd. Şti. (Elazığ)'den temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Araştırmamızın hayvan deneyleri bölümünün tamamı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 27.11.2013 toplantı tarihi, 2013/11 toplantı sayısı ve 129 karar nolu izni ile F.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yürütülmüştür. Araştırmada 28 adet erkek Wistar albino (n=28, 8 haftalık) rat kullanılmıştır ve ratlar, günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyoduna tabi tutulmuştur. Ratlar canlı ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar: (i) Negatif Kontrol: Normal su tüketen, CCl₄ ve çörek otu verilmeyen grup; (ii) Pozitif Kontrol: Normal su tüketen, CCl₄ verilmeyen fakat çörek otu verilen grup; (iii) CCl₄ Grubu: Normal su tüketen ve CCl₄ verilen grup (1,5 ml/kg CA, ip); CCl₄ + çörek otu Grubu: CCl₄ ve çörek otu verilen grup (1,5 ml/kg CA, ip). Çörek otu kaynağı olarak kaynatılmış çörek otu tohumlarının ekstresi hayvanların içme suyuna katılmıştır (% 10w/v). Canlı ağırlıklar çalışma boyunca haftada 3 kez olmak üzere kaydedilmiştir.

Tablo 1. Araştırma Grupları (n=7)

Gruplar	Uygulama	Deneme Süresi
Negatif Kontrol	Normal su tüketen, CCl ₄ ve çörek otu verilmeyen grup	4 hafta
Pozitif Kontrol	CCl ₄ verilmeyen fakat çörek otu (% 10) verilen grup	4 hafta
CCl ₄ Grubu	Normal su tüketen ve CCl ₄ (1,5 ml/kg CA) verilen grup	4 hafta
CCl ₄ ve çörek otu verilen grup	CCl ₄ (1,5 ml/kg CA) ve çörek otu (% 10) verilen grup	4 hafta

Ratların normal su tükettiği bir haftalık alışma döneminden sonra, önceden belirtildiği gibi ağırlık ortalamaları eşit olacak şekilde seçilip gruplara ayrılmıştır. Yem ve su, çalışma süresince *ad libitum* olarak verilmiştir. Çalışma süresince 2 günlük su tüketimi belirlenmiştir. Çalışma bitiminde ratlar dekapite edilerek akciğer dokuları ve kan serumları alınmış ve analizler yapılincaya kadar -80⁰C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. CCl₄ Uygulaması

CCl₄ uygulaması, bir ay boyunca haftada iki defa olmak üzere 1,5ml/kg canlı ağırlığında intraperitoneal olarak, 1:3 oranında zeytinyağı ile birlikte enjekte edilerek uygulama yapılmıştır (Bahçecioğlu vd., 2008; Shaker vd., 2010).

2.2.3. Çörek Otu Ekstraktının Hazırlanması

Toz haline getirilen çörek otu tohumlarının su içerisinde kaynatılmasıyla oluşturulan ekstrakt, ratların günlük içme sularına % 10 oranında ilave edilmiştir. Ratların su tüketimleri düzenli periyotlarla takip edilip kaydedilmiştir.

2.2.4. Akciğer Doku MDA Ölçümleri

Akciğer doku örnekleri küçük parçalara bölünerek 0,5 gram doku başına 4,5 ml % 1,15'lik KCl olacak şekilde mekanik homojenizatörde parçalandı. Hazırlanan bu homojenattan MDA tayini Ohkawa vd.'ne göre değiştirilerek yapılmıştır. Bu yöntem, lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ve TBA (tiyobarbütirik asit)'nin reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Ölçüm prosedüründe 0,1 ml doku homojenatına 0,1 ml % 8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20'lik (pH:3,5) asetik asit solüsyonundan eklendi. Ardından 750 µl % 0,8'lik (pH: 3,5) TBA solüsyonundan eklenerek son hacmi 4 ml olacak şekilde saf su eklendi. Daha sonra 95 °C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 45 dakika bekletilip soğutularak 1 ml saf su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin karışımından eklenerek vortekslendi. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki organik tabaka alınarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/g olarak kaydedildi (Ohkawa, 1979; Benzer ve Ozan, 2003; Üstündağ vd., 2005).

2.2.5. Plazma MDA Ölçümleri

Plazma örneklerinin MDA tayini Ohkawa vd. (1979)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Her bir gruptan 200 µl örnek alınarak % 8,1 SDS'ten 200 µl ilave edildi. % 20'lik asetik asit'ten (pH: 3,5) 1,5 ml ve % 0,8 'lik (pH: 3,5) TBA'dan 1,5 ml eklenerek son hacim 4 ml olacak şekilde distile su eklendi. Ardından 95 °C sıcaklıkta kaynar su banyosunda 1 saat bekletildi ve daha sonra soğutularak 1 ml distile su ve 15:1 (v/v) oranında 5 ml n-butanol-piridin karışımından eklenip vortekslendi. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik tabaka alınıp 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar nmol/ml olarak kaydedildi.

2.2.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi

Günlük standart MDA stoklarından (1,1,3,3 tetramethoksiopropan) 10 µl alınıp 100 ml saf suya tamamlandı. Eğri çizimi için günlük standarttan saf suyla 40, 20, 10, 8, 5, 4 oranında seyreltme yapılarak 15, 30, 60, 75, 121, 151 n/mol derişiminde çalışma standartları hazırlandı (Antmen, 2005). Bunun ardından, daha önce bahsedilen MDA

prosedürüne göre diğer işlemler yapılarak sonuçlar doku için nmol/g; plazma için nmol/ml olarak kaydedildi ve standart eğri grafiği çizildi.

2.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Hasarının Analizi

Apoptozis esnasında DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar meydana getiren endonükleaz enzimi, apoptozisin önemli bir işareti olan merdiven görüntüsünü oluşturmaktadır ve bu oluşum DNA agaroz jel elektroforezinde (Thermo EC, mini cell, EC 320) tespit edilebilmektedir. Dokularda Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır ve ardından DNA, Tris-EDTA solüsyonunda çözülerek DNA agaroz jel elektroforezinde % 1'lik jelde analiz edilmiştir (Wang vd., 2003; Aslan, 2011). Sonrasında DNA bantlarının görüntüsü alınarak gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilmiştir.

2.2.7.1. Akciğer Dokusundan DNA İzolasyonu

Dokularda Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu şu şekilde yapılmıştır (Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, Cat. No. 51304):

- 1- 25 mg doku alınır, küçük parçalara ayrılır. 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınır. 180 µl ATL Buffer'ı eklenir.
- 2- 20 µl Proteinaz-K ilave edilir, vortekslenir. 56⁰C'de doku eriyinceye kadar (1-3h) inkübe edilir (ara sıra vortekslenir).
- 3- 200 µl AL Buffer'ı ilave edilir. 15 saniye darbeli vorteksleme yapılır. Ardından 70⁰C'de 10 dakika inkübe edilir. (Doku kaybını önlemek için gerekirse kısa süreli santrifüj yapılır.)
- 4- 200 µl etanol ilave edilip 15 saniye vortekslenir.
- 5- Karışım Spin Kolona aktarılır ve kapağı kapatılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Spin Kolon çıkarılır. Temiz bir Collection tüpe bırakılır, diğeri atılır.
- 6- 500 µl AW1 Buffer'ı Spin Kolona ilave edilir, kapak kapatılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Spin Kolon alınır, Collection tüp atılır, temiz bir Collection tüpe bırakılır.

- 7- Spin Kolona 500 µl AW2 Buffer'ı eklenir ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- 8- Spin Kolon 1,5 ml eppendorf tüpe bırakılır. Spin Kolon içerisine 200 µl AE Buffer'ı veya distile su bırakılır. Oda sıcaklığında 1 dakika beklenir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9- 8. basamak tekrarlanır.

2.2.8. Western Blotlama Çalışması İçin Doku Homojenizasyonu

Akciğer doku örnekleri, küçük parçalara bölünerek mekanik homojenizatörde lizis tamponu (0,5 M Tris [pH: 8], EDTA, β-Merkaptoetanol, Fenil metil sülfonil florid [PMSF]) içerisinde parçalandı. Parçalanmış doku örnekleri 15000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alındı ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi (Aslan ve Can 2014).

2.2.9. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

Bu çalışmada primer antikorlar 1/200; sekonder antikor ise 1/2000 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Lowry kiti ile protein yoğunlukları ölçülmüş, ardından her kuyuya 30 µg protein yüklenmiştir. SDS-PAGE tekniğiyle, dokulara ait protein örnekleri %12'lik jelde yürütülmüştür. Daha sonra bu proteinler (kaspaz-3, kaspaz-9, erk, akt), western blotlama tekniği ile nitroselüloz membrana aktararak sentez oranlarına bakılmış (Laemmli, 1970) ve ardından protein düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçülmüştür (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

2.2.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel şu şekilde hazırlanmıştır (Laemmli, 1970).

Ayırma Jeli (Separating)’nin Hazırlanışı (% 12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris HCl (pH: 8.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme Jeli (Stacking)’nin Hazırlanışı (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Hazırlanmış örneklerin kuyulara yüklenmesinden önce, eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası eklenerek 5 dakika kaynatılır. Elektroforez için 1 x tank tamponu kullanılır ve proteinlerin jeldeki hareketini izlemek için kullanılan boya olan bromofenol mavisine ait mavi bant, jelin sonuna gelinceye dek 20 mA akım uygulanır. Elektroforezin ardından jel, oda sıcaklığında yarım saat süreyle Coomassie mavisini ile boyandıktan sonra jeldeki protein bantları görünür hâl alıncaya kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Fotoğrafları alınan jeller, jel kurutma sistemi ile kurutulularak saklanır (Laemmli, 1970).

2.2.9.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**SDS-PAGE için 5x Tank (Yürütme) Tamponu (5x Running Buffer)**

0,025 M Trizma Base	15 g/ml
0,192 M Glisin	72 g/ml
%0.1 SDS	5 g/l

dH₂O ile 1x Running buffer’a seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

SDS-PAGE İçin Örnek Uygulama Tamponu (SAB: Sample Amplification Buffer)

% 10 SDS	1 g/10 ml
----------	-----------

0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	5 ml/10 ml
% 10 Gliserol	1 ml/10 ml
% 25 2-Merkaptoetanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromofenol Mavisi	0,005 g/10 ml
DTT	0,2 g/10 ml
dH ₂ O ile 10 ml'ye tamamlandı.	

SDS-PAGE Sonrası Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Commassie Brilliant Mavisi	0,1 g/100 ml
% 40 Metanol	40 ml/100 ml
%10 Glasiyal Asetik Asit	10 ml/100 ml
dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı.	

SDS-PAGE Sonrası Boya Giderici (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol	5 ml/100 ml
% 7 Asetik Asit	7 ml/100 ml
dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı.	

Western Blot Transfer Tamponu 5X

Glisin	4,3 g/300 ml
Trizma Base	5,81 g/300 ml
Metanol	75 ml/300 ml
dH ₂ O ile 300 ml'ye tamamlandı.	

PBS (Phosphate Buffered Saline) 9X

1,45 M NaCl	84,74 g/l
0,075 M Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	26,8 g/l
0,025 M NaH ₂ PO ₄ .12 H ₂ O	3,9 g/l

PBS Tween-20

PBS	1000 ml
Tween-20	2 ml

Süt Tozu

Bloklama solüsyonu olarak % 5'lik süt tozu kullanıldı.

Western Blotlama Sonrasında Nitroselüloz Membranda Protein Görüntüleme Solüsyonu

1 M Tris (pH: 6,8)	1,33 ml/40 ml
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) tablet	4 tablet
% 30 H ₂ O ₂	40 µl/40ml
dH ₂ O ile 40 ml'ye tamamlandı.	

Western blotlama, BIO-RAD Mini-PROTEAN®3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jelde ayrılması sağlanır. Jel büyüklüğünde olacak şekilde NitroBind transfer membranı kesilir. Filtre kağıtlarıyla beraber transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforezin ardından jel de transfer tamponu içerisinde bekletilir, sonrasında western blota özgü kasetin kapağı açılarak alt tarafına filtre kağıdı ve onun üzerine de jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilerek kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tanka buz ünitesi de yerleştirilir ve ardından transfer tamponu doldurularak güç kaynağına bağlanır ve 250 mA'da 90 dakika akım verilir. Isının düzenli dağılması amacıyla, blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapılır. Blotlama sonrasında membran, PBS Tween-20'de (PBS yıkama solüsyonu) 15 dakika yıkanır. 4°C'de bir gece süt tozu içerisinde bloklama işlemi yapılır. Bloklamadan sonra 90 dakika oda ısısında bekletilir. Daha sonra 1/150-1000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. Yine 90 dakika oda ısısında bekletilir. 15 dakika PBS çalışma solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilir. 1/1000-2000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. 90 dakika oda ısısında bekletilir. Yine aynı şekilde PBS çalışma solüsyonu ile 15 dakika yıkanır. Yıkama işleminin ardından son hacim 40 ml saf suyla tamamlanacak şekilde 4 tablet (20 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Amresco), 1,33 ml 1M Tris (pH: 6,8), %30'luk 40 µl H₂O₂ içerisinde bantlar belirgin hale gelinceye kadar bekletilir. Ardından dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur. Bu metotta Aslan ve Can (2014)'ın çalışması esas alınarak bazı değişiklikler yapılmıştır.

2.2.10. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt Proteinlerinin Analizi

Apoptozisin önemli belirteci olan bu proteinlerin dokulardaki sentez oranları oldukça önemlidir. Bu çalışmada kaspaz-3, kaspaz-9, erk, akt apoptotik proteinlerinin hasarlı ve normal dokulardaki ekspresyon seviyeleri özel antikolar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlenmiştir.

2.2.11. TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi

Dondurulmuş halde bulunan kesitler, parafin bloklar, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerdeki apoptozis bu yöntemle belirlenebilir (Yılmaz, 2005; Qiu vd., 2007). Çalışmamızda, akciğer dokusunda DNA'da meydana gelen hasar TUNEL metoduyla tespit edilmiştir. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme olarak bilinen TUNEL metodu, hücrelerde meydana gelen apoptozis oranlarını belirlemede standart yöntemlerden biridir (Taş vd., 2012). Parafin bloklar, dondurulmuş halde bulunan kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da “plate”lere ekilmiş veya lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerdeki apoptozis bu yöntemle belirlenebilir (Yılmaz, 2005; Qiu vd., 2007). TUNEL metodu sırasında şu işlemler yapılmıştır: Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 2). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde metil green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı. Skala bar: 50µm.

Tablo 2. TUNEL Boyama Prosedürü

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksidaz blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Metil green	1-5dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.2.12. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm veriler SPSS 20 paket programında varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Gruplar içi farklılıkları belirlemek için One-Way ANOVA Post Hoc Tukey testi uygulanmıştır. Yapılan istatistiklerin güvenilirliği açısından, ölçümler en az 3 tekrar olacak şekilde yapılarak, SPSS 20 paket programında sonuçlar kaydedilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık Değişimi ve Su Tüketimi

Tablo 3. Gruplarda başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları ve günlük su tüketimi

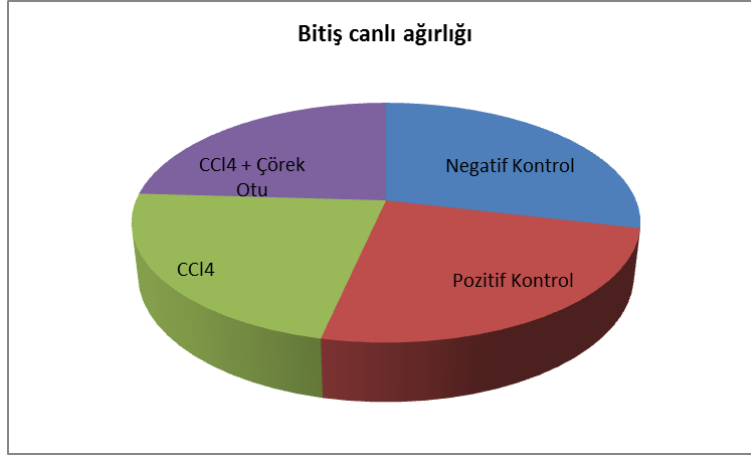
Gruplar	Başlangıç ağırlığı, g	canlı Bitiş canlı ağırlığı, g	Günlük su tüketimi, ml
Negatif Kontrol	252,85 ± 25,05	358,42 ± 32,39 ^a	317,33 ± 1,52 ^a
Pozitif Kontrol	247,85 ± 23,91	309,00 ± 20,93 ^b	260,35 ± 1,50 ^b
CCL ₄	237,28 ± 19,33	281,28 ± 15,68 ^c	180,30 ± 1,52 ^c
CCL ₄ + Çörek Otu	243,85 ± 18,34	300,57 ± 18,96 ^d	213,33 ± 1,54 ^d

a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.05)

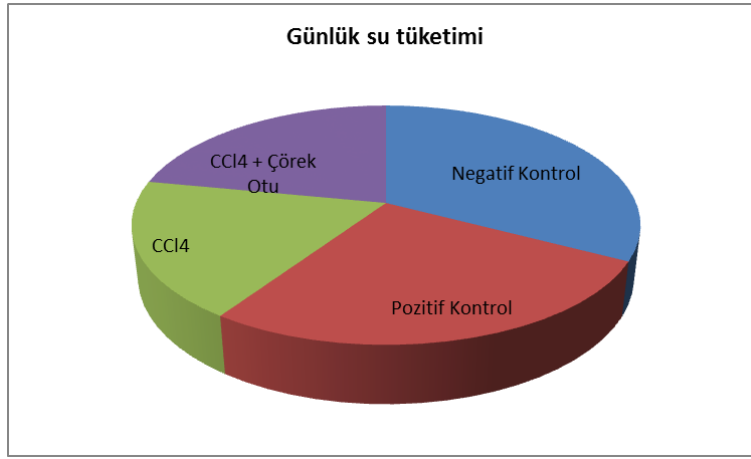
One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi



Şekil 9. Çalışmada kullanılan deney hayvanları.



Şekil 10. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları.

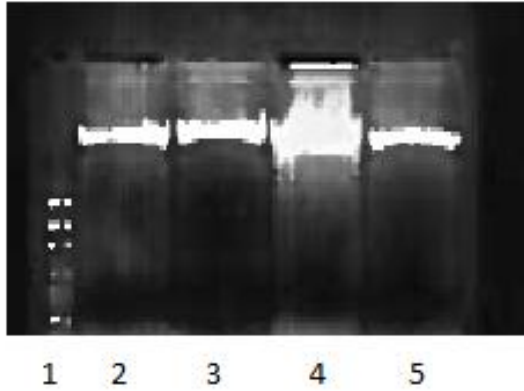


Şekil 11. Gruplara göre günlük su tüketim oranları.

Tablo 3 (şekil 11)'deki istatistiksel veriler incelendiğinde, su tüketimi açısından gruplar arasında önemli bir fark olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Kontrol gruplarına göre CCl₄ verilen gruplarda su tüketimi daha azdır, bu da CCl₄ ile zamanla oluşan hasarın su tüketimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Çalışmanın başlangıcı ve sonundaki canlı ağırlıkları karşılaştırıldığında ise (tablo 3, şekil 10) başlangıç canlı ağırlıklarında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ($p > 0.05$); bitiş canlı ağırlıklarında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğu ($p < 0.05$) ve en düşük canlı ağırlık oranının CCl₄ grubunda olduğu görülmektedir.

3.2. DNA Hasarının Analizi



Şekil 12. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü

Hatlar: Soldan sağa: (1) Marker; (2) NK; (3) PK; (4) CCl₄; (5) CCl₄ + ÇO

Şekil 12'deki DNA agaroz jel görüntüsü incelendiğinde, diğer gruplara oranla karbon tetraklorür grubunda daha fazla kırılma meydana geldiği görülmektedir. CCl₄ + ÇO grubunda ise bu kırılmaların daha az olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, ÇO verilen grupta DNA hasar oranının, ÇO verilmeyen CCl₄ grubuna göre daha az olduğu yorumu yapılabilir. Buradan yola çıkarak, akciğer hasarı bakımından düşünüldüğünde, çörek otunun antioksidan etkisi DNA hasarını azaltıyor, denilebilir.

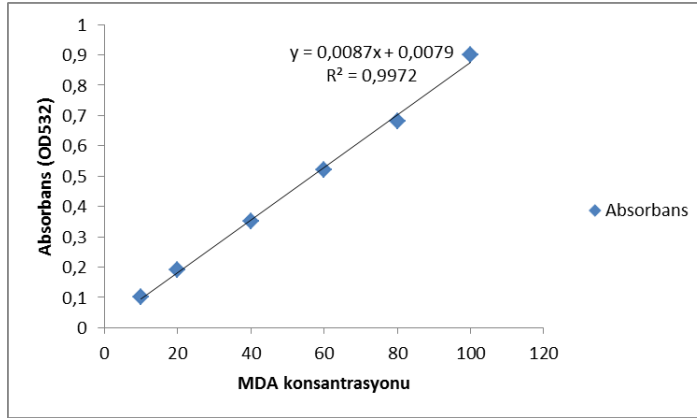
3.3. MDA Ölçüm Sonuçları

Tablo 4. Çalışma gruplarından elde edilen akciğer doku MDA düzeyleri

Gruplar	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	CCl ₄	CCl ₄ + Çörek Otu
Akciğer Doku				
MDA (nmol/g)	3,57 ± 0,49 ^a	3,68 ± 0,58 ^a	12,53 ± 1,58 ^b	4,03 ± 1,53 ^a

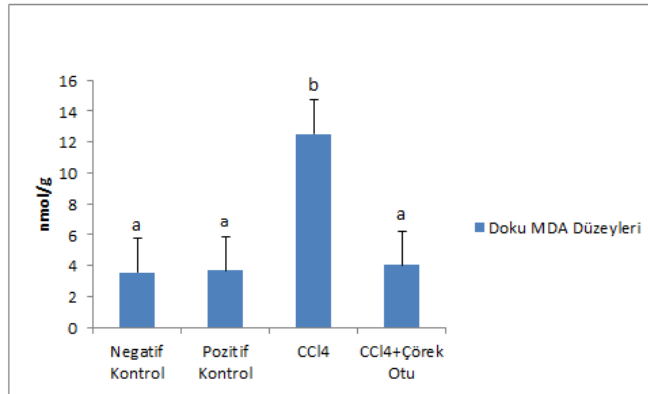
a-b: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.05)

One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi.



Şekil 13. MDA standart eğrisi

Tablo 4 (şekil 14)'te akciğer dokusundaki MDA seviyeleri incelendiğinde, kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark olmadığı ($p > 0.05$), en yüksek düzeyde MDA seviyesinin CCl_4 grubunda olduğu ve diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. $\text{CCl}_4 + \text{ÇO}$ grubunda MDA seviyesinin CCl_4 grubuna göre ciddi düzeyde düştüğü görülmektedir ($P < 0.05$).

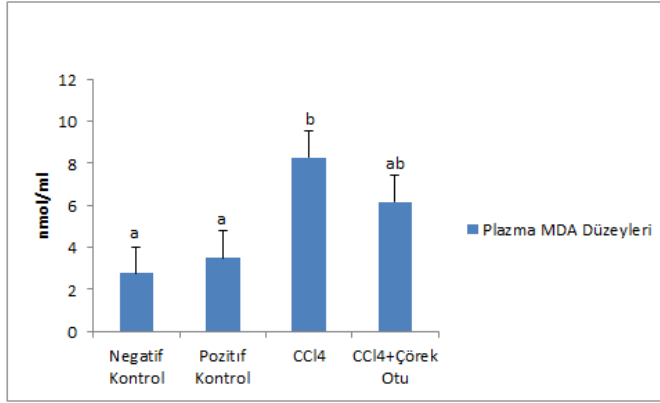


Şekil 14. Akciğer dokusunda gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 5. Çalışma gruplarında elde edilen plazma MDA düzeyleri

Gruplar	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	CCl_4	$\text{CCl}_4 + \text{Çörek Otu}$
Plazma MDA (nmol/g)	$3,11 \pm 1,50^a$	$3,80 \pm 1,51^a$	$8,66 \pm 1,58^b$	$6,33 \pm 1,54^{ab}$

Tablo 5 (şekil 15)'te plazma MDA seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ($p>0.05$); CCl_4 + ÇO grubunda ise CCl_4 grubuna göre MDA seviyesinde azalış olduğu görülmektedir ($p<0.05$). En yüksek plazma MDA seviyesi ise CCl_4 verilen grupta meydana gelmiştir ve diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak bir fark oluşmuştur ($p<0.05$).

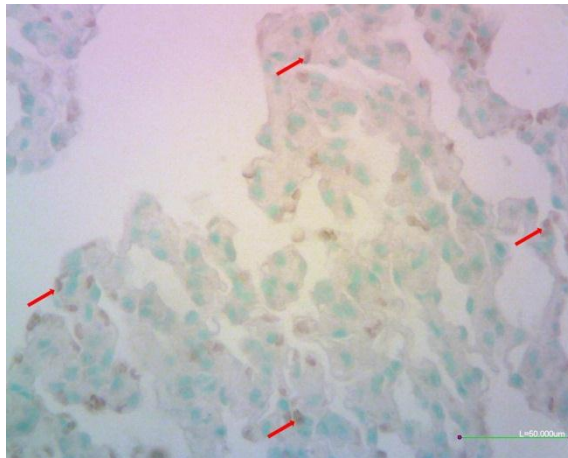


Şekil 15. Plazmada gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması

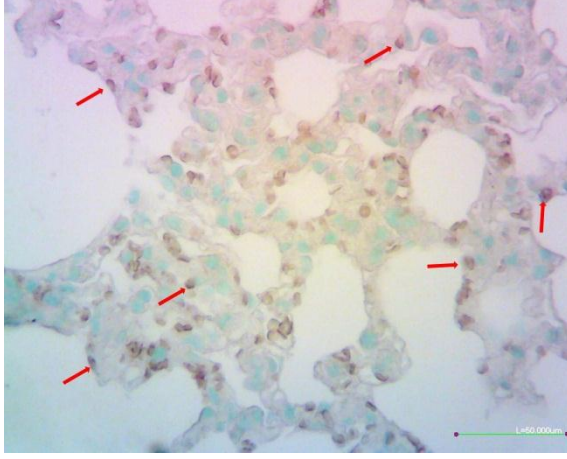
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır ($p<0.05$). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

3.4. TUNEL Metoduyla Belirlenen Histolojik Sonuçlar

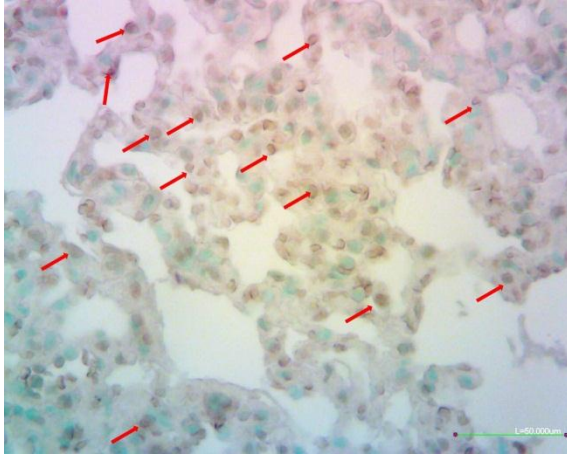
Çalışmanın son aşamasında TUNEL metodu kullanılarak apoptozis düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen görüntülerle, akciğer dokusunda DNA'da meydana gelen hasar tespit edilmiştir.



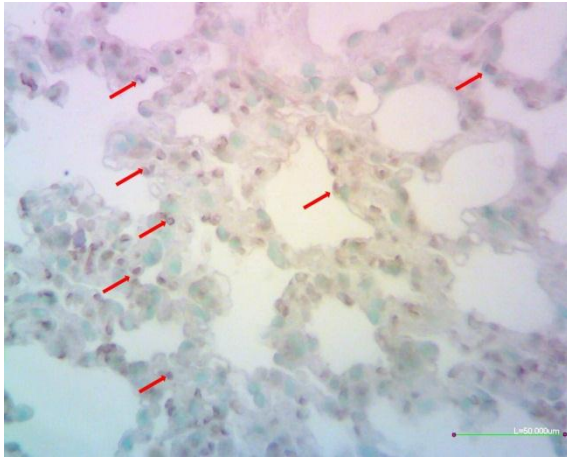
Şekil 16. Negatif Kontrol grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 17. Pozitif Kontrol grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→). Skala bar: 50µm.



Şekil 18. CCl₄ grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).
Skala bar: 50µm.



Şekil 19. CCl₄ + ÇO grubuna ait akciğer dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).
Skala bar: 50µm.

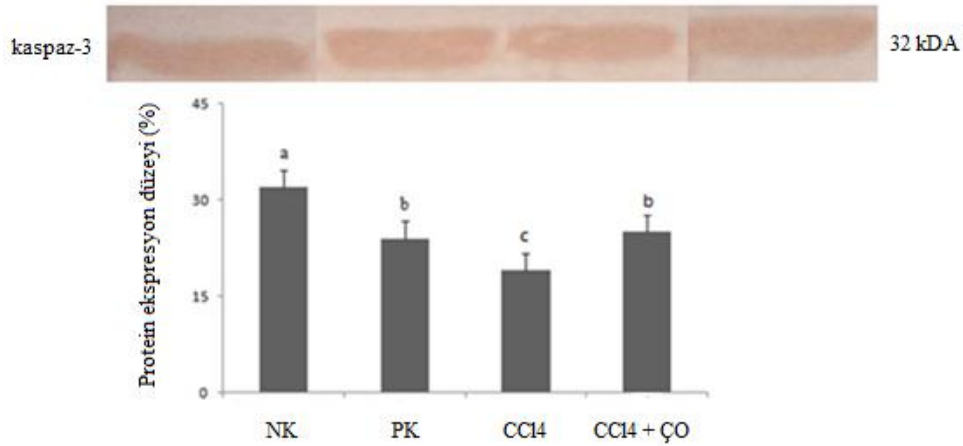
Tablo 6. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks (%)

Gruplar	Apoptotik indeks %
Negatif Kontrol	8 ±00 ^c
Pozitif Kontrol	14 ±00 ^b
CCl ₄	27 ±00 ^a
CCl ₄ +ÇO	15 ±00 ^b

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlıdır (p<0.05). One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği akciğerde NK (şekil 16) grubu ile karşılaştırıldığında, CCl₄ (şekil 18) grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0.05). Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken (p>0.05), sadece çörek otu verilen PK grubu (şekil 17) ile CCl₄ grubu kıyaslandığında yine anlamlı bir farklılık olduğu görüldü. CCl₄+ÇO (şekil 19) grubunda ise apoptotik indeksin, CCl₄ grubuna göre azalış göstererek normale yaklaştığı görülmektedir.

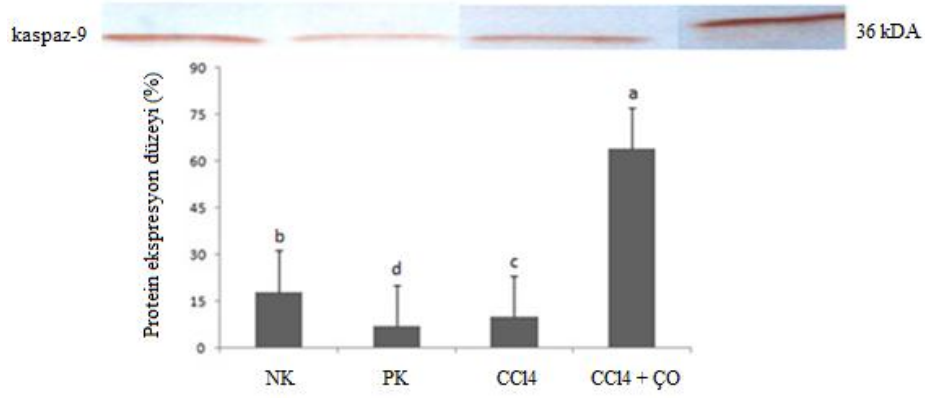
3.5. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Erk, Akt Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)



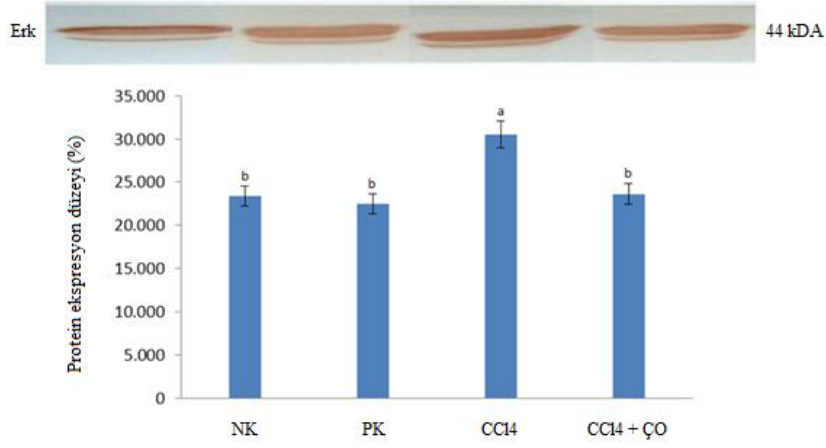
Şekil 20. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri

a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir (p<0.05)

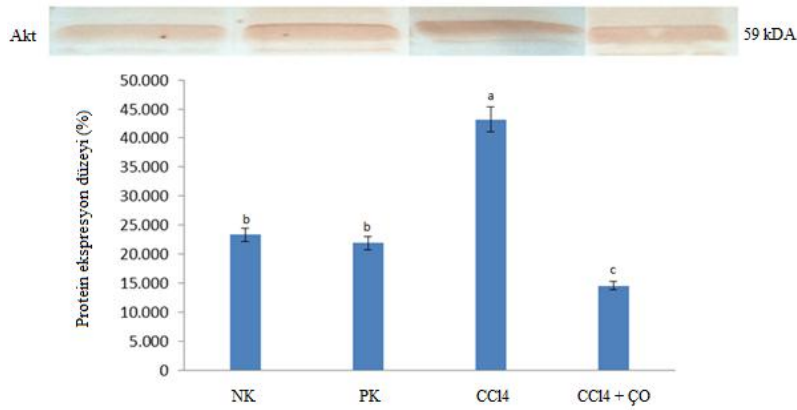
One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi



Şekil 21. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$)
One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi



Şekil 22. Gruplara göre erk protein ekspresyon düzeyleri
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$)
One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi



Şekil 23. Gruplara göre akt protein ekspresyon düzeyleri
a-d: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$)
One-Way ANOVA *Post Hoc* Tukey Testi

Hücre ölüm mekanizmasında yer alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi (şekil 20), CCl₄ grubuna göre CCl₄ + ÇO grubunda daha fazladır ($p<0.05$). Şekil 21’de kaspaz-9 proteininin ekspresyon düzeyi incelendiğinde, CCl₄+ÇO grubunun kontrol grupları ve CCl₄ grubuna oranla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ($p<0.05$) olduğu ve CCl₄+ÇO grubunda en yüksek protein ekspresyon düzeyi olduğu görülmektedir. Erk proteininin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında ise (şekil 22) kontrol grupları ve CCl₄+ÇO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı, daha fazla ekspresyon oranı olan CCl₄ grubunun ise bu gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde ayrıldığı görülmektedir ($p<0.05$). Son olarak şekil 23’de akt proteininin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, CCl₄+ÇO grubunda ekspresyon oranının azaldığı ve CCl₄ grubunda ise en yüksek düzeyde ekspresyon olduğu ve diğer gruplarla arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Antioksidan özelliği olduğu bilinen bitkilerin hücre ve doku hasarlarını önlemedeki rolleri son yıllarda yapılan birçok araştırmayla beraber anlaşılmaktadır. Çörek otunun akciğer hasarı ile alakalı rat akciğer dokusunda etkileri ile ilgili çok fazla çalışma olmadığı için bu çalışmadan elde edilen sonuçların mevcut literatüre önemli katkılar sunacağı kanısındayız. Antitümör, bronkodilatör, antidiyabetik gibi etkileri olan çörek otu bitki ekstraktının birçok tedavi edici etkisinin olduğu ve serbest radikal tutucu işleviyle antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir (Aqel ve Shaheen, 1996; Harzallah, 2011; Beheshti vd., 2015). Çörek otu ekstraktının içme suyuna belirli oranlarda katıldığında canlı organizmalarda oldukça etkili olduğu ve pozitif yönde birçok basamağı düzelterek tedavi edici özelliğinin olduğunu belirlenmiştir (Darakhshan vd., 2015). Mucizevi bir bitki olarak tanımlanan *Nigella sativa*'dan, trake ve solunum yolu üzerindeki iyileştirici etkilerinden dolayı solunumu kolaylaştırıcı ve akciğer koruyucu bir bitki olarak bahsetmişlerdir (Ahmad vd., 2013). Çörek otunun rat kanında kadmiyum kaynaklı oksidatif strese etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kadmiyum etkisinden ileri gelen plazma ve eritrositlerdeki MDA seviyelerindeki artışın çörek otu tedavisiyle azaltılabildiği belirtilmiştir (Kanter vd., 2005). CCl₄ ile karaciğer nekrozuna çörek otu uygulamasının etkisinin incelendiği bir çalışmada, çörek otunun ratlar üzerinde CCl₄'ün toksik etkisi üzerine MDA seviyeleri ve ALT, AST gibi biyokimyasal parametreler üzerinde ciddi düzeyde iyileştirici etkileri olduğu belirtilmiştir. (Şahin vd., 2003). Ratlarda karbon tetraklorür kaynaklı hepatoksisitede *Nigella sativa* tohum ekstraktının etkisinin incelendiği ve dört ayrı grup oluşturulan diğer bir çalışmada, karbon tetraklorürün hücre ve dokularda harabiyet oluşturduğu, enzim sentezi ve birçok biyokimyasal aktiviteyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Buna karşılık ratlara % 10 oranında içme suyu yoluyla verilen *Nigella sativa* tohum ekstraktının antioksidan savunma sistemi ve hepatik oksidatif hasarın azaltılmasında oldukça etkili ve iyileştirici bir bitki olduğu belirtilmiştir. (Muthukrishnan ve Krishnan, 2012). Bizim çalışmamızda, düzenli aralıklarla yaptığımız rat ağırlık tayini göz önüne alınarak (Tablo 3, şekil 10) ilk günlük ağırlıklar ile kesimden 24 saat önceki ağırlıklar karşılaştırıldığında kontrol gruplarında düzenli ve yüksek oranda bir artış söz konusuken CCl₄ uygulaması yapılan gruplarda daha düşük oranda ağırlık artışı olduğu gözlenmiştir (p< 0.05). CCl₄ + ÇO grubunda kontrol gruplarına göre daha az bir ağırlık artışı olmakla beraber CCl₄ grubuna göre ise daha fazla ağırlık artışı meydana gelmiştir (p< 0.05). Sonuç

olarak en az ağırlık artışı CCl_4 grubundaki ratlarda meydana gelmiştir. Sadece ağırlık artışlarındaki bu farklılıklar dikkate alınarak güçlü bir ksenobiyotik olan CCl_4 'e karşı çörek otunun ratlarda koruyucu bir etki gösterdiği ve bu etkinin hayvanların beslenmesi dahil birçok durumda rol oynadığı yorumu yapılabilir.

Rat beyin bölgelerinde propoxur kaynaklı toksisite ve oksidatif strese *Nigella sativa* yağının koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada serebellum, korteks ve hipokampüste propoxur kaynaklı MDA seviyesi diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturacak şekilde yüksek ($p<0.05$) çıkmıştır. Kontrol grubu, sadece *Nigella sativa* ve hem *Nigella sativa* hem de propoxur verilen gruplarda ise serebellum, korteks ve hipokampüste MDA seviyesinin oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. (Mohamadin vd., 2010). Hiperoksi kaynaklı akciğer hasarında *Nigella sativa*'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratları kontrol, hiperoksi ve hiperoksi + çörek otu olarak üç gruba ayrılmış ve hiperoksi grubundaki yavru ratlar % 95 oranında O_2 'ye maruz bırakılmıştır. Hiperoksi + çörek otu grubunda % 100 doğal çörek otu tohum yağı kullanılmıştır. Lipit peroksidasyonunun belirteci olan MDA seviyesi incelemelerinin sonucunda hiperoksi + çörek otu grubunda, hiperoksi grubuna oranla çok daha düşük MDA seviyesi ($p<0.05$) olduğu belirtilmiştir. (Tayman vd., 2013). Bizim bulgularımızda, akciğer dokusundaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında (tablo 4, şekil 14), kontrol grupları ve CCl_4 + ÇO grubu arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. Ancak CCl_4 grubunun MDA seviyesi incelendiğinde diğer üç gruptan oldukça yüksek bir orana sahip olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana geldiği ($p<0.05$) görülmektedir. Bu sonuca dayanarak çörek otu bitkisinin lipit peroksidasyonuna bağlı olarak artan MDA oranını azaltmada etkili bir antioksidan bitki olduğu yorumu yapılabilir. Ratlarda asetoaminofen kaynaklı hepatoksisitede çörek otu etken maddesi timokinonun tedavi edici etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada, sadece asetoaminofen verilen ratlarda plazma MDA seviyesinin diğer gruplara oranla istatistiksel açıdan fark olacak şekilde yüksek çıktığı ($p<0.05$), kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve asetoaminofen ile birlikte timokinon verilen grubun plazma MDA seviyesinde düşüş görüldüğü belirtilmiştir. (Aycan vd., 2014). İnsan ve hayvanlarda gram negatif bakteriyel enfeksiyona karşı koruyucu etkisi olan ancak fazla dozları nefrotoksisiteye sebep olan gentamisin maddesini kullanarak ratlarda nefrotoksisite oluşturulmuş ve meydana gelen hasara karşı *Nigella sativa*'nın koruyucu etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada sadece gentamisin verilen grupta plazma MDA

seviyesinin kontrol grubu ve gentamisin ile *Nigella sativa*'nın birlikte verildiği gruplara göre istatistiksel açıdan fark olacak şekilde ($p<0.05$) yüksek çıktığı belirtilmiştir. (Yaman ve Balıkcı, 2010). Timokinonun diyabette, böbrek dokusunda, kolorektal, meme kanseri gibi çok sayıdaki kanser tipinde, birçok dokuda ve plazmada MDA seviyesini azalttığı belirtilmiştir. (Darakhshan vd., 2015). Bizim çalışmamızdaki plazma MDA seviyeleri incelendiğinde (tablo 5, şekil 15) kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı ($p>0.05$) ve en yüksek plazma MDA seviyesinin CCl_4 grubunda meydana geldiği ve diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. CCl_4 + ÇO grubunda ise plazma MDA seviyesinde azalma meydana geldiği ve burada çörek otunun antioksidan etkisinin gerçekleştiği yorumu yapılabilir.

Çörek otundan elde edilen biyoaktif bir bileşik olan timokinonun fare nöroblastomunda bazı apoptotik markerlarla beraber kanser üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 μ m) timokinon bileşiğinin fare nöroblastomunda kaspaz-3 proteininin ekspresyonunu nasıl etkilediği gözlemlenmiştir ve timokinon konsantrasyonu arttıkça kaspaz-3 ekspresyon oranının arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluştuğu ($p<0.05$) belirtilmiştir (Jayaraman vd., 2012). Yapılan başka bir araştırmada, kaspaz-3 proteininin ekspresyon oranı sadece CCl_4 verilen grupta, kontrol grubu, CCl_4 +50 mg/kg diallil sülfat ve CCl_4 +100 mg/kg diallil sülfat gruplarına göre istatistiksel olarak farklı şekilde ($p<0.05$) yüksek çıkmıştır (Lee vd., 2014). Fare nöroblastoma hücrelerinde timokinonun kaspaz-3 ve kaspaz-9 sentezini arttırdığı vurgulanmıştır (Darakhshan vd., 2015). Bizim bulgularımıza göre CCl_4 grubunda kaspaz-3 aktivitesi, diğer gruplara oranla istatistiksel olarak düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Pozitif kontrol ve CCl_4 + ÇO grupları arasında kaspaz-3 protein ekspresyonu bakımından istatistiksel bir fark oluşmazken ($p>0.05$), CCl_4 + ÇO grubunun CCl_4 grubuna oranla daha fazla kaspaz-3 aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (şekil 20). Fare nöroblastomunda çörek otu etken maddelerinden timokinonun farklı konsantrasyonlarının (0, 20, 40 μ m) bazı apoptotik markerlarla birlikte anti-kanser etkisi olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada tıpkı kaspaz-3'te olduğu gibi kaspaz-9 ekspresyon oranında da timokinon konsantrasyonu arttıkça kaspaz-9 ekspresyon oranının arttığını ve istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın oluştuğu belirtilmiştir. (Jayaraman vd., 2012). Bir çalışmada 14 gün boyunca (75mg/kg) $CuSO_4$ verilen gruptaki kaspaz-9 aktivitesi, kontrol grubu ve 28 gün boyunca (75mg/kg) $CuSO_4$ verilen gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı çıkmıştır ($p<0.05$). En fazla ekspresyon oranının 14 günlük uygulama yapılan I. deneme grubunda görüldüğü

belirtilmiştir (Kabak ve Gülbahar, 2013). Bizim bulgularımıza göre, kaspaz-9 protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde (şekil 21), gruplar arasında istatistiksel açıdan fark olduğu ($p<0.05$) görülmektedir. En düşük kaspaz-9 ekspresyon oranı PK grubunda, en yüksek ekspresyon oranı ise $CCl_4 + \text{ÇO}$ grubunda oluşmuştur ($p<0.05$) bu da bize çörek otunun kaspaz-9 sentezini teşvik ettiğini düşündürmektedir.

Apoptotik süreçte çörek otu ekstraktının Erk ve Akt sentez yolunu uyararak bu proteinlerin sentezini engellediği belirtilmiştir. (Darakhshan vd., 2015). Dişi ratlarda travma kanama sonrası Erk sinyal yolu kaynaklı akciğer hasarı azaltımının incelendiği çalışmada travma kanama oluşturulan gruplarda ve özellikle taşıyıcı grup olarak belirtilen grupta (vehicle group) Erk protein ekspresyon oranının tüm gruplardan istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) ve fazla çıktığı ifade edilmiş ve erk sinyal yolunun bozulmasının bazı kanser türlerini tetiklediği belirtilmiştir. (Hsu vd., 2009). Bizim çalışmamızda, Erk protein ekspresyon oranı incelendiğinde kontrol grupları ve $CCl_4 + \text{ÇO}$ grubu arasında istatistiksel bir fark olmadığı ($p>0.05$), CCl_4 grubundaki ekspresyon oranının ise diğer üç gruba göre fazla ve istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak çörek otu verilen grupta CCl_4 grubuna göre bu protein miktarının düşük miktarda olması çörek otunun bu proteinin sentezine baskı yaparak sentezini azalttığını ve böylece akciğer dokusunda meydana gelmiş olan hasarı azaltıcı yönde etki yaptığını söyleyebiliriz (şekil 22).

Akut iliksel lösemide çörek otu etken maddesi timokinonun antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyen) ve proapoptotik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, bazı proteinlerin western blot analizleri neticesinde timokinonun Akt ve Erk aktivasyonunun bastırılmasıyla tümör anjiyogenezi (kan damarları oluşumu) ve tümör büyümesini engellediği ve timokinonun kanser tedavisinde potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Khalife vd., 2014). Bizim çalışmamızda Akt protein ekspresyon seviyesi (şekil 23), CCl_4 grubunda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek ($p<0.05$) çıkmıştır. En yüksek ekspresyon oranı CCl_4 grubunda gözlenmiş ve diğer gruplara oranla istatistiksel olarak fark göstermiştir ($p<0.05$). Buna bağlı olarak çörek otu verilen grupta CCl_4 grubuna göre bu protein miktarının düşük miktarda olmasını çörek otunun bu proteinin sentezine baskı yaparak sentezini azalttığını ve böylece akciğer dokusunda meydana gelmiş olan hasarı azaltıcı yönde etki yaptığını söyleyebiliriz (şekil 23).

Bir çok doku ve hücrede çörek otu ekstraktının canlı organizmalarda oksidatif hasarda ve farklı kanser tiplerinde hücre ve dokuyu DNA hasarına karşı koruduğu

belirtilmiştir (Darakhshan vd., 2015). DNA fragmentasyonunun apoptotik dokuda karakterize edildiğini ve apoptozis ilişkili DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde TUNEL metodunun yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Antioksidan ve antiapoptozis mekanizmaları yoluyla farelerde parakuat (bitki öldürücü bir kimyasal) indüklü akut akciğer hasarına metallotiyoneinlerin azaltıcı etkilerini araştırıldığı çalışmada, TUNEL metodu incelemelerine dayanarak kontrol gruplarında bir hasar söz konusu olmadığı sadece parakuat verilen farelerde apoptotik indeks oranının oldukça yüksek olduğu, parakuatla beraber metallotiyonein verilen farelerde ise apoptotik yüzdesinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (Peng vd., 2014). Bizim bulgularımıza göre, ratlara CCl_4 verilerek oluşturulan akciğer hasarında DNA agaroz jel elektroforezi görüntülerimiz incelendiğinde (şekil 12), NK ve PK gruplarında DNA kırıklarının olmadığı görülmektedir. En fazla DNA kırığı oluşumunun CCl_4 grubunda olduğu, CCl_4 + ÇO grubunda ise DNA kırığı oluşumunun nispeten daha az olduğu anlaşılmaktadır. ÇO verilen hasarlı gruba, ÇO verilmeyen hasarlı gruba göre DNA kırığı oluşumunun daha az olması, DNA hasarının CCl_4 + ÇO grubunda daha az olduğunu düşündürmektedir. Bu da, çörek otunda bulunan etken maddelerin hasarlı hücrelerdeki DNA hasarını kısmen de olsa engelleyebileceğini göstermektedir.

Soluma zatürreesine metilen mavisi muamelesinin etkisinin incelendiği bir araştırmada ratları, tuz solüsyonu içeren (kontrol), BIO (Biosorb Energy Plus), HCl, tuz solüsyonu + metilen mavisi, BIO + metilen mavisi ve HCl + metilen mavisi şeklinde altı gruba ayrılmıştır. Cerrahi prosedürün ardından yapılan analizde TUNEL metodu incelemelerine dayanarak en yüksek apoptozis yüzdesinin HCl grubunda olduğu ($p<0.05$), sırasıyla HCl + metilen mavisi ve BIO gruplarındaki apoptozis yüzdesinin de HCl grubundan sonra yüksek apoptozis oranına sahip olduğu, en düşük apoptotik indeksin de tuz solüsyonu + metilen mavisi grubunda meydana geldiği belirtilmiştir (Kanter vd., 2015). Bizim TUNEL metodu sonuçlarımız incelendiğinde (tablo 6), apoptozis yüzdesinin en fazla CCl_4 grubunda meydana geldiğini (şekil 18) ve NK grubuyla kıyaslandığında (şekil 16) istatistiksel olarak bir fark meydana geldiği ($p<0.05$) görülmektedir. Ayrıca kontrol grupları arasında (şekil 16 ve 17) istatistiksel açıdan fark gözlenmezken ($p>0.05$), CCl_4 + ÇO grubundaki apoptotik indeksin azalarak normale yaklaştığı incelenmektedir (şekil 19).

5. ÖNERİLER

Analiz verilerimize göre, çörek otu ekstraktındaki etken maddeler, özellikle akciğer hasarı sürecinde, dokulardaki hasar oranını azaltabilmekte, lipid peroksidasyon düzeyini düşürebilmekte ve yine DNA hasarını da azaltabilmektedir. Apoptozisten sorumlu proteinlerin sentezini indükleyerek bu sürecin başlamasına yol açmakta ve böylece akciğer dokusunda hasarlı hücrelerin apoptozise uğrayarak yok olmalarında rol oynamaktadır (Türker ve Bayrak, 1997; Harzallah, 2011, Daba ve Rahman, 1998; Aslan ve Can, 2014; Darakhshan vd., 2015).

Çalışmamızda kullandığımız apoptotik markerların ekspresyon düzeyleri incelendiğinde (kaspaz-3, kaspaz-9, erk, akt), çörek otunun apoptozis üzerindeki etkileri açık bir şekilde görülmektedir. Aynı şekilde, apoptozis düzeyini belirlemek amacıyla yaptığımız TUNEL metodu çalışmasının sonuçlarını incelediğimiz zaman, CCl₄, çörek otu ve apoptozis arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamamız mümkün olmaktadır.

Elde ettiğimiz bu bilgiler ışığında, güçlü bir antioksidan bitki olan çörek otunun akciğer üzerinde koruyucu etkileri olduğunu ve akciğer hasarına karşı kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Aynı zamanda, yapılan literatür araştırmaları ile beraber sonuçlarımız karşılaştırıldığında, çörek otunun sadece akciğer üzerinde değil, böbrek, beyin, kalp, karaciğer gibi birçok organda ve birçok kanser türünde çalışıldığı ve bunlar üzerinde ciddi düzeyde koruyucu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızın sonucunda, ratlar üzerinde denediğimiz çörek otu bitkisinin göstermiş olduğu akciğer koruyucu etkilerinin, daha sonraki çalışmalarda insanlar üzerinde denendiğinde benzer etkiler gösterebileceğini ve bunun akciğer hastalıklarını önlemede gelecekte bir umut olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Accorsi, A., Zibae, A., Malagoli, D.,** 2015. The multifaceted activity of insect caspases, *Journal of Insect Physiology*, **76**, 17–23.
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S.A., Najmi, A.K., Siddique, N.A., Damanhour, Z.A., Anwar, F.,** 2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**(5), 337-352.
- Aktümsek, A.,** 2007. İnsan Fizyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Al-Dbass, A.M., Al-Daihan, S.K., Bhat, R.S.,** 2012. Agaricus blazei, Murill as an Efficient Hepatoprotective and Antioxidant Agent Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**, 303-309.
- Al-Saeedi, A.H., Hossain, M.A.,** 2015. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **5**(4), 316-321.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E.,** 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6**, 93-104.
- Antmen, Ş.E.,** 2005. Beta Talasemide Oksidatif Stres, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Aqel, M., Shaheen, R.,** 1996. Effects of the Volatile Oil of *Nigella sativa* Seeds on the Uterine Smooth Muscle of Rat and Guinea Pig, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 23-26.
- Aslan, A.,** 2011. Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Aslan, A., Can, M.İ.,** 2014. Milk thistle Impedes the Development of Carbontetrachloride-Induced Liver Damage in Rats Through Suppression of Bcl-2 and Regulating Caspase Pathway, *Life Sciences*, **117**, 13-18.
- Aycan, İ.Ö., Tüfek, A., Tokgöz, O., Evliyaoğlu, O., Fırat, U., Kavak, G.Ö., Turgut, H., Yüksel, M.U.,** 2014. Thymoquinone Treatment Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Rats, *International Journal of Surgery*, **12**, 213-218.

- Bahçecioğlu, İ.H., Koca, S.S., Poyrazoğlu, O.K., Yalnız, M., Özercan, İ.H., Üstündağ, B., Şahin, K., Dağlı, A.F., Işık, A., 2008.** Hepatoprotective Effect of Infliximab, and Anti-TNF- α Agent, on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis, *Inflammation*, **31**, 215-221.
- Beheshti, Farimah., Hosseini, Mahmoud., Vafae, Farzaneh., Shafei, M.N., Soukhtanloo, M., 2015.** Feeding of *Nigella sativa* during neonatal and juvenile growth improves learning and memory of rats, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, xxx 1-7.
- Benzer, F. ve Ozan, S., 2003.** Fasciola hepatica ile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, *Turkish Journal Veterinary and Animal Science*, **27**, 657-661.
- Cagnol, S., Chambard, J.C., 2009.** ERK and Cell Death: Mechanisms of ERK-Induced Cell Death – Apoptosis, Autophagy and Senescence, *The FEBS Journal*, **277**, 2-21.
- Campbell, N.A. ve Reece, J.B., 2006.** Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Can, M.İ., 2014.** Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Deve Dikeni (*Silybum marianum* L.)’nin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Comer, B.S., Ba, M., Singer, C.A., Gerthoffer, W.T., 2015.** Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases, *Pharmacology & Therapeutics*, **147**, 91–110.
- Daba, M. H., Abdel-Rahman, M.S., 1998.** Hepatoprotective Activity of Thymoquinone in Isolated Rat Hepatocytes, *Toxicology Letters*, **95**, 23-29.
- Darakhshan, S., Poura, A.B., Colagarc, A.H., Sisakhtnezhada, S., 2015.** Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacological Research*, **95–96**, 138–158.
- Feng, Y., Wang, N., Ye, X., Li, H., Feng, Y., Cheung, F., Nagamatsu, T., 2011.** Hepatoprotective Effect and its Possible Mechanism of *Coptidis rizoma* Aqueous Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Hepatotoxicity in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **138**, 683-690.
- Geng, J., Li, X., Zhou, Z., Wu, C.L., Dai, M., Bai, X., 2015.** EZH2 promotes tumor progression via regulating VEGF-A/AKT signaling in non-small cell lung cancer, *Cancer Letters*, **359**, 275–287.

- Gözüaçık, D., Korkmaz, G., Arslan, D.Ö.,** 2011. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2 (4)**, 184-194.
- Harzallah, H.J., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A., Mahjoub, T.,** 2011. Chemical Composition, Antimicrobial Potential Against Cariogenic Bacteria and Cytotoxic Activity of Tunisian *Nigella sativa* Essential Oil and Thymoquinone, *Food Chemistry*, **129**, 1469-1474.
- Heshmati, J., Namazi, N., Memarzadeh, M.R., Taghizadeh, M., Kolahdooz, F.,** 2015. *Nigella sativa* oil affects glucose metabolism and lipid concentrations in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Food Research International*, **70**, 87-93.
- Hsu, J., Kan, W., Hsieh, C., Choudhry, M.A., Bland, K.I., Chaudry, I.H.,** 2009. Role of Extracellular Signal-Regulated protein Kinase (ERK) in 17 β -Estradiol-mediated Attenuation of Lung Injury After Trauma-Hemorrhage, *Surgery*, **145 (2)**, 226-234.
- Hugle, M., Fulda, S.,** 2015. Dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 synergizes with chloroquine to induce apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma, *Cancer Letters*, **360**, 1-9.
- İnci, A., Yıldırım, A., Yavuz, A., Düzlü, Ö.,** 2009. Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **6 (2)**, 121-133.
- Jayaraman, G., Priyadharsini, J.V., Rajiv, R., Anandan, B., Raghunandhakumar, S., Shabnam, J., Sambantham, S., Paramasivam, A.,** 2012. Anti-Cancer Effects of Thymoquinone in Mouse Neuroblastoma (Neuro-2a) Cells Through Caspase-3 Activation with Down-Regulation of XIAP, *Toxicology Letters*, **213**, 151-159.
- Kabak, Y.B., Gülbahar, M.Y.,** 2013. Sıçanlarda Deneysel Bakır Zehirlenmesinde Karaciğer ve Böbrek Dokularında Apoptozisin Belirlenmesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **60**, 39-45.
- Kanter, M., Coşkun, Ö., Gürel, A.,** 2005. Effect of Black Cumin (*Nigella sativa*) on Cadmium-Induced Oxidative Stress in the Blood of Rats, *Biological Trace Element Research*, **107**, 277-287.

- Kanter, M., Sahin, S.H., Basaran, U.N., Ayvaz, S., Aksu, B., Erboğa, M., Colak, A.,** 2015. The Effect of Methylene Blue Treatment on Aspiration Pneumonia, *Journal of Surgical Research*, **193**, 909-919.
- Khalife, R., Stephany, E., Tarras, O., Hodroj, M.H., Rizk, S.,** 2014. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Topotecan in Combination with Thymoquinone on Acute Myelogenous Leukemia, Clinical Lymphoma, *Myeloma & Leukemia*, **14**, 46-55.
- Kim, K.M., Heo, D.R., Lee, J., Park, J.S., Baek, M.G., Yi, J.M., Kim, H., Bang, O.S.,** 2015. 5,30-Dihydroxy-6,7,40-trimethoxyflavanone exerts its anticancer and antiangiogenesis effects through regulation of the Akt/mTOR signaling pathway in human lung cancer cells, *Chemico-Biological Interactions*, **225**, 32-39.
- Krishnan, N., Muthukrishnan, S.,** 2012. Effect of *Nigella sativa* Seed Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats, *Journal of Acute Medicine*, **2**, 107-113.
- Korsmeyer, S.J.,** 1999. BCL-2 Gene Family and The Regulation of Programmed Cell Death, *Cancer Research*, **59**, 1693-1700.
- Kumar, V., Sharma, M., Lemos, M., Shriram, V.,** 2013. Efficacy of *Helicteres isora* L. against free radicals, lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage, *Journal of Pharmacy Research*, **6**, 620-625.
- Kuwahata, M., Kubota, H., Kanouchi, H., Ito, S., Ogawa, A., Kobayashi, Y., Kido, Y.,** 2012. Supplementation with Branched-Chain Amino Acids Attenuates Hepatic Apoptosis in Rats with Chronic Liver Disease, *Nutrition Research*, **32**, 522-529.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, I., Kim, S., Baek, H., Moon, C., Kang, S., Kim, S.H., Kim, Y., Shin, I., Kim, J.,** 2014. The Involvement of Nrf2 In The Protective Effects of Diallyl Disulfide on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Oxidative Damage and Inflammatory Response in Rats, *Food and Chemical Toxicology*, **63**, 174-185.
- Li, R., Chen, B., Wang, G., Yu, B., Ren, G., Ni, G.,** 2011. Effects of Mechanical Strain on Oxygen Free Radical System in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Children, *Injury*, **42**, 753-757.

- Lin, H., Tseng, H., Wang, C., Lin, J., Lo, C., Chou, F.,** 2008. Hepatoprotective Effects of *Solanum nigrum* Linn Extract against CCl₄-Induced Oxidative Damage in Rats, *Chemico-Biological Interactions*, **171**, 283-293.
- Lu, Z., Xu, S.,** 2006. ERK1/2 MAP Kinases in Cell Survival and Apoptosis, *Life*, **58 (11)**, 621-631.
- Lüleyap, H.Ü.,** 2008. Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Ankara.
- Ma, C., Zhu L., Wang, Jing., He, He., Chang, X., Gao, J., Yan, T., Shumin W.,** 2015. Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* hand.-Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Journal of Ethnopharmacology*, in press.
- Mohamadin, A.M., Sheikh, B., Abd El-Aal, A.A., Elberry, A.A., Al-Abbasi, F.A.,** 2010. Protective Effects of *Nigella sativa* Oil on Propoxur-Induced Toxicity and Oxidative Stress in Rat Brain Regions, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **98**, 128-134.
- Nishioka, H., Kishioka, T., Iida, C., Fujii, K., Ichi, I., Kojo, S.,** 2006. Activation of Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) During D-galactosamine Intoxication in the Rat Liver. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**, 3019-3022.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.,** 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Analyses of Biochemical*, **95**, 351-358.
- Omata, Y., Saito, Y., Yoshida, Y., Jeong, B. S., Serwa R., Nam, T., Porter, N. A., Niki, E.,** 2010, Action of 6-Amino-3-Pyridinols as Novel Antioxidants Against Free Radicals and Oxidative Stress in Solution, Plasma, and Cultured Cells, *Free Radical Biology & Medicine*, **48**, 1358-1365.
- Peng, S.Q., Ren, M., Wang, Y.M., Zhao, J., Zhao, J., Zhao, Z.M., Zhang, T.F., He, J., Ren, S.P.,** 2014. Metallothioneins Attenuate Paraquat-Induced Acute Lung Injury in Mice Through the Mechanisms of Anti-Oxidation and Anti-Apoptosis, *Food and Chemical Toxicology*, **73**, 140-147.
- Qiu, J., Liu, Z., Li, Y., Xuan, H., Lin, Q., Li, F., Wang, Y., Li, Z., Zhao, M.,** 2007. Overexpression of the Gene for Transmembrane 4 Superfamily Member 4 Accelerates Liver Damage in Rats Treated with CCl₄, *Journal of Hepatology*, **46**, 266-275.

- Schmitz, K.J., Wohlschlaeger, J., Lang, H., Sotiropoulos, G.C., Malago, M., Steveling, K., Reis, H., Cicinnati, V.R., Schmid, K.V., Baba, H.A.,** 2008. Activation of the ERK and AKT Signalling Pathway Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma and ERK Activation in Cancer Tissue is Associated with Hepatitis C Virus Infection, *Journal of Hepatology*, **48**, 83-90.
- Seomun, Y., Joo, C.K.,** 2008. Lumican Induces Human Corneal Epithelial Cell Migration and Integrin Expression via ERK 1/2 Signaling, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **372**, 221-225.
- Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S.,** 2010. Silymarin, the Antioxidant Component, and *Silybum marianum* Extracts Prevent Liver Damage, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 803-806.
- Stehbens, E.W.,** 2003. Oxidative Stress, Toxic Hepatitis, and Antioxidant with Particular Emphasis on Zinc, *Experimental and Molecular Pathology*, **75**, 265-276.
- Şahin, A., Yener, Z., Dağoğlu, G., Dede, S., Oto, G., Alkan, M.,** 2003, Karbontetraklorid (CCl₄) ile Deneysel Olarak Karaciğer Nekrozu Oluşturulan Ratlarda Vitamin E + Selenyum ve *Nigella sativa* (Çörek otu)'nın Karaciğer Yıkımını Engelleyici Etkileri, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **27**, 141-152.
- Tanrıverdi, G.,** 2005. Karbon Tetraklorür (CCl₄) ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarında Değişik Dozlardaki Nikotinamidin Protektif Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Taş, U., Ögetürk, M., Sapmaz, H., Karaca, Z.İ., Özyurt, B., Söğüt, E., Sarsılmaz, M.,** 2012. Sıçan Prefrontal Korteksinde Tolüenin Neden Olduğu Apoptoza Karşı Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **26**, 1-6.
- Tayman, C., Çekmez, F., Kafa, İ.M., Canpolat, F.E., Çetinkaya, M., Tonbul, A., Uysal, S., Tunç, T., Sarıcı, S.Ü.,** 2013. Protective Effects of *Nigella sativa* Oil in Hyperoxia-Induced Lung Injury, *Archivos De Bronconeumologia*, **49** (1), 15-21.
- Thompson, E.B.,** 1994. Apoptosis and Steroid Hormones, *Molecular Endocrinology*, **8**, 665-673.

- Tuzcu, M., Aslan, A., Tuzcu, Z., Yabas, M., Bahcecioglu, I.H., Ozercan, I.H., Kucuk, O., Sahin, K.,** 2012. Tomato powder impedes the development of azoxymethane-induced colorectal cancer in rats through suppression of COX-2 expression via NF-kB and regulating Nrf2/HO-1 pathway, *Molecular Nutrition and Food Research*, **56 (9)**, 1477-1481.
- Türker, L., Bayrak, A.,** 1997. Çörek Otu (*Nigella sativa* L.)’nun Sabit ve Uçucu Yağ Kompozisyonunun Araştırılması, *Standard*, **430**, 128-137.
- Üstündağ, B., Bahçecioglu, İ., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ.H., Gürsu, M.F.,** 2005. Soy İzoflavonların Karbon Tetraklorüre (CCl₄) Bağlı Karaciğer Hasarı ve Plazma Paraksonaz ile Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkileri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **19**, 263-271.
- Vatakuti, S., Schoonen, W.G.E.J., Elferink, M.L.G., Groothuis, G.M.M., Olinga, P.,** 2015, Acute toxicity of CCl₄ but not of paracetamol induces a transcriptomic signature of fibrosis in precision-cut liver slices, *Toxicology in Vitro*, in press.
- Vuda, M., D’Souza, R., Upadhy, S., Kumar, V., Rao, N., Kumar, V., Boillat, C., Mungli, P.,** 2012. Hepatoprotective and Antioxidant Activity of Aqueous Extract of Hybanthus enneaspermus Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **64**, 855-859.
- Waisundara, V.Y., Hoon, L.Y.,** 2014. Free radical scavenging ability of *Aspalathus linearis* in two in vitro models of diabetes and cancer, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* xxx 1-5.
- Wang, J.Y., Shum, A.Y., Ho, Y.J., Wang, J.Y.,** 2003. Oxidative Neurotoxicity in Rat Cerebral Cortex Neurons: Synergistic Effects of H₂O₂ and NO on Apoptosis Involving Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Caspase-3, *Journal of Neuroscience Research*, **72**, 508-519.
- Yaman, İ. ve Balıkçı, E.,** 2010. Protective Effects of *Nigella sativa* Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **62**, 183-190.
- Yılmaz, İ.,** 2005. Erişkin Ratlarda Deneysel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptosis Düzeylerinin Yükselmesi ve Yükselmiş Olan Apoptosisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin Tunel Yöntemi ile Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.

- Yüksel, B., Kılıç, S., Taşdemir, N., Batioğlu, S., Burak, Z.T.,** 2009. Apoptozis ve Kaspaz Sistemi, *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, **10**, 58.
- URL1:** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Akci%C4%9Fer>, 10 Nisan 2015.
- URL2:** http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/karbon_tetraklor%C3%BCr/, 11 Nisan 2015.
- URL3:** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Apoptozis#/media/File:Apoptosis-blank.png>, 12 Nisan 2015.
- URL4:**<http://thumbs.dreamstime.com/z/apoptosis-process-programmed-cell-death-vector-diagram-45763884.jpg>, 12 Nisan 2015.
- URL5:** <http://www.metafizikbilgiler.com/images/icresimler/apoptosis.jpg>, 12 Nisan 2015.
- URL6:**<http://www.faydalarizararlari.com/wpcontent/uploads/2014/10/%C3%87%C3%B6r-ek-otu-mikroplar%C4%B1-ve-mantarlar%C4%B1-%C3%B6ld%C3%BCr%C3%BCr..jpg>, 12 Nisan 2015.
- URL7:**<https://encryptedtbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTr1jQXURIWdeYRtcI7X1GO7FIMtZGrsj0ZGdnGa7jKk0PvVwOgVA>, 11 Nisan 2015.
- URL8:** <http://www.sifamarket.com/images/picmanage2/upload/mucuzevi-bitkiler/corekotu-2.jpg>, 12 Nisan 2015
- URL9:**<http://www.sifalibitkitedavisi.com/wpcontent/uploads/2012/02/%C3%A7%C3%B6rek-otu-bitkisi.jpg>, 11 Nisan 2015.

ÖZ GEÇMİŞ

Didem BOYDAK

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 28.11.1986

Görevi: Biyolog

İş Adresi: Toki toplu konut / Ergani / Diyarbakır

Tel: 0412 611 51 12

Fax: 0412 611 57 24

e-posta: didemboydak@hotmail.com

Yükseklisans Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Abdullah ASLAN

2012-....: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Bilimdalında
Yükseklisans Eğitimi

2006-2011: Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans Eğitimi

2001-2003: Lise

1998-2000: Orta okul

1992-1997: İlköğretim