



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TİMOKİNONUN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİ ETKİSİNİN
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Muhammed ÇELEBİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Semiha DEDE

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOKİNONUN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİ ETKİSİNİN
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Muhammed ÇELEBİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Semiha DEDE

VAN-2021

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2019-8502 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında Muhammed ÇELEBİ tarafından hazırlanan “*Timokinonun endoplazmik retikulum (ER) stresi etkisinin in vitro olarak araştırılması*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:23/03/2021

Prof. Dr. Semiha DEDE
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR
Aksaray Üniversitesi
Jüri Üyesi

Dr. Öğrt. Üyesi. Veysel YÜKSEK
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Timokinonun endoplazmik retikulum (ER) stresi etkisinin in vitro olarak araştırılması*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Muhammed ÇELEBİ

Tarih: 23/03/2021

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim süreci içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, her konuda desteğini gördüğüm, hoşgörü ortamı içerisinde geniş tecrübesiyle bizlere yön veren, kendine güvenen bireyler olarak yetişmemizde büyük rol oynayan saygıdeğer hocam Prof. Dr.Semiha DEDE 'ye en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu tezin başlangıcından sonuna kadar her aşamasında çok büyük emeği, bilgisi, tecrübesi, fedakarlığı,özverisi olan; her türlü işte en ince ayrıntılarla defalarca ilgilenen; çok değerli zamanından ödün veren; her detayla tek tek ilgilenen; sevgisini, hoşgörüsünü, idealistliğini, çalışkanlığını, saygınlığını çok takdir ettiğim; bu süreç zarfında kendisinden çok şey öğrendiğim çok değerli Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK'e, eğitimim boyunca değerli katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma canı gönülden teşekkür ederim. Bu süreçte desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, moral ve motivasyon sağlayan, her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi Çağrı KALE, Dr. Öğr. Üyesi Özgül GÜLAYDIN, Dr. Öğr. Üyesi Rabia Mehtap TUNCAY ve Dr. Öğr. Üyesi Volkan KOŞAL'a çok teşekkür ederim. Her zaman her koşulda yanımda olduklarını hissettiğim arkadaşlarım Veteriner Hekim Berivan KAPLAN ve Veteriner Hekim Zeynep ÇÖTEN'e çok teşekkür ederim. Son olarak, hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, esirgemeyen; başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan; ne kadar yazsam, ne kadar teşekkür etsem az olduğunu bildiğim, ama hayatımdaki en büyük gücüm, en değerlilerim, o ailenin bir ferdi olmaktan onur ve gurur duyduğum çok değerli anne ve babama ve her zaman yanımda olan kardeşlerim ve yengelerime çok teşekkür ederim. Ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesi için destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Çelebi M. Timokinonun endoplazmik retikulum (ER) stresi etkisinin *in vitro* olarak araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. *Nigella sativa* 'nın aktif bileşeni olan timokinon (TQ), antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri başta olmak üzere pek çok yararlı etkiye sahiptir. Endoplazmik retikulum stresi (ER stresi), protein katlama kapasitesi ve işlenen protein yükü arasındaki dengenin, proteinlerin yanlış katlanmaya veya katlanmaması sonucunda meydana gelir. Bu tez çalışması, TQ'un yararlı ve toksik dozlarda, normal böbrek hücreleri üzerindeki etkisinin zamana göre farklılığının *in vitro* olarak araştırılması amacıyla planlandı. Bu amaçla, ER stresinde önemli olan genlerin (BiP, XBP1, CHOP, PERK, IRE1, ATF6, ATF4) ekspresyonu araştırıldı. TQ'un proliferatif ve IC₅₀ değeri, NRK-52E (renal epiteliyal) hücre hattında MTT ile belirlendi. Hücre numuneleri, hücrelerin proliferatif ve IC₅₀ değerlerine göre hazırlanan örneklerden 24 ve 48. saat sonra alındı. ER stres genlerinin ekspresyonu değerlendirildi. TQ kaynaklı ER stresinde zamana ve doza bağlı olarak önemli değişiklikler tespit edildi. Proliferatif dozda 24 saatte CHOP ve XBP1, 48. Saatte ise BiP hariç bütün genlerin ekspresyonu arttı. IC₅₀ dozunda ise 24. Saatte CHOP ve XBP1, 48. Saatte ise CHOP ve ATF4 genlerinin ekspresyonu arttı. Sonuç olarak, ER stres genlerinin ekspresyonunun özellikle proliferatif dozda zamanla arttığı göz önüne alınarak, TQ'un sağlıklı böbrek hücreleri üzerinde zaman ve dozlara bağlı olarak değişen etkileri olabileceği, bu etkinin mekanizmasının daha ileri çalışmalarda araştırılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, Endoplazmik Retikulum Stresi, böbrek, *in vitro*

ABSTRACT

Çelebi M. In vitro evaluation of the effect of thymoquinone on endoplasmic reticulum stress. Van Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry (Veterinary), M.Sc. Thesis, Van, 2021. Thymoquinone (TQ), the active ingredient of *Nigella sativa*, has many beneficial effects, especially its antioxidant and anti-inflammatory properties. Endoplasmic reticulum stress (ER stress) occurs when the balance between protein folding capacity and processed protein load results in an accumulation of incorrectly folded or unfolded protein. This thesis was planned to investigate the effect of proliferative and toxic TQ concentrations, on ER stress of normal kidney cells, depends on time. For this purpose, the expression of genes important in ER stress (BiP, XBP1, CHOP, PERK, IRE1, ATF6, ATF4) was investigated. Proliferative and IC50 value of TQ was determined by MTT, in NRK-52E (renal epithelial) cell line. Cell samples were taken 24 and 48 hours after the samples prepared according to the proliferative and IC50 values of the cells. Expression of ER stress genes was evaluated. Significant changes were detected in TQ-induced ER stress depending on time and dose. At proliferative concentration, 24 th hour. CHOP and XBP1 up-regulated, 48th hour all of genes expressions also increased, except BiP. At the IC50 dose, expression of CHOP and XBP1 genes increased at 24th hour and CHOP and ATF4 genes increased at 48th hour. As a result, considering that the expression of ER stress genes increases with time, especially at proliferative dose, it can be say that TQ may have varying effects on healthy kidney cells depending on time and doses. It is important to investigate the mechanism of this effects for further detailed studies.

Keywords: Thymoquinone, Endoplasmic Reticulum Stress, Kidney, *in vitro*

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XII
TABLolar LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Timokinon.....	2
2.1.1. Bulunuşu.....	2
2.1.2. Kimyasal yapısı.....	3
2.1.3. Timokinonun farmakolojik özellikleri.....	4
2.1.4. TQ'un Klinik olarak önemi.....	5
2.1.5. Timokinonun koruyucu ve tedavi edici özellikler.....	8
2.1.6. TQ'un toksik özelliği.....	10
2.2. Endoplazmik Retikulum (ER)	11
2.2.1. ER özellikleri ve görevler.....	12
2.2.2. ER çeşitleri.....	12
2.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi (ER stresi)	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Çalışma materyali.....	20
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	21
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Hücre kültürü.....	22
3.2.2. Analiz gruplarının hazırlanması.....	22
3.2.3. Çalışma protokolü.....	23
3.2.4. Sitotoksosite (MTT hücre canlılık) testi.....	24
3.2.5. RNA ekstraksiyonu.....	24

3.2.6. cDNA (komplemanter DNA) sentezi.....	25
3.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR).....	25
3.2.8. Veri analizi.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. MTT sonuçları.....	27
4.2. Gen ekspresyonu sonuçları.....	27
4.3. Gerçek zamanlı-qPCR sonuçları	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57
EKLER.....	58
Ek 1. Etik Kurul Raporu.....	58
Ek 2. Tez Orjinallik Raporu.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

μM	: Mikro molar
7,8-DHF	: 7,8-dihidroksiflavonun
AKI	: Akut böbrek hasarı
ALT	: Alanin aminotransferaz
ATF4	: Etkinleştirilmiş transkripsiyon faktör 4
ATF6	: Etkinleştirilmiş transkripsiyon faktör 6
BİP	: İmmüoglobulin içeren ağır zincir bağlayıcı protein
BUN	: Kan üre azotu
cDNA	: Komplemanter DNA
CHOP	: C/EBP-homolog protein
COX	: Siklooksijenaz
CP	: Cisplatin
CPK	: Kreatin kinaz
CRO	: Crocin
CT	: Eşik Döngü Değeri
DER	: Düz Endoplazmik retikulum
DMEM	: Dulbecco' Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGCG	: Epigallocatechin 3 gallate
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik retikulum ile ilişkili protein yıkımı
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
G	: Gram
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GER	: Granullü Endoplazmik retikulum
HbA1c	: Glikozillenmiş hemoglobin
IDDM	: İnsülin bağımlı diabetes mellitus
IL6	: Interleukin-6

IP	: İnteraperitoneal
IRE1	: İnositol gerektiren enzim
IRI	: Renal iskemi-reperfüzyon hasarı
IsoLQ	: Isoliquiritigenin
KBH	: Kronik böbrek hastalığı
LD₅₀	: Öldürücü doz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LO	: Lipooksijenaz
Mg	: Miligram
NO	: Nitrik oksit
NSO	: Nigella sativa oil
OA	: Oxonic acid
PBS	: Fosfat buffer solüsyon
PERK	: PKR benzeri ER kinazı
QUER	: Quercetin
ROS	: Reaktif Oksijen Türevler
Rpm	: Dakika başına dönüş
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
shRNA	: Small hairpin RNA
STZ	: Streptozotosin
TNF-α	: Tümör nekros faktörü alfa
TQ	: Timokinon
TQ_{1c}	: Timokinon IC ₅₀ konsantrasyon
TQ_p	: Timokinon proliferatif konsantrasyon
μM	: Mikro metre (Mikron)
UPR	: Unfolded protein response
XBP1	: X-box bağlayıcı protein 1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	<i>Nigella sativa</i> 'nın temel bileşenleri.....	2
Şekil 2.	TQ'un kimyasal yapısı.....	3
Şekil 3.	<i>Nigella sativa</i> bitkisi (a), çiçeği (b) tohumu (c); tohumların biyoaktif bileşenin kimyasal bileşeni TQ (d)	4
Şekil 4.	Timokinonun etki ettiği farklı mekanizmalar.....	5
Şekil 5.	GER ve DER'in yapısal ilişkisi.....	12
Şekil 6.	Granüllü endoplazmik retikulum.....	13
Şekil 7.	UPR Yolakları.....	16
Şekil 8.	ER stres.....	17
Şekil 9.	ER Stresinin patogeneze aracılık ettiği hastalıklar.....	19
Şekil 10.	MTT sonuçları (24. Saat, 48. Saat) grafiği.....	27
Şekil 11.	MTT sonuçları eğrisi.....	27
Şekil 12a.	ATF4 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	28
Şekil 12b.	ATF4 geni melting curve (24 ve 48. saat).....	28
Şekil 13a.	ATF6 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	29
Şekil 13b.	ATF6 geni melting curve (24 ve 48. saat).....	29
Şekil 14a.	BİP geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	30
Şekil 14b.	BİP geni melting curve (24 ve 48. saat).....	30
Şekil 15a.	CHOP geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	31
Şekil 15b.	CHOP geni melting curve (24 ve 48. saat).....	31
Şekil 16a.	IRE1 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	32
Şekil 16b.	IRE1 geni melting curve (24 ve 48. saat).....	32
Şekil 17a.	PERK geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	33
Şekil 17b.	PERK geni melting curve (24 ve 48. saat).....	33
Şekil 18a.	XBP1 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu.....	34
Şekil 18b.	XBP1 geni melting curve (24 ve 48. saat).....	34
Şekil 19.	TQ kaynaklı ROS üretimi.....	43

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.	ER stresi ölçmek için önemli genler ve semboller.....	18
Tablo 2.	NRK-52E hücre hattının genel özellikleri.....	20
Tablo 3.	Kullanılan alet ve malzemeler listesi.....	21
Tablo 4.	Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
Tablo 5.	Invitro çalışma için uygulama planı.....	23
Tablo 6.	TQ çalışma konsantrasyonları.....	23
Tablo 7.	Kullanılan primer miktarları.....	25
Tablo 8.	Real-Time qPCR reaksiyonu koşulları.....	25
Tablo 9.	Kullanılan primer konsantrasyonu ve annealing sıcaklıkları.....	26

1. GİRİŞ

İnsan ve hayvan sağlığının korunması için kullanılan kimyasal maddelerin ve ilaçların önemli yan etkilere neden olması sebebiyle, yapılan pek çok araştırmada, hastalıkların hem tedavisinde hem de korunmasında bitkisel ürünlerin kullanımının önemi araştırılmakta ve buluna yararlı sonuçlara dayanılarak kullanımı tavsiye edilmektedir.

Timokinon (TQ), (2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon) Ranunculaceae (Düğünçeyeğigiller) familyasından çörek otu ya da siyah kimyon olarak bilinen çörek otu (*Nigella sativa*) tohumlarından elde edilen esansiyel ve sabit yağın aktif bileşenidir (Arslan ve ark., 2005; Pari ve Sankaranayanan, 2009; Cooper, 2010). Ülkemizde siyah tohum, siyah kimyon, bereket tanesi olarak da bilinen çörek otu, pek çok amaçla halk arasında kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Salem, 2005; Ijaz ve ark., 2017).

Nigella sativa (çörek otu), Uzakdođu ve Ortadoğu ülkelerinde 2000 yıldan fazla zamandır birçok hastalığın tedavisinde kullanılan doğal bitkisel ilaçlar grubunda bulunan şifalı bir bitki olup tıbbi alanda kullanımının yanı sıra gıda üretiminde bazı gıdaların formülasyonlarında özellikle de unlu gıdalarda kullanılan bir baharattır (Salem, 2005; Aggarwal ve ark., 2008).

ER stresi; ER'nin protein katlama kapasitesi ile işlenen protein yükü arasındaki dengenin yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi sonucunda meydana gelir. Enfeksiyon, ortamın sıcaklığı, oksidatif stres gibi faktörler, proteinlerin doğru katlanması üzerinde etkili olmaktadır. ER stresin pek çok hastlıkların etyolojisinde yer aldığına dair çalışmalar yapılmıştır (Hoseki ve ark, 2010; Stolz ve Wolf, 2010; Roussel ve ark., 2013).

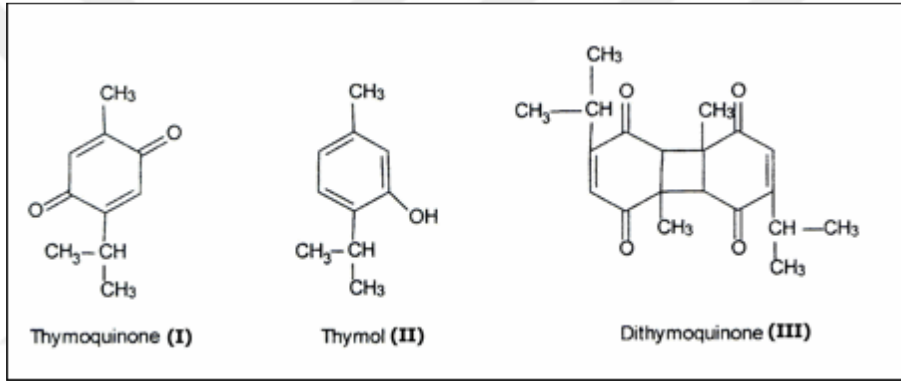
Bu tez çalışması, pek çok yararlı etkileri olduğu bilinen TQ'un yararlı ve toksik dozlarda, normal böbrek hücreleri üzerindeki etkisinin zamana göre farklılığının *in vitro* olarak araştırılması amacıyla planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Timokinon

2.1.1.Bulunuşu

TQ, ilk defa 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından yapılan bir çalışma ile izole edilmiştir. *Nigella sativa*'nın ana bileşeni TQ olmakla birlikte, timol, ditimokinon, timohidrokinon bileşiklerinin de (Şekil 1) bu bileşime eşlik ettiği yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri ile gösterilmiştir (Badary ve ark., 2003; Gali-Muhtasib ve ark., 2006; Khader ve ark., 2009).



Şekil 1. *Nigella sativa*'nın temel bileşenleri (Ragheb ve ark., 2009).

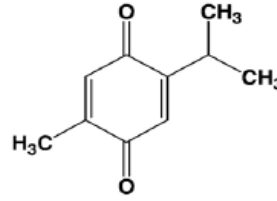
İngilizce'de siyah tohum veya kara kimyon adı verilen tohum, eski Latince'de "Panacea" olarak adlandırılır ve tüm hastalıkların tedavisi anlamına gelir. Arapça kayıtlarda, bu tohuma nimet anlamına gelen "Habbat el Baraka" terimi ile atıfta bulunulmuştur (Aggarwal ve ark., 2008; Ijaz ve ark., 2017).

Çörek otu'nun anavatanı Güney ve Doğu Avrupa, Doğu Akdeniz ülkeleridir. Türkiye'de en bilinen ve yetiştirilen tür *Nigella sativa* L. olup yaygın olarak Afyon, Isparta, Burdur ve Konya şehirlerinde üretimi yapılmaktadır (Baytop 1999; Yayla, 2014).

2.1.2.Kimyasal yapısı

Kimyasal formülü $C_{10}H_{12}O_2$ olan ve 2- izopropil-5 metil- 1,4 benzokinon yapısındaki (Şekil 2), TQ'un molekül ağırlığı 164.201 g/mol'dür. Timokinon (TQ), *Nigella sativa*'nın uçucu yağının (%54) biyoaktif bileşenidir. Uçucu bir monoterpen kinon olan TQ koyu sarı renkli kristallere sahiptir. Timokinon enol, keto ve karışım formlarından oluşur. Keto formu, TQ'un farmakolojik etkilerine dahil olan ana formdur. TQ'un ışığa duyarlılığı yüksektir ve kısa bir süre ışığa maruz kaldığında kullanılmaz hale gelir. Sulu çözeltilerde, özellikle alkalın pH'ta kararsızdır(Gali-Muhtasib ve ark., 2004; Arslan ve ark., 2005; Pari ve Sankaranarayanan, 2009; Cooper, 2010; Taborsky ve ark., 2012; Darakhshan ve ark., 2015).

Çalışmalar, çörek otu tohumlarının biyolojik aktivitesinin ağırlıklı olarak esansiyel yağ bileşenine özellikle de timokinona atfedildiğini göstermiştir (Şekil 3) (Woo ve ark., 2012).

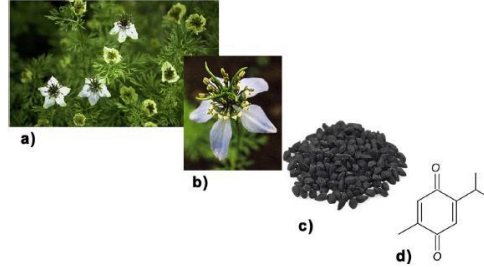


Thymoquinone (TQ)

Şekil 2. TQ'un kimyasal yapısı (Pari ve Sankaranarayanan, 2009)

Bölgenin iklimine göre farklılık göstermekle birlikte *Nigella sativa* tohumlarının kimyasal yapısında bulunan maddeleri şöyle sıralayabiliriz: uçucu yağlar (% 0.4-0.45), sabit yağlar (% 32-40), proteinler (% 16-19.9), aminoasitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler (5.5%), karbonhidratlar (% 33.9), mineraller (% 1.79-3.44), askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin, folik asit. *Nigella sativa*'nın kimyasal katımının %32-40'ını oluşturan sabit yağın yapısı; doymamış yağ asitleri (oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit, linolenik asit), doymuş yağ asitleri (miristik asit, palmitik asit, stearik asit)'nden oluşmaktadır. Uçucu yağlar ise; nigellon, karvakrol, p-cymene, d-limonen, α ve β -pinen, farmakolojik aktif bileşenler (timokinon, timohidrokinon,

ditimokinon, timol)'dir. Ayrıca alkaloidler, antosiyaninler şeklinde kimyasallar da içermektedir(Baytop, 1999; Randhawa ve Al-Ghamdi, 2002).



Şekil 3. *Nigella sativa* bitkisi (a), çiçeği (b) tohumu (c); tohumların biyoaktif bileşenin kimyasal bileşeni TQ (d) (Darakhshan ve ark., 2015)

2.1.3. Timokinonun farmakolojik özellikleri

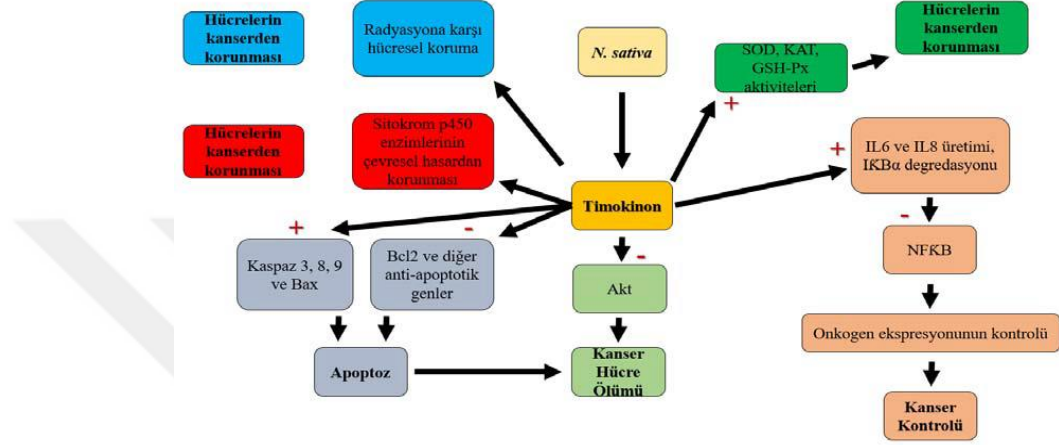
TQ, enol formu, keto formu ve karışımları içeren tautomerik formlarda bulunur. TQ'un ana formu keto formudur (%90) ve farmakolojik özelliklerinden sorumludur. TQ hidrofobik bir molekül olduğu için çözünürlüğü biyoyararlanımını etkileyebilen ve ilaç formülasyonunda sınırlamalara neden olabilecek bir sorundur (Salem,2005; Salmani ve ark., 2014).

Herhangi bir toksik veya ölümcül etki olmaksızın 10-100 mg/kg vücut ağırlığı aralığında ağızdan alınan TQ dozu uygulanan bir dizi çalışma yapılmıştır (Darakhshan ve ark., 2015). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, 50 mg/kg'dan daha yüksek TQ dozlarının fareler için öldürücü olduğu ve LD₅₀ 90,3 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Mansour ve ark., 2001).

TQ'un oral uygulamadan sonra hızlı elimine olması ve nispeten daha yavaş emilimi ağızdan alımın uygun olmadığını gösterilmiştir (Alkharfy ve ark., 2014). TQ lipofilitesi ve moleküler yapısının hacimsel olarak küçük olması sayesinde kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçer (Hosseinzadeh ve Parvardeh, 2004).TQ, intravenöz, intraperitonal ve oral yolla uygulanabilir. Deneysel çalışmalarda timokinon oral yoldan 10-100 mg/kg doz aralığında toksik etki göstermediğinden, güvenli olduğu bulunmuştur (Mansourve ark.,2002).

2.1.4. TQ'un klinik olarak önemi

Birçok bitki ve çiçekteki esans yağların bileşiminin terpen veyaterpenoidler denilen kimyasal maddelerden oluştuğu görülmektedir. TQ nun yapısı bakımından bir monoterpendir. Monoterpenlerin hücre düzeyinde enerji metabolizması üzerine etki ettikleri gösterilmiştir (Demirci ve ark., 2008).



Şekil 4. Timokinonun etki ettiği farklı mekanizmalar (Ahmad ve ark., 2013).

Nigella sativa tohumları Ortadoğu, Asya ve ülkemizde olduğu gibi astım, öksürük, bronşit, baş ağrısı, romatizma, ateş, grip, egzema, diüretik ve sarılık tedavisinde yüzyıllardır geleneksel olarak kullanılmaktadır. Pek çok hastalığa kullanılan *Nigella sativa*'nın, anti-inflamatuar, antidiyabetik, antihipertansif, antimikrobiyal, analjezik, immünomodülatör, spazmolitik, hepatoprotektif, renal koruyucu, gastroprotektif, bronkodilatör, antioksidan ve antineoplastik özelliklerinden dolayı önemli olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Şekil 4) (El-Dakhakhny ve ark., 2000; Salem, 2005; Woo ve ark., 2012; Ijaz ve ark., 2017; Khan ve ark., 2017).

Antiapoptotik

Bax ve kaspaz gibi apoptotik gen ekspresyonunu artırır. Bunun yanı sıra Bcl-2 antiapoptotik gen ekspresyonunu azaltır ve sonuçta kanserli dokularda apoptotik hücre ölümünü uyarır. TQ'un aslında kanser hücrelerinde güçlü bir apoptoz indükleyicisi olduğu, ancak diğer hücre hasarı türlerinde oksidatif stresi azaltarak antiapoptotik etki gösterdiği (Abd El-Ghany ve ark., 2009; Cecarin ve ark., 2010; Majdalawieh ve ark.,

2017), seçici proteazom inhibisyonunu indükleyerek kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir (Torres ve ark., 2010).

Antioksidan Etkisi

Serbest radikaller elektriksel olarak yüklüdür ve hücre membranından geçerek nükleik asit, protein ve enzimler ile reaksiyona girer ve yıkıma yol açarlar. TQ, farklı mekanizmalar ile antioksidan özellik göstermektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda TQ'un antioksidan etkisi ortaya konulmuştur. TQ'un çeşitli mekanizmalar ile antioksidan etki gösterdiği, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikalinin yakalayıcısı gibi davrandığı gösterilmiştir (Gündüz ve ark., 2002; Badary ve ark., 2003; Salem, 2005; Kurt ve ark., 2014; Usta ve Dede, 2017). Zubair ve ark.(2013), TQ'un düşük konsantrasyonlarda bir antioksidan ve daha yüksek konsantrasyonlarda bir prooksidan olarak işlev gördüğünü belirtmektedirler.

Anti-diyabetik etkisi

TQ'un yüksek olan serum glikoz seviyesini düşürdüğü ve hipoglisemik etkiye sahip olması nedeniyle diyabet üzerinde de etkili bir bileşen olduğu bilinmektedir. İnsülin sekresyonunu artırarak glikoz kullanımında artışa ve glikoneogenezi engelleyerek kan glikozunun düşmesine sebep olması antidiyabetik etkisinin moleküler mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Ayrıca total HbA1C düzeyini de düşürmektedir (El-Mahmoudy ve ark., 2005; Pari ve Sankaranarayanan, 2009).

Antitümoral ve antikanserojenik etkisi

Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma çörek otu tohumlarının; hem uçucu yağı hemde aktif bileşenlerinin antitümör etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Farklı kanserler üzerinde yapılan araştırmalarda, çörek otu tohumlarının uçucu yağının kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Ali ve Blunden, 2003; Salem, 2005; Abukhader, 2012). TQ, DNA yapısına müdahale yoluyla da etki eder. Kromatinde bulunan ve DNA bazlı guanin ile yakından ilişkili olan hücresel bakır hedef alır ve DNA'da oksidatif kırılmaya ve bunun sonucunda kanser hücresi ölümüne neden olur (Zubair ve ark., 2013).

TQ, özellikle seçici antioksidan aktivite göstererek, DNA yapısına müdahale ederek, kanser moleküllerinin sinyallerinin yollarını değiştirerek ve bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma yoluyla immün yanıtını değiştirerek, anti-kanser aktivite sergiler (Khan ve ark.,2017). Çörek otunun en önemli biyoaktif bileşeni olan TQ'un potansiyel bir kemoterapötik ve kemopreventif bir bileşen olduğuna adir yapılan bazı çalışmalarda, TQ'un antiproliferatif etkisiyle apoptozu uyardığı (El-Mahdy ve ark., 2005), fare modelinde TQ'un tümör büyümesini inhibe ettiği (Gali-Muhtasib ve ark., 2008) bildirilmiştir. Göğüs ve yumurtalık, kolorektal osteosarkomu, fibrosarkoma, prostat, meme, kalınbağırsak, akciğer, pankreas gibi pek çok kanser çeşidinde (Gali-Muhtasib ve ark., 2004; Roepke ve ark., 2007; Banerjee ve ark., 2009; Gali ve ark., 2017) hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Sitotoksik etkisini, hücre G1 fazında iken apoptozisi tetikleyerek (Gali-Muhtasib ve ark., 2004), hücre döngüsünü durdurma, ROS oluşumu, metastaz ve anjiyogenez baskılama, kaspazların aktivasyonu, p53, p73, PTEN, STAT3, PPAR- γ içeren moleküler yolların düzenlenmesi (Sethi ve ark., 2008; Woo ve ark., 2012) gibi etki mekanizmaları yoluyla sağladığı gösterilmiştir.

Antiinflamatuvar etkisi

TQ, kalsiyum iyonofor ile uyarılan rat peritoneal lökositlerindeki araşidonik asit metabolizmasının hem COX hem de LO yollarını inhibe etmektedir. Bu yüzden COX ve LO'nun inhibisyonu, TQ'un antiinflamatuvar etkilerini düzenleyen anahtar bir faktördür. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimini bloke ederek, tromboksan B2 ve lökotrien B4 üretimini azaltarak inflamasyona etkietmektedir. TQ, inflamasyon sitokinlerinin (IL-6, IL-10, IL-1 β , PGE2, IFN- γ , TNF- α) salınımını da azaltır. İmmün yanıtın anahtarı, NF κ B'nin bozulması kanserin oluşmasıyla korelasyon gösterir. Bu nedenle TQ, nihayetinde apoptozu yol açan anti-enflamatuvar ve anti-kanser aktivite arasında köprü oluşturmaktadır (Sethi ve ark., 2008; Umar ve ark., 2012).

Antiallerjik etkisi

TQ'un histaminik maddelerin baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı, bu etkiyi histamin ve serotonin reseptörlerini seçimsiz olarak bloke ederek gösterdiği bildirilmiştir (Kanter ve ark., 2003; Ragheb ve ark., 2009).

Antibakteriyel, antifungal, antiparaziter etkileri

TQ, özellikle bazı gram pozitif bakterilere (*Paenibacillus larvae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*) karşı olmak üzere *in vitro* ortamda antibakteriyel (Halawani,2009; Bourgou ve ark., 2010; Goel ve ark., 2018), eter ekstresinin antifungal ve antidermatofit (Aljabre ve ark., 2005) etkinliği kanıtlanmıştır. TQ muamelesinin *Fasciola gigantica* kurtçuğunun aktivitesini azalttığı, hücre zarını bozduğu, istilacıyeteneklerini de önemli ölçüde baskıladığını gösteren bir çalışmada, TQ'un helmintlerin öldürülmesinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (Ullah ve ark., 2017).

2.1.5. Timokinonun koruyucu ve tedavi edici özellikleri

TQ'un sahip olduğu özellikler sayesinde, pek çok hastalığa karşı koruyucu, tedavi edici, organ ve doku koruyucu olarak önemini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Bunun yanı sıra birçok toksisiteye karşı iyi geldiği de gösterilmiştir. Bunlar arasında hepatotoksisite, böbrek toksisitesi ve pulmoner hasar da bulunmaktadır (Mansour ve ark.,2002).

Nefroprotektif etki

TQ'un nefrotoksiteneden olan pek çok hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir. TQ'un antioksidan, antiproliferatif ve proapoptotik aktivitesi nedeniyle hipertansiyon ve böbrek hasarına karşı yararlı olduğu düşünülmektedir (Khattab ve Nagi,2007; Cecarini ve ark., 2010; Hosseinian ve ark., 2017; Özer ve ark 2017). Serum kreatin ve BUN düzeyleri ile de bu düşünce desteklenmektedir (Faisal ve ark., 2015). TQ'un idrarda oksalatı azaltması ve serum kalsiyum düzeylerini belirgin olarak yükseltmesi nedeniyle düşük dozda böbrek taşlarının tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Hadjzadeh ve ark., 2008).

Böbrek hasarına yol açtığı bilinen sisplatin uygulamasından önce ve sonra TQ içeren *Nigella sativa* uygulamasının artan serum kreatinin, kan üre azotu (BUN) seviyelerindeki böbrek hasarına bağlı olan artışı azalttığı, histopatolojik bulgulara göre de böbrek hasarını belirgin derecede önlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Farooqui ve ark., 2017; Ulu ve ark., 2017). Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresi ve mitokondri kaynaklı apoptozu da önlediği gösterilmiştir (Woo ve ark., 2012).

Karaciğeri koruyucu etkisi

Pek çok nedenden kaynaklanan hepatotoksisiteye karşı TQ'un koruyucu etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu etkinliğin daha ziyade TQ'un antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mansour, 2000; Alsaif, 2007).

Sinir sistemine etkisi

TQ'un nöroprotektif bir bileşik olduğu bildirilmektedir. Beyin iskemisi/reperfüzyon, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ve travmatik beyin hasarı modellerinde gösterilen nöroprotektif etki dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesi sergiler. TQ'un nöroprotektif etkisi, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, proinflamatuvar sitokinlerin aşağı regülasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin korunması ve kaspaz-3, -8 ve -9'un inhibisyonu yoluyla apoptozun önlenmesi yoluyla aracılık edilir. Timokinon bazlı mitokondri hedefli antioksidanlar, mitokondride birikir ve nanomolar konsantrasyonlarda nöroprotektif özellikler gösterir (Al-Majed ve ark., 2006; Farkhondeh ve ark., 2018; Tsai ve ark., 2018; Isaev ve ark., 2020).

Solunum sistemine etkisi

TQ'un antiinflamatuvar olarak akciğer dokularında allerjenin indüklediği eozinofilik inflamasyonu ve kadeh hücrelerinden mukus üretimini belirgin olarak inhibe ettiğine, akut solunum sıkıntısı sendromunda akciğer dokusunu koruduğuna ve oksijenasyonu iyileştirdiğine dair çalışmalar yapılmıştır (Işık ve ark., 2005; El Gazzar ve ark., 2006).

Dolaşım sistemine etkisi

TQ, ratlarda doza bağılı olarak arteryal kan basıncını ve kalp atışını azaltmaktadır. Akrep ve yılan sokmalarında TQ'un zehirlenmeden kaynaklı hemolitik etkiyi önlediği, eritrositleri lipid peroksidasyonundan, H₂O₂'in sebep olduğu artan ozmotik kırılmalardan koruduğu gösterilmiştir (Salem, 2005). TQ, koruyucu etkisi ile fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt yolağına aracılık ederek kardiyovasküler fonksiyonu iyileştirir ve oksidatif stresi, enflamasyonu ve apoptozu hafifletir (Liu ve ark., 2016).

Sindirim sistemine etkisi

TQ'ungastroprotektif etkisi, mide mukozasındaki redoksun korunması, proton pompasının asit sekresyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek, müköz salgılanmasını ve nitrik oksit üretimini artırarak gösterilmektedir (Magdy ve ark., 2012; Shakeri ve ark., 2016).

İmmün sisteme etkisi

TQ, 'un T hücrelerine ve immün yanıtı aracılık eden öldürücü hücrelerin artışı sağlayarak, makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini azaltarak, fagositik aktivite, kemokinezi, kemotaksisi, immünoglobulin seviyelerini ve antikorların hemaglutinasyonunu artırarak immünolojik olarak yararlı etkiler gösterdiğine dair çalışmalar mevcuttur (El-Mahmoudy ve ark., 2002; Salem, 2005; Mohany ve ark., 2012).

2.1.6. TQ'un toksik özelliğı

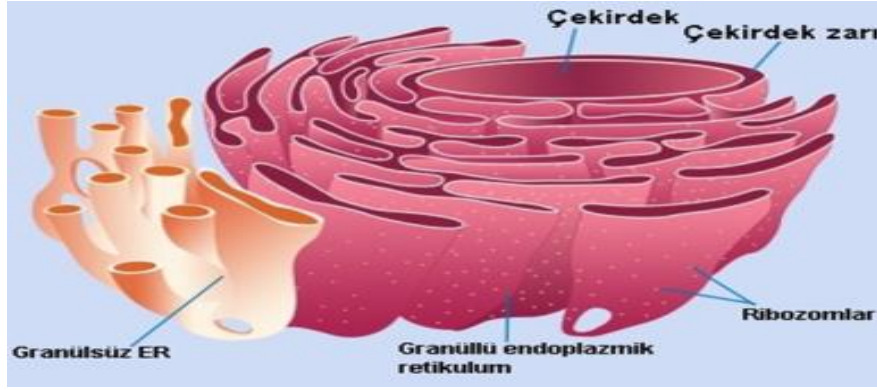
Genelde TQ'un yararları üzerine çalışmalar yapılmakla birlikte, normal dokularda doza bağılı olarak toksikasyon riskinin arttığı (Kurt ve ark., 2014) gösterilmiştir. Bununla birlikte özellikle kanserli doku ve hücrelerde TQ'un toksik etkisi beklenen bir durumdur. TQ (2 ve 3 g/kg) verildikten 24 saat sonra karaciğer, böbrek ve kalp dokularında GSH düzeyinin azaldığı, plazma üre ve kreatin konsantrasyonları, ALT, LDH ve CPK enzim aktiviteleri önemli ölçüde arttığını bildiren bir çalışma mevcuttur (Badary ve ark., 2003). Bu çalışmaya göre, TQ'un akut oral toksisitesinin düşük seviyelerde olduğu, ancak 8 mg/kg i.p verildiğinde toksik olduğu bulunmuştur. Çok düşük derecede toksisite ile karakterize olduğu ve karaciğer veya böbrek fonksiyonları üzerinde önemli olumsuz

etkilere neden olmadığı gösterilmiştir (Ali ve Blunden, 2003). TQ, konsantrasyona bağlı olarak sıçan splenositleri ve Th1/Th2 sitokinleri üzerinde sitotoksik inhibitör etki göstermiştir (Gholamnezhad ve ark., 2015).

TQ'un oral olarak uygulanması oldukça güvenli bir bileşik olduğu bildirilmektedir (Al-Ali ve ark., 2008; Abukhader, 2012). TQ, geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sergiler. TQ'un nörotoksik etkisi ile ilgili çoğu çalışma, kanser hücre dizilerinde gerçekleştirilmiştir. Burada, *in vitro* olarak birincil nöron kültürlerinde TQ'un toksik etkisini belirlemek için 24 saat boyunca 0.04-0.05 mM TQ ile inkübasyon, kültürlenmiş serebellar granül nöronlarının (CGN'ler) doza bağımlı bir şekilde ölümüne neden olduğu görülmüştür. TQ'un normal nöronlar için toksik olduğunu gösterirken, mitokondride ROS ile indüklenen değişiklikler TQ ile indüklenen nöronal hasarın ve ölümün ana nedenlerinden biri olabileceği düşünülmüştür (Stelmashook ve ark., 2020).

2.2. Endoplazmik Retikulum (ER)

Endoplazmik retikulum (ER), hücrelerin sitoplazmasında yer alan dantel benzeri bir ağ sistemi olarak yer almaktadır. Bu sistemin içeriği; vezikül, sisterna ve borucuklardan meydana gelmektedir. Hücreler arasında protein gibi maddelerin alışverişini sağlarken, bazı bölgelerinde de madde üretimi gerçekleştirir. ER iç ve dış zarı, hücre çekirdeğinin iç ve dış zarına bağlantılı bir haldedir. Her hücrede bulunan ER yapısı ve sayısı aynı değildir. Zarla çevrili lümen kısmı mevcuttur. Çekirdek oluşumuna katılmaktadır (Ron ve Walter, 2007; Almanza ve ark., 2019; Tatar ve Tatar, 2019). (Şekil 5).



Şekil 5. GER ve DER'in yapısal ilişkisi (Iurlaro ve Munoz-Pinedo, 2016).

2.2.1. ER özelliklerine görevleri

ER hücredeki en büyük ve yaygın organeldir. Alyuvarlar hariç bütün ökaryot hücrelerde bulunur. ER sisteminde, kanallarda iletim işlemleri sisternada ise depolanma işlemleri olur. Madde taşınırken hücre bölünmesi sırasında erir ve kaybolurlar. Ribozomlardan sentezlenen proteinleri diğer organlara dağıtmakla görevlidir. Protein sentezi ve taşınması, Ca depolama, Cakonsantrasyonunun düzenlenmesi, lipit– steroid sentezi ve karbonhidrat metabolizması, glukoneogenez, lipit metabolizması, otofagozom ve peroksizom sentezi gibi birçok süreçte aktif olarak görev almaktadır (Jan ve ark., 2014; Reid ve Nicchitta, 2015; Schwarz ve Blower, 2016; Almanza ve ark., 2019; Tatar ve Tatar, 2019).

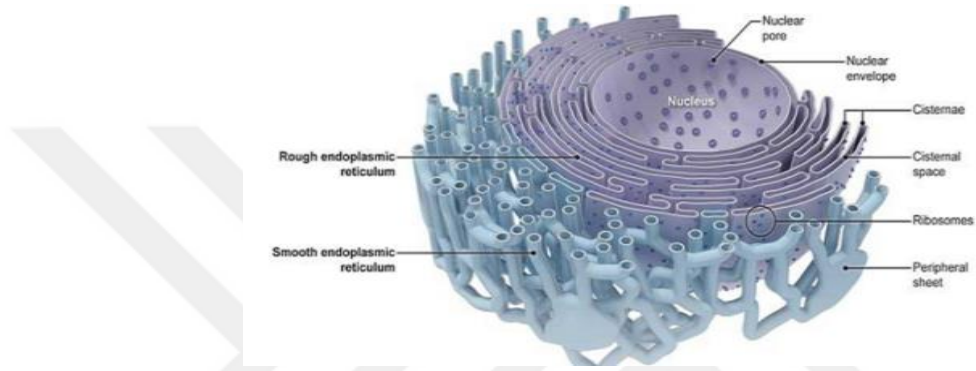
ER, bu görevlerinin yanı sıra, ökaryotik hücrelerde proteinlerin sentezi, katlanması, olgunlaştırılması ve transportunun gerçekleştiği en önemli organeldir. Hücrede salgılanan veya membran yapısına katılan proteinler gibi kompleks yapıli proteinler ER'de katlanırken, daha basit yapıli proteinler sitoplazmada katlanır (Buck ve ark., 2007; Malhotra ve ark., 2007; Cnop ve ark., 2012).

2.2.2. ER çeşitleri

ER yapısında ribozom bulunmasına göre; granüllü (ribozomlu) endoplazmik retikulum ve granülsüz (ribozomsuz) endoplazmik retikulum olarak ayrılır.

Granüllü endoplazmik retikulum

Granül (tanecik)tabiri ile ribozomlar kast edilmektedir. Ribozomlarda sentezlenen proteinler golgi cisimciği kısmına aktarılır. ER’de proteinlerin düzgün katlanmasına yardım eden moleküler (*şaperonlar*) bulunmaktadır. Proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olurlar. ER, protein katlanmasında hata olup olmadığını tespit ve hatalı katlama olduysa düzeltilmesi amacıyla yıkıma gönderilmesi ile görevlidir(Buck ve ark., 2007; Albert ve ark., 2008; Hoseki ve ark, 2010; Stolz ve Wolf, 2010).(Şekil 6).



Şekil 6. Granüllü Endoplazmik Retikulum(Kadowaki ve Nishitoh 2013)

Granülsüz endoplazmik retikulum

Ribozom taşımayan granülsüz ER, lipid sentezi yapan hücrelerde bulunmaktadır. Kurye görevi görerek, maddeleri ulaşmaları gereken noktalara iletirler. Karaciğerde metabolizma reaksiyonlarında görev alırlar. Kas hücreleri içinde kalsiyum depolanması, steroid hormonsentezi, fosfolipid sentezi, lipid taşınmasında rolü vardır(Clapham, 2007; Ron ve Walter, 2007).

2.2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi (ER stresi)

Proteinlerin hücre içindeki görevlerini yerine getirebilmesi için fonksiyonel olarak aktif olması ve üç boyutlu yapılara katlanması gerekir. Yeni sentezlenen proteinlerin düzgün katlanmasına engel olan etkenler ile anormal katlanmalar olabilir. Bu tehlikelere karşı korunmak için hücrelerde bir moleküler şaperon ağı mevcuttur (Hartl ve ark., 2011; Tatar ve Tatar, 2019).

ER stresi; ER'nin protein katlama kapasitesi ile işlenen protein yükü arasındaki dengenin, yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimine neden olması ile gerçekleşir. Burada katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerde oluşan artış ve birikim, ER homeostazında değişikliklere neden olur. Enfeksiyon, ortamın sıcaklığı, oksidatif stres gibi faktörleri, proteinlerin doğru katlanması üzerinde etkili olmaktadır. Hücrede ciddi zararlara yol açan yanlış katlanan protein birikimi olarak bilinen ER stres; nörodegeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar, ateroskleoz, obezite, diabetes mellitus, kanser, diyabet, Alzheimer gibi ciddi hastalıklara yol açmakta ve bu hastalıklard artmakta olduğuna dair pek çok çalışma yapılmıştır (Buck ve ark., 2007; Albert ve ark., 2008; Hoseki ve ark, 2010; Stolz ve Wolf, 2010; Roussel ve ark., 2013).

ER stres nedenleri

ER homeostaz değişikliklerine karşı oldukça duyarlı bir organeldir. ER stres çeşitli faktörlerle tekiyebildiği gösterilmiş ve hücrenin homeostazının korunmasından sorumlu olduğu bulunmuştur. Yanlış katlanan ya da çözünürlüğü bozularak agregre olan proteinler, hücre için potansiyel toksik moleküller haline gelirler. Bu nedenle katlanan proteinler, ER'da bulunan kalite kontrol mekanizmaları ile sürekli, sıkı bir şekilde kontrol edilmektedirler. ER homeostazını engelleyen başlıca nedenler; hipoksi, açlık, asidoz, redoks dengesizliği, kalsiyum homeostazı kaybı, ilaçlar ve diğer bileşikler olarak sayılabilir. Bunun sonucunda doğru protein katlanma kapasitesi azalmaktadır (Buck ve ark., 2007; Malhotra ve ark., 2007; Kincaid ve ark., 2007; Brodsky ve Skach, 2011; Naidoo, 2011; Tatar ve Tatar, 2019).

ER stresin başlıca nedenleri arasında; metabolit bozukluk, hipoksi, besinsel açlık, asidoz, kanser, viral enfeksiyonlar, hücresel stres, ilaçlar veya diğer bileşikler, hücre içi Ca^{+2} miktarının değişmesi, glukozun azalması, oksidatif stres, enerji yoksunluğu, inflamasyon, ısı şoku gibi çeşitli faktörler önemli yer almaktadır. Bu faktörler ER homeostazını değiştirerek, proteinlerin yanlış katlanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenlere bağlı olarak stres yanıtı tetiklenmekte ve ER ile ilişkili ER stres genler aktive olur ve sonuçta hücre ölüme gider (Buck ve ark., 2007; Malhotra ve ark., 2007; Kincaid ve ark., 2007; Naidoo, 2011; Liu ve ark., 2012; Xu ve ark., 2015; Cui ve ark., 2016; Tatar ve Tatar, 2019).

ER stres mekanizması

ER’da uzun bir sürede, şiddetli bir şekilde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler birikimine yanıt olarak, hücre ölümüne yol açan apoptotik yolların aktivasyonuna yol açan patolojik bir yanıt oluşmaktadır. Bu patolojik yanıt, karaciğer, böbrek ve nöronal defektler ile birlikte akut hastalıklarla ilişkilidir. Burada şaperonların rolü önemlidir. Şaperonlar tüm memeli hücrelerinde bulunan “protein katlanma katalizörleri” olarak bilinirler. Viral enfeksiyonlar, enerji veya besin yoksunluğu, ROS maruziyeti, zehirlenme, ani sıcaklık değişimleri gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar, protein sentezi ve katlanması işlevinde ER kapasitesini zorlayabilir. Şaperonlar, proteinlerin ara maddeler ile etkileşimini önleyerek doğru katlanmasına aracılık ederler (Buck ve ark., 2007; Hosoi ve Ozawa, 2009; Brodsky ve Skach, 2011; Tatar ve Tatar, 2019).

ER lümenindeki bu protein yanlış katlanması ROS üretimini başlatabilir. ROS, katlanan proteinlerdeki aminoasitleri oksitleyerek veya şaperonu değiştirerek ER lümeninde protein yanlış katlanmasını şiddetlendirebilir. Bu protein katlama bozukluğunu gidermek ve ER homeostazını düzenlemek için, katlanmamış protein yanıtını (UPR: unfolded protein response) harekete geçirir. Aşırı ve sürekli bir ER stres devam ederse, C/EBP-homolog protein (CHOP) ve kaspaz-12 gibi pro-apoptotik faktörler aktive olur, hücre disfonksiyonu ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Liu ve ark., 2012; Xu ve ark., 2015; Cui ve ark., 2016; Tatar ve Tatar, 2019).

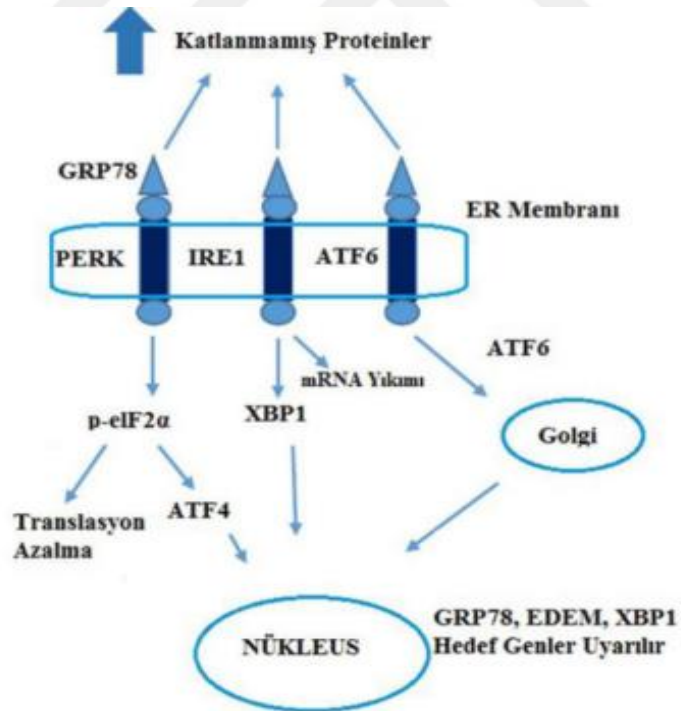
ER stresini önlemek ve ortadan kaldırmak için üç adet hücre içi mekanizma aktif hale gelmektedir:

Birinci mekanizma; protein sentezi ve proteinin ER'ye translokasyonu azaltılır ve geçici bir adaptasyon ile ER'ye giren protein yükünde azalma sağlanır.

İkinci mekanizma; hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu sayesinde gerçekleşen daha uzun süreli bir adaptasyon ile katlanmamış proteinleri engelleyen ER'nin kapasitesinde bir artış gerçekleşir ve UPR (katlanmamış protein cevabı) devreye girer.

Üçüncü mekanizma; homeostaz sağlanamadığı zaman, katlanmamış proteinlerin olduğu hücelere karşı organizmanın korunması için, hücre ölümü yanıtı oluşmaktadır (Ron ve ark., 2007; Tatar ve Tatar, 2019). (Şekil 7).

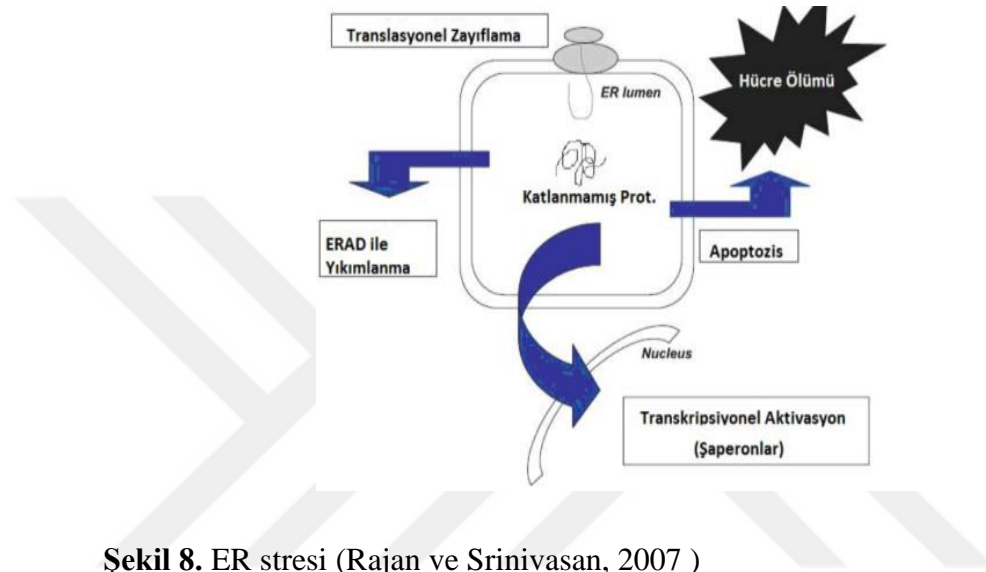
UPR yolağı etkili olursa ER stres esnasında da protein sentezi devam eder, hücrel hemeostaz düzenlenir. ER stres devam eder ve UPR ile baş edemezse, hücrede oksidatif stres ve apoptoz yolları aktive olur. UPR, yüksekprotein sentezi oranına sahip hücelerde normal fizyolojik fonksiyon için önemlidir: bu, hataya açık bir süreçtir ve ER ile ilişkili kalite kontrol sistemleri, yanlış katlanmış proteinlerin doğru konformasyonlarını elde etmelerine izin verir. UPR'nin aktivasyonu ER işlevini sürdürür, stresten kurtulmayı kolaylaştırır ve adaptif UPR gibi ek streslere karşı koruyucu olabilir (Araki ve Nagata 2011; Brodsky ve ark., 2011; Wang ve ark., 2014; Shore ve ark., 2011; İnagi ve ark., 2014; Tatar ve Tatar, 2019).



Şekil 7. UPR Yolakları (Tatar ve Tatar, 2019).

ER stresüç proteinin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bunlar; a) PKR benzeri ER kinazı (PERK), b) aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve c) inositol gerektiren enzim

(IRE1). ER stresiyle indüklenen ATF6, PERK ve IRE1 sinyal yolları hücrelerin sağkalımını sağlayan yolları başlatmanın yanında, ER stresinin kronik olarak uzadığı durumda hücresel fonksiyon bozukluğunun gerçekleşmesiyle apoptozis yollarında indüklenmesini de sağlamaktadırlar (Marciniak ve ark., 2006; Naidoo, 2009; Brodsky ve Skach, 2011; Sarvani ve ark., 2017;).



Şekil 8. ER stresi (Rajan ve Srinivasan, 2007)

Oksidatif stres ER stresine neden olan ana faktörlerden biridir. Reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondride solunum zincirinde endojenik olarak üretilir. UPR'nın önemli proteinleri olan PERK ve ATF6, IRE1 α ekspresyonları pek çok farklı tümörlerde artmıştır (Hasnain ve ark., 2016; Walczak ve ark., 2019). IRE1 α , PERK ve ATF6. IRE1 yolunun aktivasyonu, GRP78 ve GRP94 dahil bir grup UPR geninin transkripsiyonunu kontrol eden XBP-1'in alışılmadık eklenmesine yol açar. IRE1 ve TRAF2'nin etkileşimi, hayatta kalma genlerini yukarı regüle eden NF- κ B aktivasyonuna yol açar. IRE1 ve diğer UPR yolları tarafından başlatılan sinyalleşme ve transkripsiyon programları, ER homeostazı sağlar. IRE1 ve TRAF2'nin sürekli etkileşimi, inflamatuvar sitokin üretimini ve apoptozu teşvik eden NF- κ B ve JNK aktivasyonuna yol açar. IRE1 aynı zamanda ER stres kaynaklı iltihaplanma aktivasyonunda ve IL-1 β üretiminde rol oynar, bu da IL-6 ve IL-8 gibi diğer inflamatuvar sitokinleri indükler. Ek olarak TRAF6, TLR aracılı optimal inflamatuvar sitokin üretimi için gerekli olan IRE1 ubiquitinasyonuna aracılık edebilir (Guo ve Li, 2014). (Şekil 8).

ER stresi için önemli genler

ER stresinin meydana gelmesi sırasında önemli olan genler şunlardır: UPR genler, BiP(including immunoglobulin heavy chain-binding protein), XBP1(X-box binding protein 1), CHOP(C/EBP [CCAAT/enhancer-binding protein]-homologous protein, IRE1 (inositol-requiring 1), ATF6 (activating transcription factor 6), ATF4 (activating transcription factor 4)(Ron ve Walter, 2007; Tatar ve Tatar, 2019).(Tablo 1).

Tablo 1. ER stresi ölçmek için önemli genler ve sembolleri

ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
BiP	Including immunoglobulin heavy chain-binding protein
CHOP	C/EBP [CCAAT/enhancer-binding protein]-homologous protein
IRE1	Inositol-requiring 1
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
XBP1	X-box binding protein 1

PERK yolağı

ER membranında PERK oligomerinin oluşması, PERK ökaryotik başlatma faktörünü (2α (eIF2 α /eukaryotic initiation factor 2 α))'yı fosforile ederek inaktive olmasına yol açar. Bu durum ER'de mRNA transkripsiyonunun durmasına ve protein yükünün azalmasına yol açar. ATF6 ise; ER stresi ile karşılaşıncı posttranskripsiyonel modifikasyona uğrar (Tatar ve Tatar, 2019).

ER stres önlenmesi

Hücre içerisinde ER stresinin engellenmesi amacıyla stres sonucu oluşmuş, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin sitoplazmada proteozomlar tarafından yıkılması mekanizmasına ER ilişkili bozulma (ERAD/Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) denir.Eğer ERAD mekanizması, ER stresi düzeltmiyorsa, ER homeostazisi için UPR yolağı aktif hale gelmelidir (Kincaid ve ark., 2007; Brodsky ve Skach, 2011; Tatar ve Tatar, 2019).

ER stres sonuçları

Katlanmamış protein tepkisi ve ER stres, pek çok hastalıkların patogenezinde rol aldığına dair çalışmalar vardır. Bu hastalıklara, yapısal veya katlanma hastalıkları da denilmektedir ve UPR ile ilişkili bulunmaktadırlar. Bunların arasında çeşitli böbrek hastalıkları da yer alır Glomerülonefrit, glomerulopatiler, diyabetik nefropati, akut böbrek hasarı, kronik böbrek hastalığı (KBH) ve böbrek fibrozu bu hastalıklardan bazılarıdır. Aşırı ER stresinin neden olduğu apoptoz, iskemik akut böbrek hasarına önemli bir katkı sağlar. Bu nedenle, böbrek hasarlarının önlenmesinde tedavi strateji geliştirmeye yardımcı olmak için farmakolojik ajanlar ile ER stresinin azaltılmasına dair terapötik yaklaşımlar araştırılmıştır (Ohse ve ark., 2006; Cao ve ark., 2012; Cunard, 2015; Xu ve ark., 2015). (Şekil 9).

ER stres; nörodejeneratif hastalıklarla, obezite, inflamasyon ile ilişkili mekanizmalar dolayısıyla birçok yakından ilgilidir. Kanser hücreleri hem intrinsik hem de ekstrinsik faktörler nedeniyle ER stresine maruz kalırlar (Wang ve ark., 2014; Ozcan ve ark., 2012; Giampietri ve ark., 2015; Ariyasu ve ark., 2017; Tatar ve Tatar, 2019).



Şekil 9. ER Stresinin patogenezinde aracılık ettiği hastalıklar (Cao ve ark., 2012)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneysel çalışmaları, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre ve Moleküler Genetik Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.1. Gereç

Çalışmada materyal olarak, NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) sıçan böbrek epitel hücre serisi kullanıldı (Tablo 1). Kullanılan alet, malzemeler ve kimyasal maddeler Tablo 3 ve 4'te verilmiştir.

3.1.1. Çalışma materyali

Tablo 2. NRK-52E Hücre hattının genel özellikleri

NRK-52E Hücre hattının genel özellikleri	
Organizma	Sıçan
Yaş	Yeni doğan
Doku	Böbrekepitelyal
Morfoloji	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
Yüzey tutulumu	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Besiyeri	DMEM highglukoz, % 10 FBS, % 1 L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin
Besiyeri yenileme süresi	2-3 günde 1
Pasaj Metodu	%0,25 Trypsin+ %0,02 EDTA
Ayırma oranı	1.3-1:4
Katlanma süresi (İki kat)	36 saat
Biyogüvenlik düzeyi	1

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Tablo 3. Kullanılan alet ve malzemeler listesi

Kullanılan alet ve malzemeler	Marka	Model
Falkon tüpler	Spl	15, 50 ml' lik
Otomatik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
PCR tüpler	Qiagen	0,2 ml
Pipet uçları	Biologix	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Ependorf tüpler	Ependorf	(1.5 ml'lik)
Ependorf tüpler	Ependorf	(2 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Milliporedirect-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	Tts 2
Real Time PCR cihazı	QIGEN	Rotor geneQ
Nanodrop	Biodrop	Biodrop
Buzdolabı (+4 OC)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 OC)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 OC)	Sanyo	Sanyo
Flask	SPL	75, 25 cm2
Kriyoviyal tüpler	Corningincorporated	
Distile su cihazı	Merck	Milliporedirect-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafetycabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	CCL-170B-8
İnverted (ters) mikroskop	Nikon	Eclipse ts100
Thoma lamı	Marienfeld	0,0025mm2'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100
ELISA cihazı	Anthos-Zenyth	200 rt
Kültür plakları	Costar 96'lık	3599
Mikrofüj	MRC	ECEN-6
Spektrofotometre	BOECO	S-22
Mikrodalga Fırın	Arzum	AR257
Güç Kaynağı	Cleavernano	PAC-300

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Kimyasal madde	Marka	Katalog no
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Applichempanreac	A3672,0250
FBS	Capricorn scientific	FBS-12B
L-Glutamin	Capricorn scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Tripsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn scientific	TRY-1B
RPMI 1640	Capricornscientific	RPMI-XA
% 0,7'lik agaroz	0,7 gr agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 5 µlredgel karıştırıldı	
Redgel	İnvitrogen	15585-011
Trizolreagent	Thermo-Scientific	1029608
PBS	Sigma	P4417-50TAB
Kloroform	Sigma	242162, 5L
İzopropil alkol	Merck	109634
Etil alkol (%75,soğuk)	Merck	100986.2500
Master mix	Wizbio	W1711R-5

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Hücre kültürü ünitemizden temin edilen NRK-52E hücreleri in vitro koşullarda düzenli pasajları yapılarak (%10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri ortamında, %5CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, 37°C inkübasyon) çoğaltıldı.

3.2.2. Analiz gruplarının hazırlanması

Çalışmada gruptaki hücelere uygulanacak maddeler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. *In vitro* çalışma için uygulama planı

	Gruplar	Uygulama
1	Kontrol (K)	Hücre besiyeri
2	TQp	(proliferatif konsantrasyon: 10 μ M)
3	TQ _{IC}	(IC ₅₀ konsantrasyon: 60 μ M)

Çalışmanın ilk aşamasında NRK-52E hücre hattında farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde timokinon inkübasyonu ile timokinona bağlı sitotoksite oluşturulması amaçlandı. MTT hücre canlılık testi yapılarak timokinon 24. ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değeri belirlendi. Çalışmada uygulanacak uygun dozları ve çözünme ortamlarını belirlemek için stok solüsyonlar hazırlandı. Böbrek hücre hattında timokinon ana stok konsantrasyonu DMSO da çözüldü final konsantrasyonları 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 70 μ M, 80 μ M, 90 μ M, 100 μ M konsantrasyonlarda hücre medyumunda hazırlandı. Timokinon inkübasyon periyotları 24 ve 48 saat olarak planlanmıştır. Yine MTT hücre canlılık testi yapılarak proliferasyonun belirlenmesi için timokinon kontrol grubuna göre proliferatif konsantrasyon değeri belirlendi. MTT için 7000 hücre olacak şekilde ekildi. Çalışma grupları için flask başına 750000 hücre ekildi. Kontrol ve deneme grupları ve bu gruplar arasında çaprazlama olarak, çalışma grupları hazırlandı.

Tablo 6. TQ çalışma konsantrasyonları

	24. saat	48. saat
TQp (μ M)	10	10
TQ _{IC} (μ M)	60	60

3.2.3. Çalışma protokolü

1. Sitotoksite testi (MTT: hücre canlılık)
2. RNA izolasyonu
3. cDNA sentezi
4. RT-qPCR uygulamaları

3.2.4. Sitotoksisite (MTT hücre canlılık) Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler 96 kuyucuklu kültür plate'lerinin her bir kuyucuğuna renal hücreler için 7.000 hücre ekildi. Hücreler 24 saat, 37°C ve CO₂'li inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında, hücrelerin üzerindeki besi yeri alınarak farklı dozlarda ve hücre besi yeri kullanılarak hazırlanan timokinoneklendi. Her bir doz için en az 4 kuyucuk kullanıldı. Kuyucuk başına 100 µl medyum ortamında olmak üzere, farklı dozlarda maddeler eklendi ve 24,48 saat sonra her bir kuyucuğa içinde 10 µl MTT solüsyonu olan 100 µl hücre medyumları ilave edildi ve 3 saat 37°C'de CO₂inkübatöründe bekletildi. Her bir kuyucuğa 100 µl MTT liziz solüsyonu eklendi. Daha sonra, hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen absorbans değerlerine göre timokinon IC50 ve proliferasyon dozları belirlendi. Hücre canlılık yüzdesi belirlenirken kontrol grubu absorbansı yalnızca MTT çözücü solüsyon içeren hücre ekimi yapılmamış kuyucukların absorbansı çıkarıldı ve kontrol grubunun canlılığı %100 olarak değerlendirildi.

3.2.5. RNA ekstraksiyonu

Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki medyum atılıp alta kalan hücre lizatı üzerine soğuk 1 ml PBS (fosfat buffer solüsyon) eklenerek hücreler iyice süspansiyon edildi. Bu karışım yeni sterilependorf bir tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu 300 xg de 5 dakika (dk) santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün üstü uzaklaştırıldı. Tüpe 1 ml soğuk trizolreagent ilave edilerek hücre homojenize edildi. 3500 rpm'de 10 dksantrifüj edildi. Üste kalan supernatant kısmı yeni ependorf tüpe aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan numunelerin üzerine her bir tüpe soğuk kloroform ilave edilerek inkübe edildikten sonra numuneler 12000x g'de 15 dksantrifüj edildi. Santrifüj aşaması sonrasında karışım üç fazlı bir yapı halini almakta üstte kalan şeffaf faz dikkatlice alınarak temiz steril bir ependorf tüpe aktarıldı ve izopropil alkol ilave edilerek iyice karıştırıldı. 12000 x g'de 10 dksantrifüj edildi.

Tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra oluşan RNA %75'lik etil alkol ile vorteksenerek yıkanır. 7500 x g'de 5 dksantrifüj edilir. Kalan pelletaminer kabinde 15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alındı. RNA 30-50 µl su ile çözüldü. cDNA aşaması yapılmak üzere hemen -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.6. cDNA (Komplemanter DNA) sentezi

Bu çalışmada BiP (including immunoglobulin heavy chain-binding protein), XBP1 (X-box binding protein 1), CHOP (C/EBP [CCAAT/enhancer-binding protein]-homologous protein), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (inositol-requiring 1), ATF6 (activating transcription factor 6), ATF4 (activating transcription factor 4) genlerinin ekspresyonu araştırıldı.

RNA elde edilen dokulardan, gerçek zamanlı-PCR'da ekspresyon analizi için kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA eldesi için Wizbio marka (WizScript, cat no: W2211) kit kullanıldı. Bu kitin önerdiği protokol kullanılarak cDNA elde edildi.

3.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

Protokol aşağıdaki tablolarda (Tablo 7, 8, 9) verildiği gibidir.

Tablo 7. Reaksiyonda kullanılan reaktif miktarları tabloda verilmiştir.

Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl
Forward Primer (10 µM)	* µl
Reverse Primer (10 µM)	* µl
cDNA Template	1 µl
RNase-Free Distilled Water	20 µl'ye tamamlandı.
TOPLAM	20 µl

Tablo 8. Real-Time qPCR Reaksiyonu koşulları tabloda verilmiştir.

Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları			
PCR adımları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95	300 sn.	1
Denatüre	95	15 sn.	40
Anneal	**	60 sn.	
Erime eğrisi	60 - 95	Continious	1

Tablo 9. Kullanılan primer konsantrasyonu ve annealing sıcaklıkları

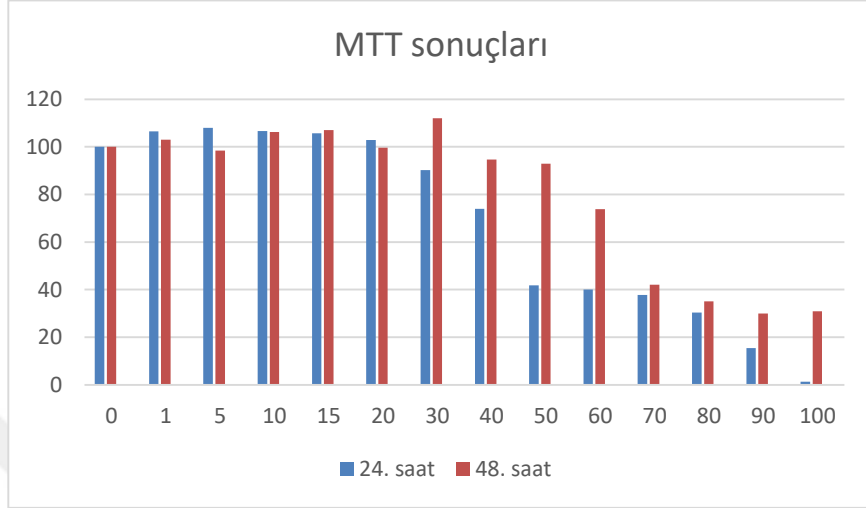
PRIMER	*Primer konsantrasyonu(uM)	** Annealing sıcaklığı °C
BIP	0.2	65
XBP1	0.05	60
CHOP	0.15	64
PERK	0.05	60
IRE1	0.1	60
ATF6	0.05	60
ATF4	0.05	60
GAPDH	0.2	67

3.2.8. Veri analizi

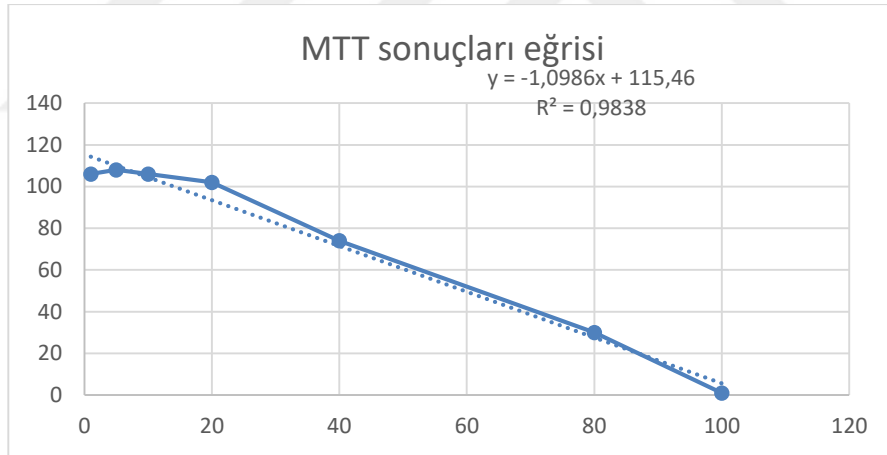
C_T değerleri bir C_T tablosu oluşturmak için bir Excel dosyasına aktarıldı. C_T değerleri, referans genlerin Manuel Seçimi Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) temel alınarak normalize edildi. Veri analizi delta delta C_T yöntemini kullanarak delta C_T 'nin hesaplandığı katlanma değişimi hesaplandı, burada delta C_T ilgili gen ve ortalama bir referans gen arasında hesaplanır ve bunu delta-delta C_T hesaplamaları (delta CT (deney) -delta CT (kontrol)) takip eder. Katlanma Değişimi daha sonra $2^{-\text{delta delta CT}}$ formülü kullanılarak hesaplanır. Veri analizi dağılım grafiğini, kümeagram ve çoklu grup grafiğini çizer. Aksi belirtilmedikçe farklar $p < 0.05$ olduğunda anlamlı kabul edilir (Yezdani et al 2016).

4. BULGULAR

4.1. MTT sonuçları



Şekil 10. MTT sonuçları (24. Saat, 48. Saat) grafiği



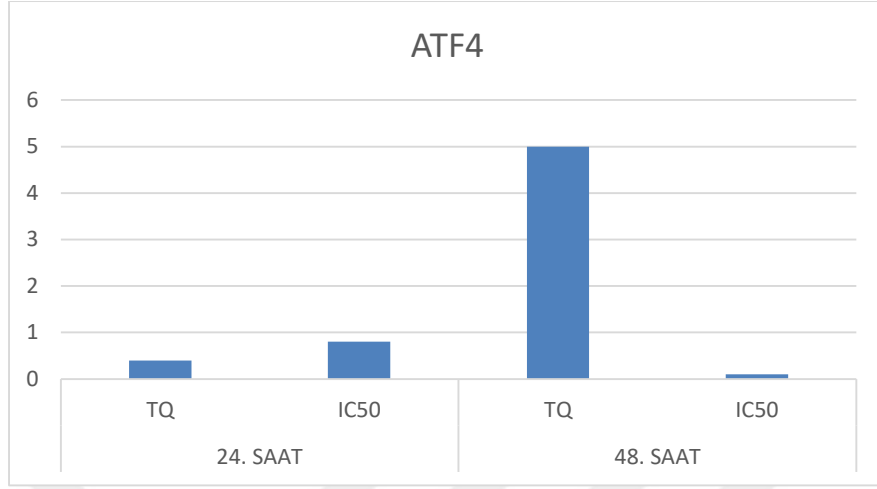
Şekil 11. MTT sonuçları eğrisi

4.2. Gen ekspresyon sonuçları

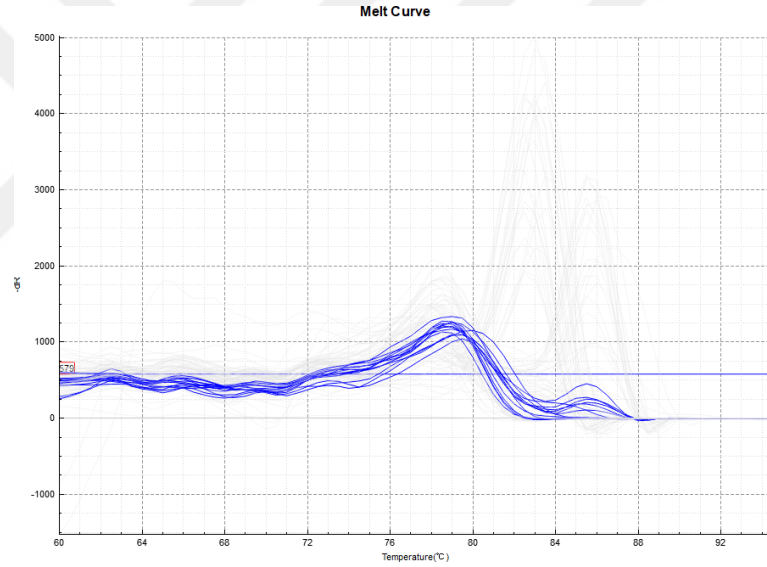
Proliferatif dozda 24 saatte CHOP, XBPI ve IRE1 artarken, diğerlerinin azaldığı görüldü. 48. Saatte ise BİP hariç bütün genlerin ekspresyonu arttı.

IC₅₀ dozunda ise 24. Saatte CHOP ve XBPI artarken, diğerleri az miktarda azaldı. 48. Saate ise CHOP ve ATF4 arttı diğerleri azaldı.

4.3. Gerçek zamanlı-qPCR sonuçları

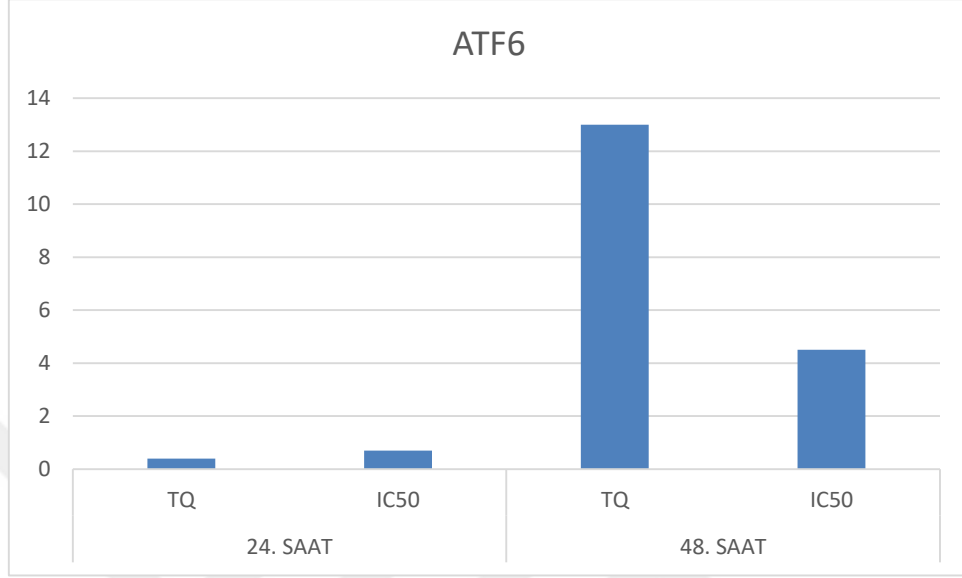


Şekil 12a. ATF4 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

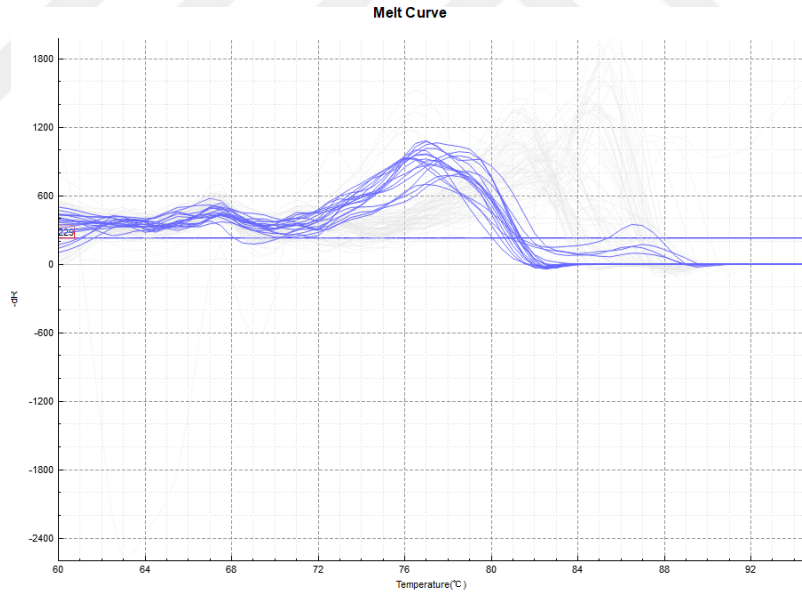


Şekil 12b. ATF4 geni melting curve (24 ve 48. saat)

ATF4 genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 0.6, IC₅₀ grubunda 0.2 kat bir azalma, 48. Saat için TQ grubunda 5 kat bir artış, IC₅₀ de ise 0.9 kat bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

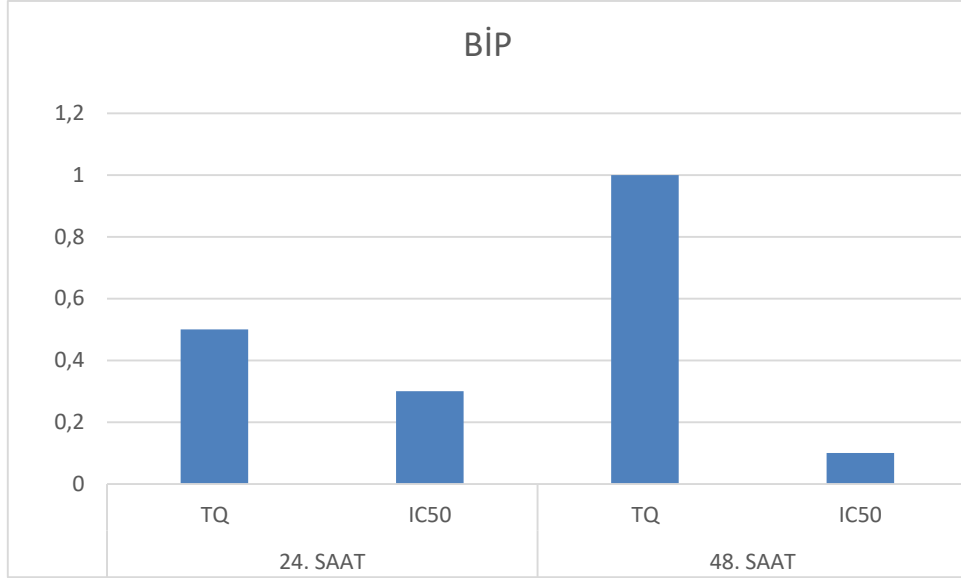


Şekil 13a. ATF6 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

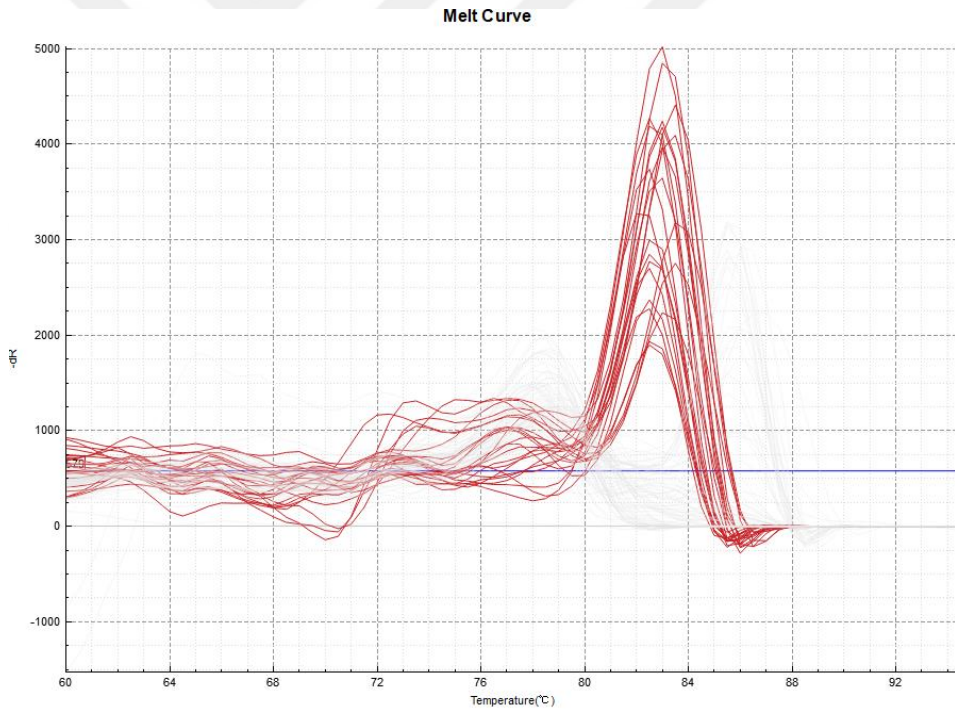


Şekil 13b. ATF6 geni melting curve (24 ve 48. saat)

ATF6 genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 0.6, IC₅₀ grubunda 0.3 kat bir azalma, 48. Saat için TQ grubunda 13 kat, IC₅₀ de ise 4.5 kat bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

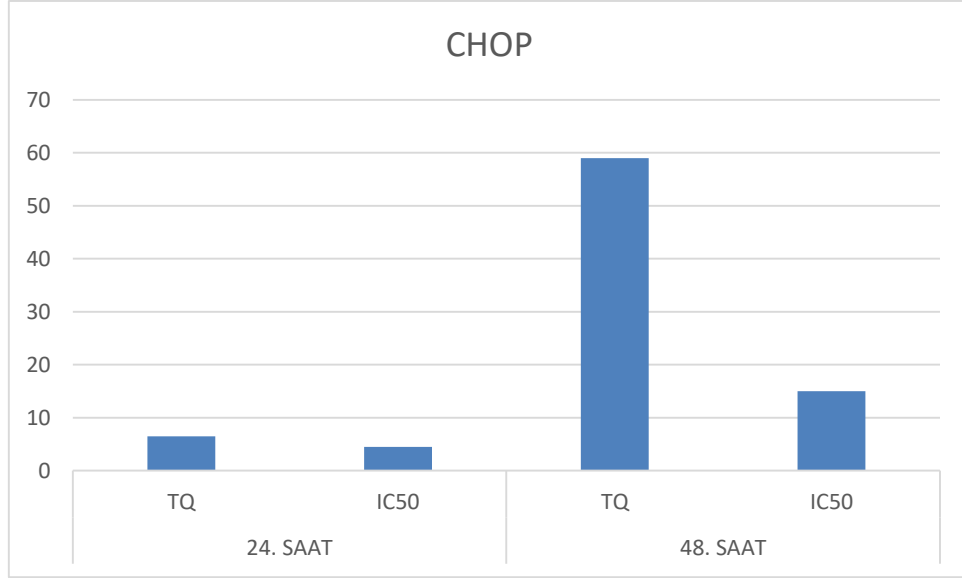


Şekil 14a. BİP geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

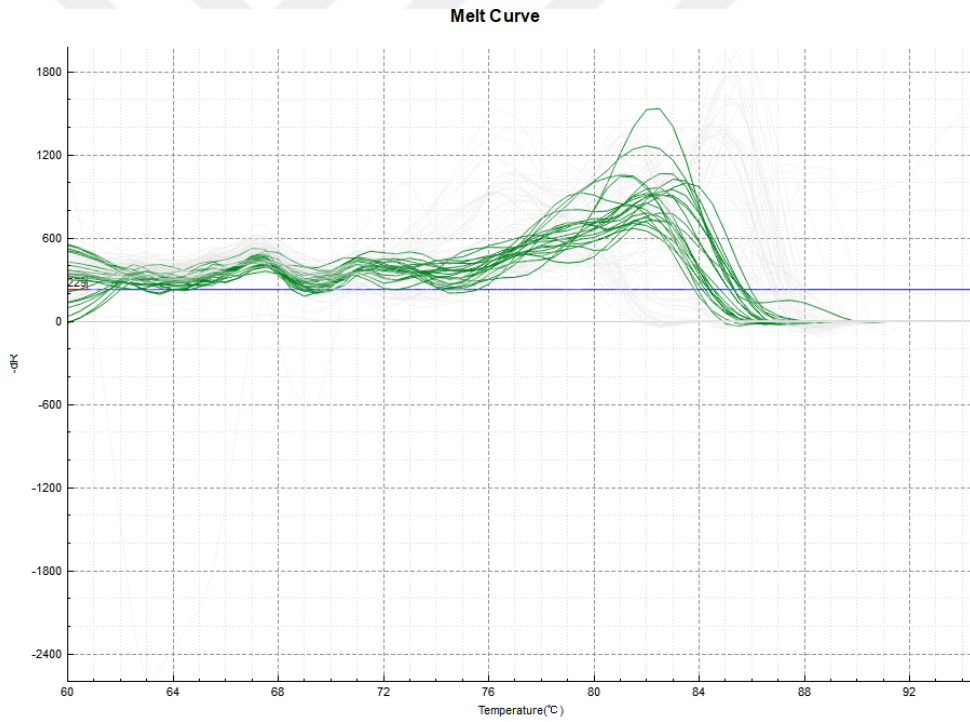


Şekil 14b. BİP geni melting curve (24 ve 48. saat)

BİP genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 0,5, IC₅₀ grubunda 0,7 kat bir azalma, 48. Saat için TQ grubunda değişim olmazken, IC₅₀ de ise 0,9 kat bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

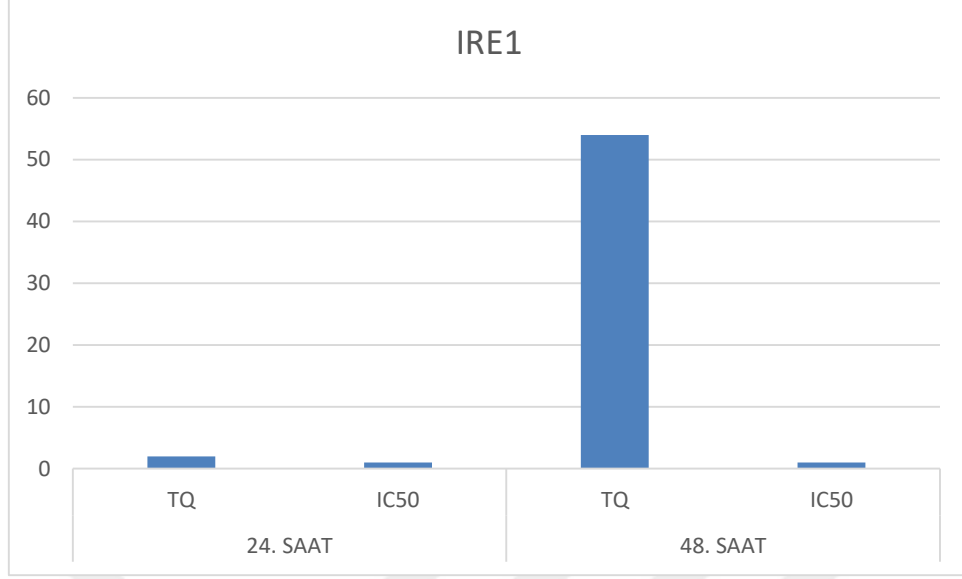


Şekil 15a. CHOP geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

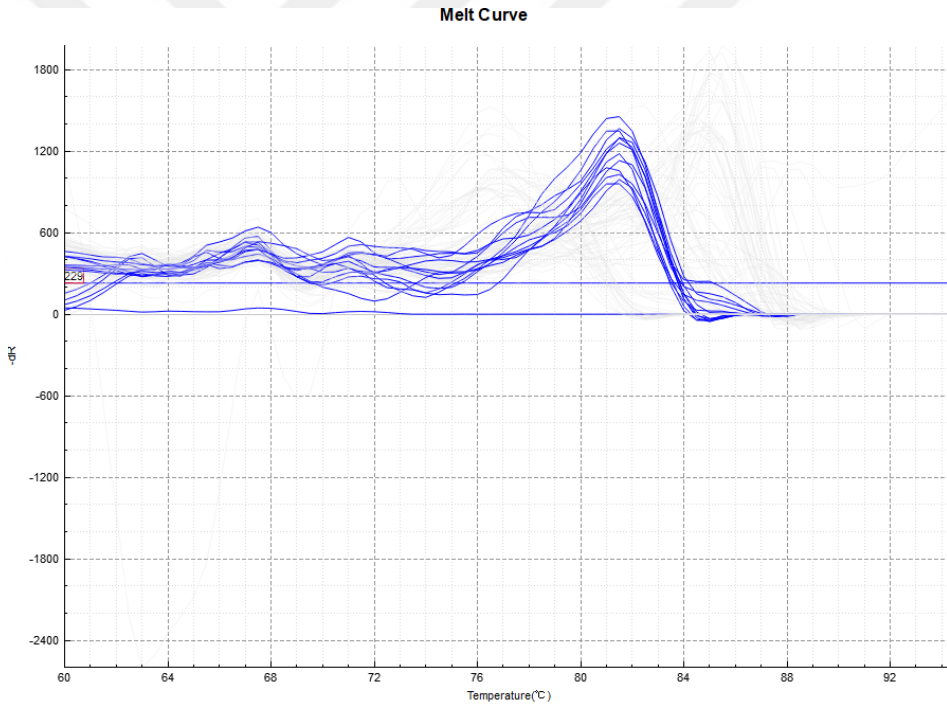


Şekil 15b. CHOP geni melting curve (24 ve 48. saat)

CHOP genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 6.5 kat, IC₅₀ grubunda ise 4.5 kat bir artış, 48. Saat için TQ grubunda 59 kat, IC₅₀ de ise 15 kat bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

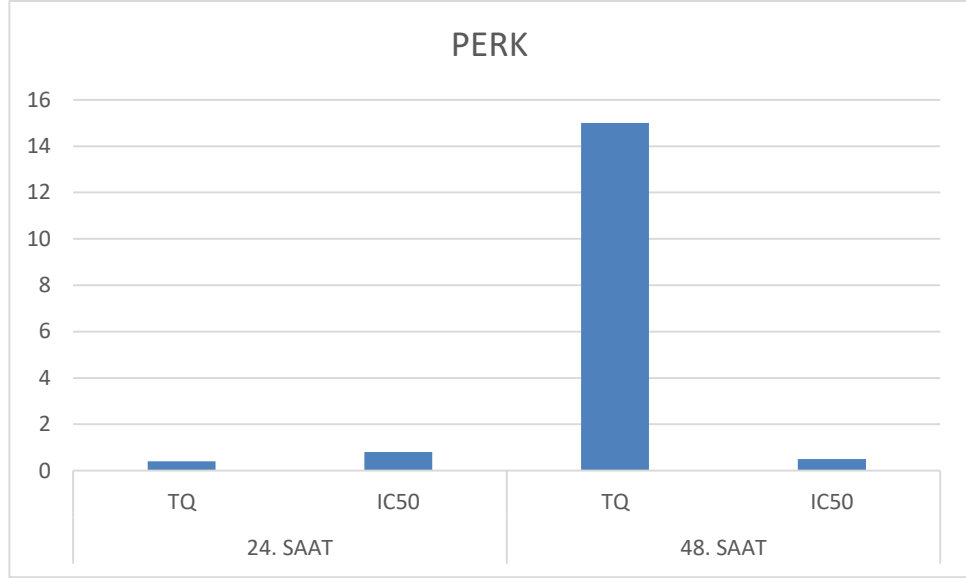


Şekil 16a. IRE1 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

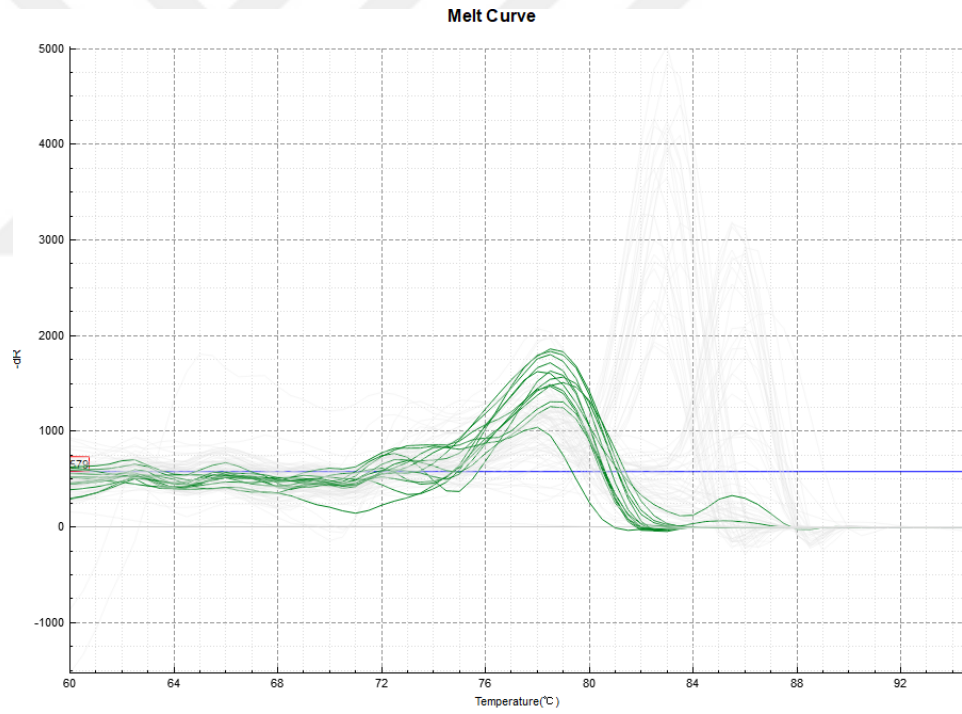


Şekil 16b. IRE1 genininThe melting curve plot of the target genes for 24 h and 48 h

IRE1 genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 2 kat bir artış, IC₅₀ grubunda değişim olmazken, 48. Saat için TQ grubunda 54 kat, IC₅₀ de ise bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.

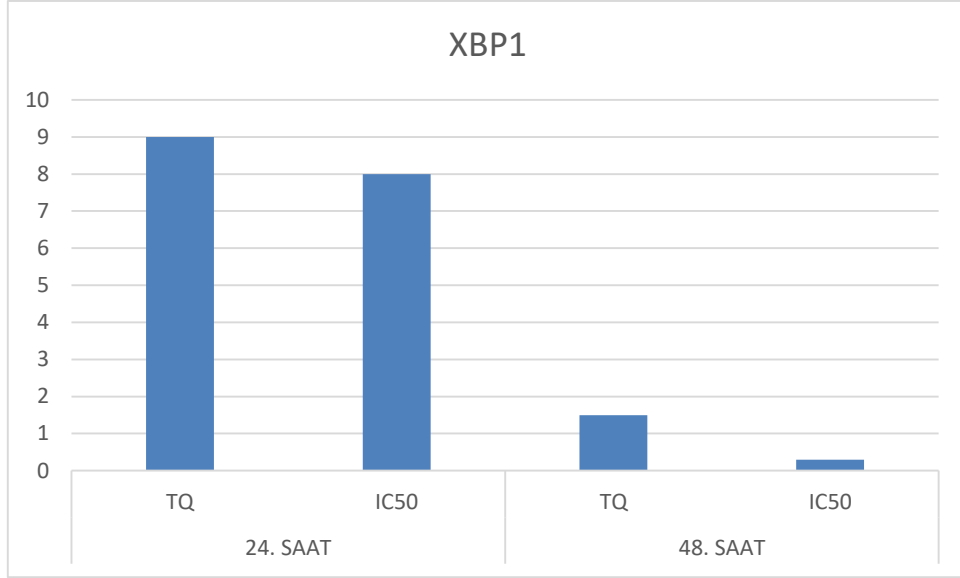


Şekil 17a. PERK geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu

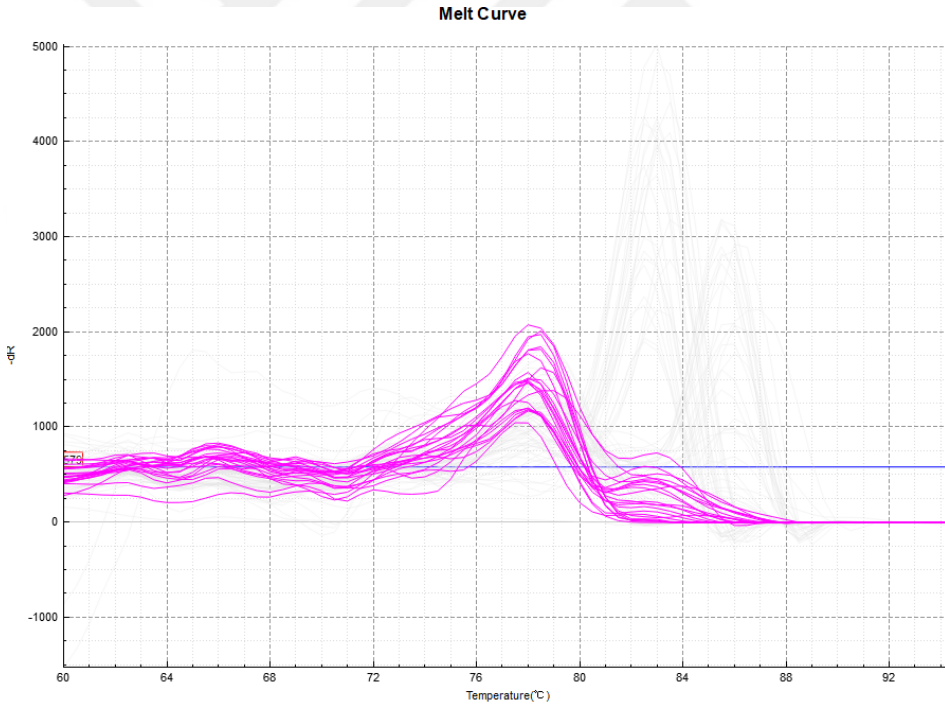


Şekil 17b. PERK geni melting curve (24 ve 48. saat)

PERK genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. Saat için TQ grubunda 0.6 kat, IC₅₀ grubunda ise 0.2 kat bir azalma, 48. Saat için TQ grubunda 15 kat bir artış, IC₅₀ de ise 0.5 kat bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 18a. XBP1 geninin doz ve zamana bağlı ekspresyonu



Şekil 18b. XBP1 geni melting curve (24 ve 48. saat)

XBP1 genin ekspresyon düzeyi; kontrol grubuna göre, 24. saat için TQ grubunda 9 kat, IC₅₀ grubunda ise 8 kat bir artış, 48. Saat için TQ grubunda 1.5 kat artış, IC₅₀ de ise 0.7 kat bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkisel ilaçlar son yıllarda büyük ilgi görmekte ve kimyasal ilaçlara alternatif ve destek olarak, daha fazla kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok araştırılan bitkilerin başında gelen *Nigella sativa* ve en önemli kimyasal bileşeni olan TQ'un farmakolojik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. TQ içeren *N. sativa*, geleneksel olarak bitki astım, hipertansiyon, diyabet, iltihaplanma, öksürük, bronşit, baş ağrısı, egzama, ateş, baş dönmesi ve mide-bağırsak rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Özellikle TQ'un çok düşük yan etkilere sahip olduğu ve ciddi toksisitenin olmadığı göz önüne alınarak, TQ'un klinik çalışmalarda yeni bir ilaç adayı olarak geliştirilmesi gerektiği hakkında tavsiyeler vardır (Darakhshan ve ark., 2015; Aminve Hosseinzadeh, 2016). Deneysel diyabetli ratların karaciğer ve böbrek dokularındaki TOS/TAS TQ uygulanmasından etkilendiği, karaciğerde STZ uygulanan gruplarda TQ uygulanmasından sonra artan oksidatif stres indeksinin (OSİ) kontrol grubuna yaklaştığı (Usta ve ark., 2018a), diyabetli grupta düşen serum antioksidan vitamin düzeylerinin TQ uygulaması ile anlamlı düzeyde etkilemediğine dair çalışmalar vardır (Usta ve ark., 2018b).

TQ'un kanser dahil birçok enflamatuar ve dejeneratif hastalıkta sayısız moleküler ve sinyal yollarını değiştirdiği gösterilmiştir. TQ'un antikanser etkisinin altında yatan kesin moleküler mekanizma, özellikle TQ'un ER stress aracılı apoptoz üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, hala tam olarak anlaşılmamıştır. TQ'un güçlü lipofilikliğe ve sınırlı biyoyararlanıma sahip olduğu ve ışık ve ısı duyarlılığı sergilediği bildirilmiştir (Goyal ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018).

Bir kanser hücre hattı (human renal carcinoma cell 786-O-SI3) kullanılarak yapılan çalışmada, TQ'un hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı, hücrelerinin koloni oluşumunu inhibe ettiği, apoptozu ve mitokondriyal membran potansiyel değişikliğini indüklediği saptanmıştır. TQ'un reaktif oksijen türleri (ROS) ve süperoksit üretimini ve apoptotik ve otofajik kaskadın aktivasyonunu tetiklemek suretiyle yararlı etki gösterdiği bildirilmiştir (Liou ve ark., 2019).

Sunulan bu tez çalışmasında, TQ'un hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 ve 48. saatlerde araştırılmış ve yapılan MTT sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur. Bu tabloya göre, TQ'un hem 24 ve 48.saatlerdeki hem proliferatif dozu,

hem de IC₅₀ dozları tespit edilmiştir. İki farklı zamanda MTT yapılarak, yararlı ve toksik TQ dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin, zamana bağlı olarak değişimi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Yanlış katlanmış proteinlerin birikimini önlemek için görev yapan ER stres ile UPR proapoptotik yollar başlatılır. Bu yolakta görev yapan; PERK, IRE1, ATF6 yollarının etkinleştirilmesi ile ER stres aktif hale gelir (Cunard ve Sharma, 2015). Taniguchi ve Yoshida (2015), ER stresinin çeşitli böbrek hastalıklarının başlangıcında rol oynadığını bildirmiş, ancak sorumlu patolojik mekanizmalar netleştirilmediğini bildirmektedir.

Akut böbrek hasarı (AKI), yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilen, böbrek fonksiyonunda hızlı bir düşüşle birlikte böbrek hasarı ile karakterize tıbbi bir durumdur. AKI'deki böbrek hücrelerinin bozulmalarında, katlanmamış protein tepkisine (UPR) veya ER stresine yol açan endoplazmik retikulumda (ER) katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesinin rolü olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Yan ve ark., 2018). Bu verilere göre, ER stresinin indüksiyonu hücrede hem sitoprotektif olabildiği hem de apoptozu aktive ederek sitotoksik olabildiği söylenebilmektedir (Cybulsky, 2017).

Nitekim sunulan bu tez çalışmasında, TQ'un böbrek epiteliyal hücrelerinde, proliferatif ve IC₅₀ dozunda 24 ve 48. saatlerde ER stresinde rol oynayan; ATF4, ATF6, BİP, CHOP, IRE1, PERK, XBP1 genlerinin ekspresyonları RT-qPCR ile araştırılmış ve ER stres düzeyi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Buna göre 24 saatte hem proliferatif hem de IC₅₀ dozunda CHOP ve XBPI gen ekspresyonlarının önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Diğer genlerin ise az miktarda ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür. IRE1 ise sadece proliferatif dozda 2 kat ekspresyonu artmıştır. 24. Saatte her iki dozda da ER stres gen ekspresyonlarının doza bağımlı olarak çok fazla farklılık göstermediği belirlenmiştir.

48. Saate ise, TQp dozunda bütün genlerin up-regüle olduğu, hatta CHOP ve IRE1 dozunun 50 kattan fazla arttığı görülmüştür. TQ_{1c} dozunda ise CHOP ve ATF6 önemli oranda artmış olmakla birlikte diğer gen ekspresyonlarının az miktarda ekspresyonlarının azaldığı ortaya konulmuştur.

UPR'nin iki ana bileşeni olan adaptif yol ve apoptotik yol arasındaki denge, ER stresinde hücre kaderini belirlemede kritik bir rol oynar. Uzamış ER stresi, apoptotik yolu aktive ederek, işlevsiz hücrelerin ortadan kaldırılmasına yol açar. Bu nedenle, böbrek hücrelerinde ER stresinin düzenlenmesi, AKI'de terapötik bir hedef sağlayabilir (Yan ve ark., 2018).

ER stresi, akut böbrek hasarının erken bir olaydır ve kronik böbrek hastalığının gelişimini hızlandırabilmektedir. ER strese bağlı böbrek hastalıklarının patolojisinin araştırıldığı çalışma sonuçlarına göre, diyabetik nefropati, renal fibroz, inflamasyonun neden olduğu böbrek hasarı, iskemi-reperfüzyon, renal proteinlerin genetik mutasyonları, proteinüri ve siklosporin A tedavisi gibi çeşitli böbrek hastalıklarında ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bazı kimyasal şaperonlar böbrek hasarı semptomlarını hafifletmektedir. Bu da böbrek hücrelerinin ER stresine bağlı apoptozunun belirli böbrek hastalıklarının başlıca nedenlerinden biri olduğunu gösterir (Taniguchi ve Yoshida, 2015; Mo ve ark., 2019).

Aslında, ER stres tepkisinin PERK-ATF4-CHOP yolu bazı böbrek hastalıklarında proapoptotik olmasına rağmen, ER stres tepkisi bazı böbrek hastalıklarına karşı koruma da sağlamaktadır. Katlanmamış proteinlerin otofaji tarafından atılması, bazı ER stresinin neden olduğu böbrek hastalıkları için de koruyucudur. ER stresi, bazı böbrek hastalıklarının başlıca nedeni olduğundan, ER'de biriken katlanmamış proteinlerle ilgilenen ER stres tepkisi ve otofaji, akut ve kronik böbrek hastalıklarında umut verici terapötik hedefler olduğu düşünülmektedir (Taniguchi ve Yoshida, 2015).

Böbrekte ER proteostaz, ER stresi ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve ayrıca ER stresinin neden olduğu otofaji mekanizmalarının anlaşılmasında ilerleme kaydedilmiştir. Protein yanlış katlanması ve ER stresi, birincil glomerülonefritler, genetik mutasyonlarla ilişkili glomerülopatiler, diyabetik nefropati, akut böbrek hasarı, kronik böbrek hastalığı ve renal fibroz dahil olmak üzere çeşitli böbrek hastalıklarında belirgindir. UPR, protein yanlış katlanmasını ve sonuçlarını hafifletmek için otofaji ile koordineli bir şekilde etkileşime girebilir. ER şaperonlarının idrara atılmasının izlenmesi, potansiyel olarak renal ER stresinin bir biyobelirteci işlevi görebilir. Deney hayvanları kullanılarak yapılan bir çalışmada, protein katlanmasını düzelten kimyasal şaperonlar

veya şaperon indükleyicilerle tedavinin böbrek hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (Cybulsky, 2017).

Kronik böbrek hastalığı (KBH), böbrek fonksiyonunda geri dönüşü olmayan bir azalma ve çeşitli metabolik bozuklukların indüklenmesi ile karakterizedir. Hastalığın etyolojisinde kronik hipoksik stres ve ER stres rol oynamaktadır. ER stresinin böbrekte, özellikle podosit yarık diyafram ve tubulointerstitiumda patogenezin bazı etkileri ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Maekawa ve Inagi, 2017).

Böbrek dokusu, yaşlanma ile birlikte muhtemelen ER stresi gibi zorluklarla başa çıkma kabiliyeti azaldığı için akut hasara duyarlı hale gelir. Yaşlı böbrekte aşırı oksidatif stresin varlığı, yüksek oksidasyon seviyeleri, ER strese bağlı hücre ölümünü artırır, IRE1 ve XBP-1 azalttığı için bir rol oynayabilir. Antioksidanlarla tedavi, IRE1 ve XBP-1 yanıtlarını normalleştirerek böbrek hasarına karşı koruyucu olabilir (Liu ve ark., 2019).

Böbrek hastalıklarında, bazı genetik mutasyonlar da ER stresini indükleyerek proteinin yanlış katlanması, protein trafiğinin bozulması böbrek hastalıklarına neden olarak değerlendirilmektedir (Park ve ark., 2019). Bu nedenle, böbrek hastalıkları için bu mekanizmaya dayalı tedavilerin sınırlı olması, çeşitli farmakolojik ajanlar kullanılarak ER stresinin normalleştirilmesi, böbrek hastalığının ilerlemesini önlemeye veya durdurmaya yönelik, umut verici bir terapötik yaklaşımı için önemli olabilir (Cybulsky, 2017). Bu stres sinyali ağı, KBH'yi iyileştirmeyi amaçlayan müdahaleler için bir hedef olabilir (Maekawa ve Inagi, 2017). ER stres inhibitörünü taklit edebilen bileşikler, ER stresinin neden olduğu apoptoz üzerinde düzenleyici etkiler sağlayabilir (Mo ve ark., 2019).

Koruyucu olarak kullanılan flavonoidin(morin), ER stresin üç ana kolu arasında yer alan IRE1 yolunu seçici olarak inhibe ettiği bulunmuş ve çeşitli ER stresiyile ilişkili böbrek hastalıklarında iyi bir aday olabileceği ileri sürülmüştür (Mo ve ark., 2019). Doğal bir flavonoidin (Paeonol) Pb kaynaklı toksisiteye karşı nefroprotektif etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, olumlu etkilerini böbreklerde ve birincil böbrek mezanjiyal hücrelerinde ER stresini baskıladığı ve buna bağlı inflamasyonu inhibe etmek için potansiyel bir terapötik ajan olarak önemli olabileceği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2018). HK-2 hücrelerinde apigenin, CHOP, ATF4 ekspresyonunu azaltarak, indoksil

sülfatın (IS) ile indüklenen ER stresini tamamen inhibe ettiği ve koruyucu olarak önemli olduğu bildirilmiştir (Jeon ve ark., 2015).

Doğal bir flavonoid olan Quercetin (QUER) ve doğal bir karotenoid olan Crocin (CRO)'nun insan kolon karsinomu (HCT116) ve embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) PAT kaynaklı toksisite üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmada, ER stres aktivasyonunu önleyerek yararlı olduğu bulunmuştur (Boussabbeh ve ark., 2016). 7,8-dihidroksiflavonun (7,8-DHF), ER stresinin bir elemanı olan CHOP ekspresyonunu azalttığına, böylece Akut böbrek hasarı (AKI) tedavisi için potansiyel koruyucu rolü olabileceğine dair yeni bilgiler sağlamaktadır (Ma ve ark., 2016).

İnflamasyon ve oksidatif stres, böbrek hasarının ilerlemesinde, önemli rol oynar. ER stres nedeniyle, nefrotoksisitede AT1R, ERK1/2-NFκB p65 sinyal yolunu zayıflatarak etki gösterdiği ve doğal bir polifenol olan naringenin güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile bu yolak üzerinden yararlı etki gösterdiği bildirilmektedir (Karuppagounder ve ark., 2015).

Oksidatif stres ve ER stresi, cisplatin (CP) ile indüklenen nefrotoksisitede yer alan hasar mekanizmalarından bazılarıdır. Isoliquiritigenin (IsoLQ) flavonoidi ER stres aracılığı ile CP'nin neden olduğu toksisite üzerinde orta derecede koruyucu bir etkiye sahip olduğu göstermiştir (Gómez-Sierra ve ark., 2020). CP ile indüklenen nefrotoksisitede bir flavonoid (EGCG), p-ERK üzerinden ER strese bağlı apoptozun inhibisyonu yoluyla yararlı etkileri gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015).

Podositler, diyabetik nefropati (DN) dahil olmak üzere birçok glomerüler hastalığın gelişiminde kritik bir rol oynar. Yeşil çayın baskın bir polifenolik bileşeni olan Epigallocatechin 3 gallate (EGCG) muamelesi, yüksek glukozun neden olduğu GRP78, p PERK ve kaspaz 12 protein ekspresyonunu önemli ölçüde zayıflattığı ve ER stresini baskılayarak glikoz kaynaklı podosit apoptozunda koruyucu bir rol oynadığını ve DN sürecini iyileştirmek için yeni bir terapötik strateji sağlayabileceğini ileri sürülmüştür (Xiang ve ark., 2017).

Bu verilere göre, başta flavonoidler olmak üzere bazı koruyucu maddelerin, çeşitli stres faktörlerinden kaynaklanan ER stresi azaltarak, özellikle böbrek üzerinde yararlı

etkileri olabileceği, hatta bu koruyucuların terapötik potansiyellerinin ortaya konulmasında ER stres inhibisyonunun bir kriter olarak kabul edilebileceği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, Ben Salem ve ark., (2015) bir non-seroid mikotoksin olan zearalenoneun neden olduğu sitotoksik, genotoksik ve mutajenik etkilerin ortaya çıkmasında ER stresinin önemini araştırdıkları çalışmada da Quercetin (QUER) ve Crocin'in (CRO) gibi koruyucu maddelerin, XBP1, ATF4 ve CHOP'un yukarı regülasyonunu sağladıkları saptanmıştır. ER stres tepkisinin aktivasyonu, apoptozun mitokondriyal yolunun aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu apoptotik süreç, ROS oluşumunda ve lipid peroksidasyonunda bir artış, mitokondriyal transmembran potansiyelinde kaspazlar ile DNA hasarlarının aktivasyonu ile karakterize edilebileceği bildirilmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri ER stres ile artmaktadır (Tatar ve Tatar, 2019). Bu çalışmada da özellikle TQP dozunda zamana bağlı olarak görülen artışların, sağlıklı hücre hattında ER stres tepkisini uyararak apoptozun mitokondriyal yolunun aktive edebildiği düşünülmektedir.

Böbrek hastalıklarına iskemi/reperfüzyon hasarı, diyabet ve nefrotoksik ajanlar gibi çeşitli faktörler neden olabilir. Oksidatif stres ve inflamasyon, böbrek hastalıklarının patogenezinde ve ilerlemesinde rol oynar. Geleneksel olarak, çeşitli ülkelerde böbrek yetmezliğinin tedavisi için doğal antioksidanlar kullanılmaktadır. Bitkisel ilaçların önemli bir yan etkisi olmadığı gibi bir görüş ile genellikle doğal antioksidanlar tercih edilmektedir. TQ'un böbrek bozukluklarına karşı koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalar vardır. Özellikle inflamasyon ve oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hastalıklarına karşı, hayvan ve *in vitro* modellerinde antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir (Shaterzadeh-Yazdi ve ark., 2018).

TQ'un böbrek koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Hosseinian ve ark. (2019), böbrek fibrozu ve disfonksiyonunun tedavisi için TQ uygulamasının güçlü bir terapötik ajan olarak yararlı olduğunu ve bu durumun serum üre ve protein atılım hızında önemli bir değişikliğe neden olmaması ile kanıtlandığını bildirmektedirler. Böbrekler ile atılan bazı maddelerin neden olduğu toksisiteye karşı, TQ'un antioksidan ve anti-apoptotik etkileri ile koruyabileceği bildirilmiştir (Jalili ve ark., 2017).

Böbrek hastalıklarının ilerlemesi için ağırlaştırıcı bir faktör olduğu bildirilen hiperüriseminin, azaltılmasına yönelik yeni ajanlar araştırılmaktadır. Oxonic acid (OA)

ile indüklenen hiperürisemi, hipertansiyon ve renal oksidatif stresin önlenmesinde TQ kullanımının renal oksidatif stresi azaltarak mitokondriyal anormallikler üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Dera ve ark., 2019b).

TQ takviyesi, Pb'nin neden olduğu böbrek yan etkilerini önemli ölçüde iyileştirdiği, TQ'un Pb'ye bağlı nefropatiye karşı büyük olasılıkla bir antioksidan mekanizma yoluyla koruyucu bir etkisini göstermekterdiği saptanmıştır (Mabrouk, 2018). Arseniğin neden olduğu böbrek hasarına karşı antiapoptotik ve antioksidan özellikleri ile TQ koruyucu olarak oksidatif stresi ve apoptotik hücrelerin oluşumunu engelleyebil ve potansiyel olarak bir iyileştirici ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Sener ve ark., 2016).

Renal iskemi-reperfüzyon hasarına (IRI) karşı TQ kullanımının hemodinamik ve tübüler renal fonksiyonel parametreler, böbrek hasarı belirteçlerinin, proinflamatuvar ve pro-fibrotik sitokinlerin ekspresyonunu iyileştirerek renoprotektif bir etki gösterdiği rapor edilmiştir (Hammad ve Lubbad, 2016). Amikasinin toksik etkilerine karşı TQ uygulanmasının böbreği koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (Özer ve ark., 2020). TQ, Diklofenak kaynaklı toksisiteye karşı güçlü bir nefroprotektif aktivite sergilemiştir (Hashem ve ark., 2020; Aslan ve ark., 2020b).

TQ'un ER stresle ilişkili proteinler (GRP78, CHOP, kaspaz-12) üzerine etkisi araştırılmış ve mitokondriyal disfonksiyon ve ER stres yolu ile ilişkili olarak antikanser etkisi gösterdiği belirlenmiştir. CHOP'un shRNA tarafından yıkılması, anti-apoptotik proteinin ekspresyonunu artırarak, TQ'un pro-apoptotik etkisini kısmen tersine çevirebilir. TQ'un ER stresi ile mitokondriyal disfonksiyon arasındaki ilişki, apoptozun ilerlemesine dayandırılmıştır (Zhang ve ark., 2018).

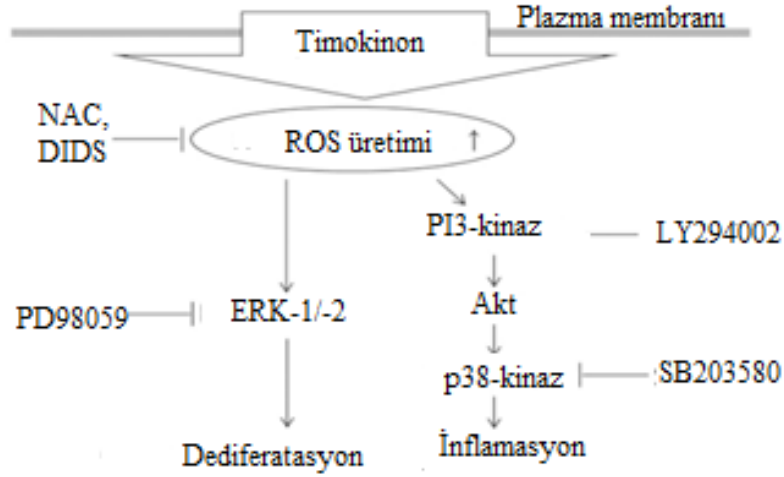
TQ, sıçan karaciğerinde de I/R hasarına karşı koruyucu olduğu, histolojik hasarı, iltihabı, oksidatif stresi, ER stresin önlenmesi üzerinden olduğu gösterilmiştir. TQ, GRP78, CHOP ve kaspaz-12 dahil olmak üzere ER stres parametrelerinin ifadesini azaltmış ve buna paralel olarak, mitokondriyal işlevi iyileştirerek apoptotik parametrelerin ifadesini zayıflatmıştır (Bouhleb ve ark., 2017).

TQ'un koruyucu etkilerinin, antioksidan kapasitelerin artması ve ER stresinin ve apoptozun azalmasına aracılık etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bouhlef ve ark. 2018). TQ ile tedavi edilen kanser hücrelerinde TQ kaynaklı seramid birikimi ve ER stresi, apoptozu tetikleyerek kanser hücresi ölümünü desteklediği bulunmuştur (Aslan ve ark., 2020a).

TQ'un farklı kanser aşamalarını inhibe etmede etkili olduğu, apoptozu indükleyerek, pro- ve anti-apoptotik genlerin seviyelerini düzenlediği, ERK1/2 aktivitelerini düşürdüğü böylece metastazı inhibe ettikleri bildirilmiştir (Imran ve ark., 2018). TQ'un böbrek kanseri hücreleri üzerinde de antikanser özellikleri olduğu, anti-proliferatif etkiler gösterdiği saptanmıştır (Dera ve Rajagopalan, 2019).

Antioksidan, antiinflamatuvar ve renal koruyucu etkileri ile bilinen timokinonun kontrast nefropatideki etkilerini göstermek amacıyla yapılan çalışmada, düşük doz TQ grubunda kontrast madde grubuna kıyasla anlamlı olarak daha az histopatolojik hasar gözlemlendiği, biyokimyasal olarak yüksek doz TQ etkisiz kabul edilirken, histopatolojik olarak toksik kanıtlar tespit edildiği bildirilmektedir (Topaloğlu ve ark., 2019).

TQ bağımlı zararlı etkilerin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Tavşan eklem kondrositlerinde TQ'un doza bağımlı bir şekilde ROS oluşumunu indüklediği, ayrıca siklooksijenaz-2 (COX-2) ve prostaglandin E2 (PGE2) ekspresyonunu indükleyerek iltihaplanmaya da neden olduğu gösterilmiştir. TQ, p38, fosforile hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (p-ERK) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ekspresyonunda doza bağlı bir artışa neden olmuştur. TQ ile indüklenen ROS üretiminin, ERK yolu ile farklılaşmaya ve tavşan eklem kondrositlerinde PI3K ve p38 yolları aracılığıyla iltihaplanmaya neden olduğunu göstermektedir (Yu ve Kim, 2015).



Şekil 19. TQ kaynaklı ROS üretimi (Yu ve Kim, 2015).

TQ, kanser hücrelerinde de toksik etkiye sahip olduğuna dair pek çok çalışma vardır. Bu etkisini ROS artışı ile gerçekleştirmektedir. TQ'un normal nöronlar için toksik olduğunu gösterirken, mitokondride ROS kaynaklı değişiklikler TQ'un neden olduğu nöronal hasarın ve ölümün ana nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Stelmashook ve ark, 2020).

TQ'un, hücre proliferasyonunda rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan kavşak genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, TQ'un belli konsantrasyona kadar hücre canlılığını artırdığı, sonrasında ise artan konsantrasyon miktarıyla birlikte sitotoksite oluşturduğu tespit edilmiş, bu yolaktaki genlerin ekspresyon düzeylerinin arttığı, buna karşın mTOR ekspresyon düzeyinde azalma olduğu belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak, TQ'un doza bağlı olarak böbrek hasarına yol açabileceği düşünülmektedir (Yüksek, 2021).

TQ'un LD₅₀'si (öldürücü doz), suda çözünmeyen yapısı nedeniyle uygulama yoluna ve kullanılan araca bağlı olarak, tek başına TQ'un uzun süreli uygulanmasının karaciğer toksisitesine neden olduğu ancak tolere edilebilir dozda organ fonksiyonunu etkilemediği de bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2019). TQ'un ratlar için ağız yoluyla uygulanmasında LD₅₀ oranlarının 90-500 mg/kg arasında değişen düzeylerde olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada ise; 60 mg/kg TQ uygulandıktan sonra özellikle karaciğer ve böbrek fonksiyon parametrelerinin normalden farklı çıkması ile bu dozun biyokimyasal güvenilirlik açısından sorunlu olduğu görüldü (Kurt ve ark., 2014). TQ'un

ana kaynağı olan *Nigella sativa*, özellikle antioksidan etkisi nedeniyle, nefrotoksik ilaçların kullanımından önce verildiğinde böbrek yetmezliğinin gelişimini azalttığı gösterilmiş olmakla birlikte, diyabetli bir bireyde *N. sativa* kullanımından sonra akut böbrek yetmezliği geliştiğine dair bir vaka takdim edilmiştir (Arslan ve ark., 2013).

N. sativa'nın hipoglisemik, hipolipidemik ve bronkodilatör etkileri gibi bazı etkileri yeterince araştırılmış ve klinik deneylerin veya ilaç geliştirmelerinin bir sonraki aşamasına izin verecek kadar yeterince anlaşılmıştır. Bununla birlikte, diğer etkilerinin ve uygulamalarının çoğu, daha fazla klinik ve hayvan çalışmaları gerektirdiği ifade edilmektedir (Tavakkoli ve ark., 2017).

İnsan oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerine karşı potansiyel sitotoksitesinin incelendiği çalışmada, tek başına TQ, UMSSC-14C (insan oral skuamöz hücreli karsinom) hücrelerine karşı kuvvetli sitotoksite; normal oral epitel hücrelerine (OEC) karşı ise daha zayıf öldürme etkisine neden olmuştur (Alaufi ve ark. 2017).

Sunulan bu tez çalışmasında, TQ'un hücre canlılığı üzerine etkisi, 24 ve 48. saatlerde araştırılmış ve yapılan MTT sonucunda elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Buna göre, TQ'un hem 24 ve 48. saatlerdeki hem proliferatif dozu, hem de IC₅₀ dozları tespit edilmiştir. İki farklı zamanda MTT yapılarak, yararlı ve toksik TQ dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin, zamana bağlı olarak değişimi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında, TQ'un böbrek epiteliyal hücrelerinde, proliferatif ve IC₅₀ dozunda 24 ve 48. saatlerde ER stresinde rol oynayan; ATF4, ATF6, BİP, CHOP, IRE1, PERK, XBP1 genlerinin ekspresyonları RT- qPCR ile araştırılmış ve ER stres düzeyi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Buna göre 24 saatte hem proliferatif hem de IC₅₀ dozunda CHOP ve XBPI gen ekspresyonlarının önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Diğer genlerin ise az miktarda ekspresyonun azaldığı görülmüştür. IRE1 ise sadece proliferatif dozda 2 kat ekspresyonunun arttığı görülmüştür. 24. Saatte her iki dozda da ER stres gen ekspresyonlarının doza bağımlı olarak çok fazla farklılık göstermediği belirlenmiştir.

48. Saate ise, TQp dozunda bütün genlerin ekspresyonunun arttığı, hatta CHOP ve IRE1 dozunun 50 kattan fazla arttığı görülmüştür. TQ_{1c} dozunda ise CHOP ve ATF6

önemli oranda artmış olmakla birlikte diğer gen ekspresyonlarının az miktarda ekspresyonunun azaldığı ortaya konulmuştur.

Katlanmamış protein tepkisi (UPR) yolu, katlanmamış proteinleri algılar ve bir kompleks içindeki ATF4, ATF6 ve XBP1 transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi yoluyla proteostazı ve hücre kaderini düzenlemektedir (Yang ve ark., 2020).

Böbrek dokusunda CHOP artışının böbrek hasarına karşı inflamatuvar yanıtı inhibe ettiği ve buna karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. ATF4 ve CHOP, protein sentezinde ve UPR'de yer alan genleri doğrudan indükler, ancak ATF4 ve CHOP'un protein sentezini artırdığı koşullar ATP tükenmesi, oksidatif stres ve hücre ölümüne neden olabilir. ER stres indüksiyonunun sitoprotektif olduğu ve proteostaz promotörlerinin/bozucularının hastalık sonuçlarını iyileştirmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Bujisic ve ark., 2017; Almanza ve ark., 2019).

ER stres faktörleri, katlanması beklendiği gibi olmayan proteinlerin ER'da birikme veya yanlış katlanmış protein yükünün artmasına neden olur. Böylece ER stres yanıtı tetiklenir, proteine dönüşemez ve sonuçta hücre ölüme gider. Bu çalışmada ER stresine bağlı olarak aktive olan genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir ve bu sonuçlara dayanarak, TQ uygulanmasına bağlı olarak normal şartlarda, normal böbrek hücrelerinde, ER stresinin meydana geldiği gösterilmiştir. Özellikle TQp dozunda ER stres faktörleri 24. saatte başlayan aktivasyonun, 48. Saatte üst düzeye çıkmaktadır. Genellikle koruyucu ve terapötik özellikleri için kullanılan TQ'un, proliferatif dozda bile ER stres faktörlerini aktive ettiği tespit edilmiştir. IC₅₀ dozunda uygulanan TQ, ER stres gen ekspresyonu üzerinde aktive edici etkisinin proliferatif doza göre, daha sınırlı olduğu, 48. saatte de bu durumun devam ettiği saptanmıştır.

TQp dozunda yani hücreyi proliferasyona götürürken genlerin artmış olduğu görülmektedir. TQ_{IC} dozunda ise hücreyi öldürürken yalnızca ATF6 ve CHOP genlerinin artmış olduğu belirlendi. Ancak bu genler her iki durumda da artmış olması göz önüne alınarak, aslında bu genlerin TQ dozuna bağlı olarak azalmış olduğunu, proliferatif dozda ilk 48 saat içinde hızlı bir yanıt şeklinde yükseldiği ancak yüksek dozda azaldığı görülmektedir. Burada XBP1 geninin de her iki doz için de ilk aşamada yüksek olmakla birlikte 48. saatte azaldığı, bu haliyle diğer ER stres genlerinden farklı davrandığı tespit

edilmiştir. ER stresinde yer alan genlerin, TQ doz ve zamana göre farklı şekilde aktive olduğu veya azaldığı dikkati çekmektedir.

Sonuç olarak, ER stresinin indüksiyonunun böbrek hücrelerinde hem sitoprotektif, hem de apoptozu aktive ederek sitotoksik olabildiğine (Cybulsky, 2017) ER stres tepkisinin bazı böbrek hastalıklarına karşı koruma sağlayabildiğine (Taniguchi ve Yoshida, 2015) dair bilgilere dayanarak, TQ'un sağlıklı böbrek hücreleri üzerinde faydası kadar zararlı da olabileceği kanaatine varılmıştır. Tamamen yararlı olacağı beklentisi ile kullanılan TQ'un zaman ve dozlara bağlı olarak, böbrek üzerinde ER stresinin de katıldığı değişen etkileri olabileceği, bu etkinin mekanizmasının altındaki moleküler temelinin ortaya konulması amacıyla, yeni ve destekleyici parametreler ile ilave doz ve süreleri de kapsayan daha ileri çalışmaların yapılmaya değer olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abd El-Ghany RM, Sharaf NM, Kassem LA, Mahran LG, Heikal OA. Thymoquinone triggers anti-apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury. *Drug Discov Ther.* 2009;3:296–306.
- Abukhader MM. The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74:195–200.
- Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med.* 2008;74(13): 1560-69.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(5):337-52.
- Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Khan R, Rehman MU, et al. Thymoquinone (2-Isoprpyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) as a chemopreventive/ anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharm J.* 2019;27(8):1113-26.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008;20(2):25-27.
- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Res.* 2003;17:299-305.
- Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J Ethnopharmacol.* 2005;101:116-9.
- Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RM, Al-Shagha WM. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit mode. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;40(3):319-23.
- Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2006;543(1):40-7.
- Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 2019;286(2):241-78.
- Alsaif MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *J Med Sci.* 2007;7(7):1164-70.
- Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y. Endoplasmic reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):382.
- Arslan E, Sayin S, Demirbas S, Cakar M, Somak NG, Yesilkaya S, et al. A case study report of acute renal failure associated with *Nigella sativa* in a diabetic patient. *J Integr Med.* 2013;11(1):64-6.

- Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Sayan H, ve ark. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutr Res.* 2005;25(7):673-80.
- Aslan M, Afşar E, Kırımlıoğlu E, Çeker T, Yılmaz Ç. Antiproliferative effects of thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 liver cancer cells: possible role of ceramide and ER Stress. *Nutr Cancer.* 2020a;14:1-13.
- Aslan M, Kırımlıoğlu E, Afşar E, Çeker T, Yılmaz Ç. Increased PUFA levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity. *Toxicol in Vitro.* 2020b;66:104836.
- Badary OA, Abdelnaim AB, Abdel-Wahap MH, Farid MA, Hamada FMA. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology.* 2000;143: 219-26.
- Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol.* 2003;26(2):87-98.
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S et al. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research.* 2009;69(13):575-83.
- Baytop T. Geçmişte ve Bugün Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi Ltd Şti, 1999;359.
- Ben Salem I, Prola A, Boussabbeh M, Guilbert A, Bacha H, Abid-Essefi S, et al. Crocin and quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(6):927-38.
- Bouhleb A, Bejaoui M, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, et al. Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;7.12961.
- Bouhleb A, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, Mannai S, et al. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:964-73.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South Afr J Botany.* 2010;76(2):210-6.
- Boussabbeh M, Prola A, Ben Salem I, Guilbert A, Bacha H, Lemaire C, et al. Crocin and quercetin prevent PAT-induced apoptosis in mammalian cells: Involvement of ROS-mediated ER stress pathway. *Environ Toxicol.* 2016;31(12):1851-8.
- Brodsky JL, Skach WR. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(4):464–75.
- Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev Biol.* 2007;18:751-61.
- Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol.* 2012;22(16): R622-6.
- Cecarini V, Quassinti L, Di Blasio A, Bonfili L, Bramucci M, Lupidi G, et al. Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. *FEBS J.* 2010;277:2128–41.

- Chen B, Liu G, Zou P, Li X, Hao Q, Jiang B, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015;240(11):1513-9.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012;18(1):59-68.
- Cui FF, Pan YY, Xie HH, Wang XH, Shi HX, Xiao J, et al. Pressure combined with Ischemia/Reperfusion injury induces deep tissue injury via endoplasmic reticulum stress in a rat pressure ulcer model. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):284.
- Cunard R. Endoplasmic reticulum stress in the diabetic kidney, the good, the bad and the ugly. *J Clin Med*. 2015;4(4):715-40.
- Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(11):681-96.
- Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh CA, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Res*. 2015;95-96:138-58.
- Demirci CGB, Meteoglu İ, Yılmaz M, Kurt Ömürlü İ, Kocatürk T, The anti-inflammatory effects of thymoquinone in a rat model of allergic rhinitis. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2017;27(5):226-32.
- Dera A, Rajagopalan P. Thymoquinone attenuates phosphorylation of AKT to inhibit kidney cancer cell proliferation. *J Food Biochem*. 2019;43(4):e12793.
- Dera AA, Rajagopalan P, Alfhili MA, Ahmed I, Chandramoorthy HC. Thymoquinone attenuates oxidative stress of kidney mitochondria and exerts nephroprotective effects in oxonic acid-induced hyperuricemia rats. *Biofactors*. 2020;46(2):292-300.
- Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, Agellon LB. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front Oncol*. 2015;5:11.
- Dobson CM, Sali A, Karplus M. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Edit*. 1998;37:868-93.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2006;6(7):1135-42.
- El-Dakhakhny M, Mady NI, Halim MA. *Nigella sativa L.* Oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Arzneimittelforschung*. 2000;50(9):832-6.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer*. 2005;117(3):409-17.
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(1):195-207.
- Faisal R, Shiwari L, Jehangir T. Comparison of the therapeutic effects of thymoquinone and methotrexate on renal injury in pristane induced arthritis in rats. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015;25:597-601.

- Farkhondeh T, Samarghandian S, Shahri AMP, Samini F. The neuroprotective effects of thymoquinone: A review. *Dose Response*. 2018;16(2):1559325818761455.
- Farooqui Z, Ahmed F, Rizwan S, Shahid F, Ahmed A, Khan F. Protective effect of *Nigella sativa* oil on cisplatin induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Biomed Pharmacother*. 2017;85:7-15.
- Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, et al. Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):330-42.
- Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1249-53.
- Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*. 2004;15:389-99.
- Gholamnezhad Z, Rafatpanah H, Sadeghnia HR, Boskabady MH. Immunomodulatory and cytotoxic effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on rat splenocytes. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:72-80.
- Giampietri C, Petrunaro S, Conti S, Facchiano A, Filippini A, Ziparo E. Cancer microenvironment and endoplasmic reticulum stress response. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:417281.
- Goel S, Mishra P. Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ROS generation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(4):1955-167.
- Gómez-Sierra T, Medina-Campos ON, Solano JD, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Isoliquiritigenin pretreatment induces endoplasmic reticulum stress-mediated hormesis and attenuates cisplatin-induced oxidative stress and damage in LLC-PK1 Cells. *Molecules*. 2020;25(19):4442.
- Goyal SN, Parajapati CP, Gore PR, Patil CR, Mahajan UB, Sharma C, et al. Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. *Front Pharmacol*. 2017;8:656.
- Gunduz H, Dede S, Agaoglu ZT, Atasoy N, Mert N. Serum trace elements status of rabbits supplemented with *Nigella sativa*, vitamins C and E, and selenium against damage by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Biol Trace Elem Res*. 2002;89(1):65-73.
- Guo B, Li Z. Endoplasmic reticulum stress in hepatic steatosis and inflammatory bowel diseases. *Front Genet*. 2014;5:242.
- Hammad FT, Lubbad L. The effect of thymoquinone on the renal functions following ischemia-reperfusion injury in the rat. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2016 Dec 25;8(4):152-9.
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324.
- Hashem KS, Abdelazem AZ, Mohammed MA, Nagi AM, Aboulhoda BE, Mohammed ET, et al. Thymoquinone alleviates mitochondrial viability and apoptosis in diclofenac-

- induced acute kidney injury (AKI) via regulating Mfn2 and miR-34a mRNA expressions. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;9.
- Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in b-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2016;56(2):33-54.
- Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem.* 2010;147(1):19-25.
- Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond).* 2009;118(1):19–29.
- Hosseinian S, Rad AK, Bideskan AE, Soukhtanloo M, Sadeghnia H, Shafei MN, et al: Thymoquinone ameliorates renal damage in unilateral ureteral obstruction in rats. *Pharmacol Rep.* 2017;69:648-57.
- Hosseinian S, Shahraki S, Ebrahimzadeh Bideskan A, Shafei MN, Sadeghnia HR, Soukhtanloo M, et al. Thymoquinone alleviates renal interstitial fibrosis and kidney dysfunction in rats with unilateral ureteral obstruction. *Phytother Res.* 2019;33(8):2023-33.
- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine.* 2004;11(1):56-64.
- Ijaz H, Tulain UR, Qureshi J, Danish Z, Musayab S, Akhtar MF, et al. *Nigella sativa* (Prophetic Medicine): A Review. *Pak J Pharm Sci.* 2017;30(1):229-34.
- Imran M, Rauf A, Khan IA, Shahbaz M, Qaisrani TB, Fatmawati S, et al. Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:390-402.
- Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum–new mechanisms in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014;10(7):369-78.
- Isaev NK, Chetverikov NS, Stelmashook EV, Genrikhs EE, Khaspekov LG, Illarioshkin SN. Thymoquinone as a potential neuroprotector in acute and chronic forms of cerebral pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Feb;85(2):167-76.
- Isık FA, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;28(2):301-5.
- Jalili C, Salahshoor MR, Hoseini M, Roshankhah S, Sohrabi M, Shabanizadeh A. Protective effect of thymoquinone against morphine injuries to kidneys of mice. *Iran J Kidney Dis.* 2017;11(2):142-50.
- Jan CH, Williams CC, Weissman JS. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science.* 2014;346(6210):1257521.
- Jeon BJ, Yang HM, Lyu YS, Pae HO, Ju SM, Jeon BH. Apigenin inhibits indoxyl sulfate-induced endoplasmic reticulum stress and anti-proliferative pathways, CHOP and IL-6/p21, in human renal proximal tubular cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(12):2303-10.
- Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes.* 2013;4:306-33.

- Kanter M, Meral I, Dede S, Cemek M, Ozbek H, Uygan I, Gunduz H. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2003; 50(5):264-8.
- Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, et al. Naringenin ameliorates daunorubicin induced nephrotoxicity by mitigating AT1R, ERK1/2-NFκB p65 mediated inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2015;28(1):154-9.
- Kaya, A. Endoplazmik retikulum nedir, özellikleri ve görevleri nelerdir [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 24 Mart 2021]. Erişim adresi: <https://www.tech-worm.com/endoplazmik-retikulum-nedir-ozellikleri-ve-gorevleri-nelerdir/>
- Khan MA, Tania M, Fu S, Fu J. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*. 2017;8(31):51907-19.
- Kincaid MM, Cooper AA. ERADicate ER stress or die trying. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:2373-87.
- Kurt E, Dede S, Ragbetli C. The investigations of total antioxidant status and biochemical serum profile in thymoquinone-treated rats. *Afr J Trad Complement Altern Med*. 2015;12(2):68-72.
- Liou YF, Chu SC, Kao SH, Chang YZ, Hsieh, et al. Thymoquinone suppresses the proliferation of renal cell carcinoma cells via reactive oxygen species-induced apoptosis and reduces cell stemness. *Environ Toxicol*. 2019;34(4):1208-20.
- Liu CM, Yang HX, Ma JQ, Yang W, Feng ZJ, Sun JM, et al. Role of AMPK pathway in lead-induced endoplasmic reticulum stress in kidney and in paeonol-induced protection in mice. *Food Chem Toxicol*. 2018;122:87-94.
- Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N. Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Mol Med Rep*. 2016;13(3):2836-42.
- Liu J, F. Ren, Q. Cheng, L. Bai, X. Shen, F. Gao, R.W. Busuttill, J.W. Kupiec- Weglinski, Y. Zhai, Endoplasmic reticulum stress modulates liver inflammatory immune response in the pathogenesis of liver ischemia and reperfusion injury, *Transplantation*. 2012;94(3):211-7.
- Liu X, Zhang R, Huang L, Zheng Z, Vlassara H, Striker G, et al. Excessive oxidative stress contributes to increased acute er stress kidney injury in aged mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2746521.
- Ma R, Zhang J, Liu X, Yue S, Zhao Q, Xu Y. 7,8-DHF treatment induces Cyr61 expression to suppress hypoxia induced ER stress in HK-2 cells. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5029797.
- Mabrouk A. Thymoquinone attenuates lead-induced nephropathy in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018;5:e22238.
- Maekawa H, Inagi R. Stress signal network between hypoxia and er stress in chronic kidney disease. *Front Physiol*. 2017;8:74.

- Magdy MA, Hanan el-A, Nabila el-M. Thymoquinone: Novel gastroprotective mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2012;697(1-3):126-31.
- Majdalawieh AF, Fayyad MW, Nasrallah GK. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(18):3911-28.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(12):2277-93.
- Mansour MA, Ginawi OT, El – Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. 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.* 2001;110:239-51
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct.* 2002;20:143-51.
- Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1133-49.
- Mo JS, Choi D, Han YR, Kim N, Jeong HS. Morin has protective potential against ER stress induced apoptosis in renal proximal tubular HK-2 cells. *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108659.
- Mohany M, El-Feki M, Refaat I, Garraud O, Badr G. Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide. *J Toxicol Sci.* 2012;37(1):1-11.
- Naidoo N. ER and aging-protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev.* 2009;8(3):150-9.
- Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I et al. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;70(8):1447-55.
- Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med.* 2012;63:317-28.
- Ozer EK, Goktas MT, Toker A, Pehlivan S, Bariskaner H, Ugurluoglu C, ve ark. Thymoquinone protects against the sepsis induced mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction and multiple organ damage in rats. *Pharmacol Rep.* 2017;69:683-90.
- Özer MK, Bilgic S, Armagan I, Savran M. Thymoquinone protection from amikacin induced renal injury in rats. *Biotech Histochem.* 2020;95(2):129-36.
- Pari L, Sankaranarayan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life sci.* 2009;85(23-26):830-4.
- Park SJ, Kim Y, Chen YM. Endoplasmic reticulum stress and monogenic kidney diseases in precision nephrology. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(9):1493-500.
- Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: A review. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009;20(5):741-52.

- Rajan SS, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U. Endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes. *Indian J Med Res.* 2007;125:411-24.
- Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(4):221-31.
- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(2):160-9.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519.
- Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol.* 2013;12(1):105-18.
- Salmani JMM, Asghar S, Lv H, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, Ph and light. *Molecules.* 2014;19(5):5925-39.
- Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Pharmacol Res.* 2017;119:412-21.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94.
- Sener U, Uygur R, Aktas C, Uygur E, Erboga M, Balkas G et al. Protective effects of thymoquinone against apoptosis and oxidative stress by arsenic in rat kidney. *Ren Fail.* 2016;38(1):117-23.
- Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(6):1059-70.
- Shakeri F, Gholamnezhad Z, Mégarbane B, Rezaee R, Boskabady MH. Gastrointestinal effects of *Nigella sativa* and its main constituent, thymoquinone: a review. *Avicenna J Phytomed.* 2016;6(1):9-20.
- Shaterzadeh-Yazdi H, Noorbakhsh MF, Samarghandian S, Farkhondeh T. An overview on renoprotective effects of thymoquinone. *Kidney Dis (Basel).* 2018;4(2):74-82.
- Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(2):143-9.
- Stelmashook EV, Chetverikov NS, Golyshev SA, Genrikhs EE, Isaev NK. Thymoquinone induces mitochondrial damage and death of cerebellar granule neurons. *Biochemistry (Mosc).* 2020;85(2):205-12.
- Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(6):694-705.
- Taborsky B, Oliveira RF. Social competence: An evolutionary approach. *Trends Ecol Evol.* 2012;27(12):679-88.
- Taniguchi M, Yoshida H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(4):345-50.

- Tatar M, Tatar T. Endoplasmic Reticulum Stress and Related Diseases. *Osmangazi J Med.* 2018;41(3):294-303.
- Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (*Nigella sativa*) and its constituent, thymoquinone. *J Pharmacopuncture.* 2017;20(2):107-11.
- Topaloğlu US, Sipahioğlu MH, Güntürk İ, Akgün H, Doğan ME, Sönmez G, et al. Effects of thymoquinone in prevention of experimental contrast-induced nephropathy in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(12):1432-9.
- Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, et al. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1419-31.
- Tsai SA, Bendriem RM, Lee CD. The cellular basis of fetal endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in drug induced neuro developmental deficits. *Neurobiol Stress.* 2018;10(2019):100145.
- Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2000;290:1571-4.
- Ullah R, Rehman A, Zafeer MF, Rehman L, Khan YA, Khan MH, Abidi SMA. Anthelmintic potential of thymoquinone and curcumin on *fasciola gigantica*. *PloS one.* 2017;12(2):e0171267.
- Ulu R, Dogukan A, Tuzcu M, Gencoglu H, Ulas M, İlhan N, et al. Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1675-9.
- Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 2012;197:40-6.
- Usta A, Dede S, Çetin S. Deneysel diyabetli ratlarda timokinon uygulamasının doku total oksidan ve antioksidan durumuna etkisi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.* 2018a;13(1):84-91.
- Usta A, Dede S, Yoruk IH. The effect of thymoquinone on serum antioxidant vitamin levels in diabetic rats. *Turk J Vet Res.* 2018b;2(1):26-33.
- Usta A, Dede S. The effect of thymoquinone on nuclear factor kappa B levels and oxidative DNA damage on experimental diabetic rats. *Pharmacog Mag.* 2017;13(3):S458.
- Walczak A, Gradzik K, Kabzinski J, Przybyłowska-Sygut K, Majsterek I. The role of the ER-induced UPR pathway and the efficacy of its inhibitors and inducers in the inhibition of tumor progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5729710.
- Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(10):2143-9.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone, potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(4):443-51.
- Xiang C, Xiao X, Jiang B, Zhou M, Zhang Y, Li H, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects from high glucose induced podocyte apoptosis via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep.* 2017;16(5):6142-7.

Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann Med*. 2018;50(5):381-90.

Yang MY, Wang YB, Han B, Yang B, Qiang YW, Zhang Y, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 slows down the progression of atherosclerosis via attenuation of ER stress and apoptosis in smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(1):48-58.

Zhang M, Du H, Huang Z, Zhang P, Yue Y, Wang W, et al. Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway. *Chem Biol Interact*. 2018;292:65-75.

Zhang Y, Fan Y, Huang S, Wang G, Han R, Lei F, et al. Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway. *Cancer Sci*. 2018;109(12):3865-73.

Zubair H, Khan HY, Sohail A, Azim S, Ullah MF, Ahmad A, et al. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death Dis*. 2013;4:e660.

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Kahta'da doğdu. İlk, orta, lise eğitimini Kahta'da lisans eğitimini Van'da tamamladı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner fakültesinde 2013-2018 yılları arasında eğitim gördü. 2019-2020 Pedagojik Formasyon programını Van Yüzüncü Yıl Üniversitesin'de tamamladı.2020-2021 Van Tuşba Mesleki Ve Teknik Anadolu Lisesinde hayvan sağlığı öğretmenliği yaptı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine 2018 yılında başladı.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu



Ek 2. Tez Orjinallik Raporu

