

FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞLARININ

***IN VITRO* DEĞERLENDİRMESİ**

ENDER ERDEM

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül 2021

**FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞLARININ
IN VITRO DEĞERLENDİRMESİ**

ENDER ERDEM

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül 2021

ÖZET

FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLMİŞ ÇÖREK OTU YAĞLARININ IN VITRO DEĞERLENDİRMESİ

ENDER ERDEM

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Eylül 2021

Danışman Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Çörek otu asırlardır tedavi amacıyla kullanılan bitkilerden bir tanesidir. Çörek otu tohumu ve bileşenleri; antidiyabetik, antibakteriyal, antioksidan, antifungal, antitümoral, antihistaminik, antihipertansif, antikonvülsan, antienflamatuar, bronkodilatör, hepatoprotektif, gastroprotektif, ve immün sistem güçlendirici özelliklere sahiptir. Ülkemizde yetişen *Nigella sativa L.* ve *Nigella damascena* türlerinden elde edilen çörek otu yağları halk arasında akciğer kanserine karşı kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Nigella sativa* ve *Nigella damascena* türlerinden soğuk sıkım (SK) ve süper kritik ekstraksiyon (SFE) yöntemleri ile elde edilen çörek otu yağlarının ve çörek otunun etken maddesi olan timokinonun, A549 (küçük hücreli olmayan insan akciğer kanser hücresi) hücreleri üzerindeki etkileri MTT, LDH ve kaspaz-3 testleri ile karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Timokinonun, A549 hücreleri üzerinde doz miktarındaki artışının hücre canlılığında azalmaya neden olduğu ve kaspaz-3 aktivitesinin bu süreçte etkili olduğu gözlenmiştir. *Nigella sativa* ve *Nigella damascena* yağlarının doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüş meydana getirdiği ancak kaspaz-3 aktivitesi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. *Nigella sativa* SK yağının hücre canlılığına etkisi bakımından *Nigella sativa* SFE'ye göre daha etkin olduğu belirlenmiştir. *Nigella damascena* SK ile *Nigella damascena* SFE'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri birbirine yakın olarak belirlenmiştir. Timokinonun A549 hücreleri üzerindeki etkileri umut vaat etmekle beraber *Nigella sativa* ve *Nigella damascena* bitkilerinin tohum yağlarının da akciğer kanseri üzerindeki etkileri de umut vaat etmektedir.

Anahtar Sözcükler: A549, Timokinon, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF BLACK CUMIN OILS OBTAINED BY DIFFERENT METHODS

ENDER ERDEM

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, September 2021

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Black cumin is one of the herbs that has been used for treatment for centuries. Black cumin seeds and its components; it has antidiabetic, antibacterial, antioxidant, antifungal, antitumoral, antihistaminic, antihypertensive, anticonvulsant, anti-inflammatory, bronchodilator, hepatoprotective, gastroprotective, and immune system strengthening properties. Black cumin oil obtained from *Nigella sativa L.* and *Nigella damascena* species grown in our country is used against lung cancer among the people. In this study, the effects of black cumin oil obtained from *Nigella sativa* and *Nigella damascena* species by cold pressing (SK) and supercritical extraction (SFE) methods and thymoquinone, the active ingredient of black cumin, on A549 (non-small cell human lung cancer cell) cells were investigated. MTT, LDH and caspase-3 tests were investigated comparatively. It was observed that the increase in the dose amount of thymoquinone on A549 cells caused a decrease in cell viability and caspase-3 activity was effective in this process. It was determined that *Nigella sativa* and *Nigella damascena* oils caused a decrease in cell viability depending on the dose increase, but had no effect on caspase-3 activity. It was determined that *Nigella sativa* SK oil was more effective than *Nigella sativa* SFE in terms of its effect on cell viability. The effects of *Nigella damascena* SK and *Nigella damascena* SFE on cell viability were determined to be close to each other. Although the effects of thymoquinone on A549 cells are promising, the effects of seed oils of *Nigella sativa* and *Nigella damascena* plants on lung cancer are also promising.

Keywords: A549, Thymoquinone, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin tüm aşamasında bilgi ve deneyimlerini bana aktaran bu zorlu süre zarfında sonsuz desteği ile bana yol gösteren, danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a

Deneylerim esnasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her aşamada destek olan Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Yağların sıkımı ve timokinon analizinde yardımcı olan Uz. Bio. Süleyman YUR'a

Çörek otlarının temin edilmesinde ve timokinon analizinde Prof. Dr. Temel ÖZEK've Prof. Dr. Gülmira ÖZEK'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, doktor adayı Sinem DABAĞOĞLU PSAV'a ve doktor adayı Mahmoud ARAFAT'a

Eğitimim boyunca tüm bilgi ve deneyimlerini aktaran Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü hocalarıma,

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni destekleyen, cesaretlendiren, sonsuz fedakarlıklarına minnettar olduğum sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi, sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

Ender ERDEM

19/08/2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ender ERDEM

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KANSER	4
2.1. Akciğer Kanseri	5
2.1.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi	6
2.1.2. Akciğer etiyo lojisi	7
2.1.3. Akciğer kanserinin histopatolojisi	8
2.1.3.1. Adenom karsinoma	8
2.1.3.2. Skuamoz hücreli kanser.....	9
2.1.3.3. Büyük hücreli karsinom.....	9
2.1.3.4. Küçük hücreli akciğer karsinomu	9
3. NIGELLA SATIVA	10
3.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri.....	13
3.1.1. Timokinonun farmakokinetik özellikleri	14
3.1.2. Timokinonun moleküler etki mekanizmaları	15
3.1.2.1. İnflamasyon aracıları üzerine etkisi.....	15
3.1.2.2. Peroksizom çoğalma aktiflenmiş reseptörler üzerine etkisi.....	16
3.1.2.3. Oksidatif parametreler üzerindeki etkisi	16
3.1.2.4. Apoptoz üzerindeki etkisi	16
3.1.2.5. Timokinonun antikanser etkisi.....	17
3.2. Timokinonun Toksisitesi	19

4. <i>NIGELLA DAMASCENA</i>	21
5. MATERYAL METOT	22
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
5.2. Kullanılan Aletler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler	22
5.2.1. Kullanılan araç ve gerecin hazırlanması	23
5.3. Yöntem	23
5.3.1. Yağların eldesi	23
5.3.1.1. Yağlardaki timokinon oranı ve ölçümü.....	24
5.3.2. Hücrelerin testler için hazırlanması	25
5.3.3. Elde edilen yağların ve timokinon için gerekli konsantrasyonun belirlenmesi.....	26
5.4. Sitotoksikite deneyleri	26
5.4.1. Mtt ile mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik etkinin belirlenmesi	26
5.4.2. LDH testi	27
5.5. Çörek Otu Yağlarının ve Timokinonun A549 Hücre Hattındaki Kaspaz-3 Aktivasyonunun Akış Sitometrisi ile Belirlenmesi	27
6. BULGULAR	28
6.1. MTT Bulguları.....	28
6.1.1. Timokinonun A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları	29
6.1.2. <i>Nigella sativa</i> soğuk sıkımın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları.....	30
6.1.3. <i>Nigella sativa</i> süper kritik sıkım'ın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları.....	31
6.1.4. <i>Nigella damascena</i> soğuk sıkım'ın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları.....	32
6.1.5. <i>Nigella damascena</i> süper kritik sıkımın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları.....	33
6.2. LDH Bulguları.....	34

6.2.1. Timokinonun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları	34
6.2.2. <i>Nigella sativa</i> soğuk sıkım'ın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları	35
6.2.3. <i>Nigella sativa</i> süper kritik sıkım'ın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları	36
6.2.4. <i>Nigella damascena</i> soğuk sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları	37
6.2.5. <i>Nigella damascena</i> süper kritik sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları.....	38
6.3. Kaspaz-3 Aktivasyonun Bulguları	38
7. TARTIŞMA.....	42
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA.....	47
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Akciğer kanserinin histolojik tipleri ve radyolojik-klinik bulguları.....	8
Tablo 3.1. <i>Nigella sativa L.</i> tohumunun genel içeriği.....	11
Tablo 3.2. <i>Nigella Sativa</i> tohum kimyasal içeriği.....	12
Tablo 4.1. <i>Nigella damascena</i> tohumları'nın içerik bileşikleri.....	22
Tablo 5.1. Süper kritik yağ eldesi prosedürü	24
Tablo 5.2. Kromatografik koşullar	25
Tablo 5.3. Verim ve yağlardaki timokinon oranı.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Timokinonun kimyasal formülü.....	14
Şekil 3.2. Timokinonun kansere karşı muhtemel etki mekanizmaları.....	19
Şekil 6.1. Timokinonun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	30
Şekil 6.2. <i>Nigella sativa</i> soğuk sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	31
Şekil 6.3. <i>Nigella sativa</i> süper kritik sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	32
Şekil 6.4. <i>Nigella damascena</i> soğuk sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	33
Şekil 6.5. <i>Nigella damascena</i> süper kritik sıkım A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	34
Şekil 6.6. Timokinonun A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi.....	35
Şekil 6.7. <i>Nigella sativa</i> soğuk sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi.....	36
Şekil 6.8. <i>Nigella sativa</i> süper kritik sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi	37
Şekil 6.9. <i>Nigella damascena</i> soğuk sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi.....	37
Şekil 6.10. <i>Nigella damascena</i> süper kritik sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 6.11. Kaspaz-3 aktivitesi	41
Şekil 6.12. Tekrarlanmış Kaspaz-3 aktivite SPSS analiz sonuçları.....	41

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 3.1. “ <i>Nigella sativa</i> ve tohumu”.....	10
Görsel 4.1. “ <i>Nigella damascena</i> ” bitkisi.....	21
Görsel 6.1. A549 hücre hattı, inverted mikroskop görüntüleri (24 saat).....	29



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM	:Mikromolar
μL	:Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$:Santigrad derece
ALK	:Anaplastik lenfoma kinaz
AST	:Aspartat aminotransferaz
CO_2	:Karbondioksit
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagles Medyum
DMSO	:Dimetil sülfoksit
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü
FBS	:Fetal bovine serum
g	:gram
GSH	:Glutatasyon
LDH	:Laktat dehidrogenaz
M	:Molar
Mg/ml	:Miligram/mililitre
$\mu\text{g /mL}$:Mikrogram/mililitre
μM	:Mikromolar
MTT	:(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
PBS	:Fosfat tampon çözeltisi
(SFE- CO_2)	:Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyon Sistemi

1. GİRİŞ

Kanser değişik organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasından oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan bir hastalıklar grubudur. Kanserinin kontrol altına alınması hususunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser yükünün insidansının bilinmesi gerekmektedir. Kanser dünyanın her ülkesinde en önde gelen ölüm sebeplerinden biridir ve yaşam standartlarını ve kişinin yaşam süresini olumsuz etkileyen engellerden biri olarak görülmektedir. Kanser 183 ülke arasında 112 ülkede 70 yaş grubundaki ölüm sebeplerinde birinci veya ikinci sırada yer alırken 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır. Genel olarak kanser insidansı ve mortalite yükü dünya çapında hızla artmaktadır [1].

Akciğer kanseri tüm dünyada en sık görülen kanser türü olmakla beraber kansere bağlı ölümlerin arasında önde gelen türdür. Akciğer kanserinde sağ kalım oranı ile tanı anındaki klinik ve patolojik evreler arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmektedir. Ne yazık ki, semptomlar ortaya çıktığında, hastalık genellikle ilerlemiştir ve bu durum tedavi olasılığını oldukça düşürmektedir. Genel olarak yaş ve tütün ürünleri, alkol kullanımı yerli ve yabancı kılavuzlarda yüksek risk gruplarını tanımlamada temel kriterlerdir. Ancak araştırmalar, akciğer kanseri nedenleri arasında sigara dışında hava kirliliği, çevresel diğer etmenler ve genetik faktörleri de rapor etmektedir. Çoğu akciğer kanserine tütün ürünlerini kullanmak neden olsa da dünya çapında pek çok akciğer kanseri vakası sigara içmeyenlerde bildirilmiştir. Hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanseri ayrı bir kategori olarak düşünülseydi, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin yedinci en yaygın nedeni olacağı belirlenmiştir. Ek olarak, akciğer kanseri insidansı da son yıllarda gençlerde artan bir eğilim göstermektedir [2].

Kanserden ölümlerde akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer aldığı bildirilmektedir. Tedavi ve cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen genel 5-yıllık sağ kalım oranları %10-20 arasındadır [2]. Çeşitli histolojik tipleri içeren çok basamaklı ve çok faktörlü bir hastalık olan akciğer kanserinin etyolojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Dünyada 2018 yılında, 2,09 milyon yeni vaka bildirilmiştir ve tüm kanserler içinde akciğer kanseri ilk sırada olduğu belirtilmektedir [3].

Ülkemizde 2015 yılı için akciğer kanserinin erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş hızı 100.000'de 52,5 iken kadınlarda ise 9 olarak bildirilmiştir [4]. Akciğer

kanseri hastalarının sadece %10'undan azı hiç tütün ürünü kullanmadığı, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Kanser Kontrol Planı (2013-2018) ile açıklanmış olduğu üzere, ülkemizde görülen akciğer kanserlerinin %90'ı tütün ve tütün ürünlerinin kullanımına bağlı ortaya çıktığı bildirilmektedir [4].

Epidemiyolojik çalışmalar, günlük diyetle ilgili ilişkili kanser türleri arasında meme, mide, kolon, akciğer ve prostat gibi kanserlere karşı yakalanma riskini en aza indirmek adına et ve et ürünleri yerine lifçe zengin, mineral ve vitamin içeriği yüksek bitkisel gıdaların daha çok tüketilmesinin, yeterli ve dengeli beslenmenin oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır [5].

Günümüzde insan sağlığının korunması amacıyla kullanılan ilaçların yan etkileri göz önüne alındığında ve kimyasal maddelerin risk oluşturması nedeniyle tıp, gıda ve çevre alanlarında yapılan araştırmaların çoğu hem hastalıkların tedavisinde hem de koruyucu hekimlikte bitkisel ürünlerin kullanımının önemini ortaya koymaktadır [6].

Çörek otu, *Ranunculacea* (Düğünçiçeğigiller) ailesinden yıllık bir bitki olup yaygın olarak ülkemizde başta Afyon, Eskişehir, Burdur, Isparta, Amasya, İstanbul, Gaziantep'de yetişir. Türkiye'de on iki türü yetişmektedir. Ülkemizde yetişen *Nigella sativa* L., *Nigella damascena* ve *Nigella arvensis*'in tohumları çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada genellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde, Pakistan, Hindistan, Doğu Asya ülkelerinde ticari olarak yetiştirilen bir bitkidir. Çörek otunun kahve, çay, ekmek gibi besinlere ilave edilerek günlük hayatta olmak üzere, kimya ve çeşitli farmasötik alan da kullanımı bulunmaktadır. Çörek otu yağı her ne kadar Arap ve Akdeniz ülkelerine özgü olsa da binlerce yıldır Akdeniz, Hindistan, Asya, Orta ve Uzak Doğu ülkelerinde baharat, gıda koruyucusu veya günlük doğal koruyucu ve tedavi edici bir seçenek olarak geleneksel olarak halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda çörek otu tohumunun %36-38'in karışık yağlardan oluştuğu ve uçucu yağ kısmının ana içeriğinin timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol olduğu belirlenmiştir [7-14].

Diğer bir çörek otu türü olan *Nigella damascena* ise genelde yabani olarak ılıman Avrupa, Akdeniz Havzası bölgesi ve Asya'daki birçok ülkede yetişmektedir. *Nigella damascena*'nın *Nigella sativa* gibi doğuda birçok yemekte çeşni veya tatlandırıcı olarak, ayrıca geleneksel tıp uygulamalarında kullanıldığı bilinmektedir. Ancak çok az çalışmada *Nigella damascena*'nın tıbbi özelliklerine odaklanılmıştır. *Nigella damascena*

tohumlarının içerdiği tohumların fenol bileşiklerinin östrojenik aktiviteye sahip olduğu ve sahip olduğu karakteristik aroma ile ticari olarak yüksek potansiyel taşıdığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda *Nigella sativa* ile *Nigella damascena* tohumlarının içerdiği bileşiklerin birbirinden önemli ölçüde farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir [15].

Çörek otu tohumu ve tohumundan elde edilen yağ ve diğer bileşenler günümüzde hala Uzak Doğu ve bazı Asya ülkelerinde halk hekimliğinde, baş ağrısı, soğuk algınlığı, gaz giderici, astım, sarılık, idrar söktürücü, çeşitli romatizma ve iltihap hastalıkları ve benzeri pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir [16]. Yapılan çalışmalar çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antikanserojenik, antitümöral [17], antibakteriyel [18], antioksidan [19], antiinflamatuvar ve analjezik [16], antiülserojenik [20], antidiyabetik [21], bağışıklık sistemini güçlendirici [22] etkilerinin olduğunu rapor edilmektedir.

Yapılan bilimsel çalışmalarda, antioksidan, antiproliferatif bir madde olan ve kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyici yönüyle dikkat çeken timokinonun (TQ), meme kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri [23], kolorektal kanser [24], çeşitli cilt kanserleri [25], fibrosarkoma, prostat kanseri [26], gibi pek çok kanser türlerinde kanserli hücrelerin çoğalması üzerine inhibitör etki gösterdiğini bildirilmektedir.

Yapılan birçok çalışmada, “*Nigella sativa*” bitkisinin ve tohum yağının başta akciğer ve meme kanseri olmak üzere birçok kanser türü üzerinde etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır ancak *Nigella sativa* tohum yağının bu zamana kadar elde edildiği tekniğe bağlı olarak ve etken maddesi olan timokinonun etkisi karşılaştırılmalı araştırılmamış ve ayrıca diğer bir tür olan *Nigella damascena* bitkisi ise literatürde kanser araştırmalarında daha önce kullanılmamıştır.

Bu çalışmada farklı yağ elde etme yöntemleriyle (soğuk sıkım, süperkritik akışkan ekstraksiyonu) elde edilmiş *Nigella sativa* ve *Nigella damascena* çörek otu yağlarının ve etken madde olan timokinonun akciğer kanserli hücre hatları üzerindeki etkisi *in-vitro* olarak araştırılmış ve yağların aktivitesi ile etken madde olan timokinonun etkisi karşılaştırılmıştır.

2. KANSER

Kanser kelime anlamı olarak, bir organ veya dokulardaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla oluşan kötü urlara denir. Kanser tek bir hastalık tipi olmamakla beraber 100'den fazla çeşide sahip olduğu bilinmektedir. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme neden olabilir [27].

Kanser tek bir doku veya organı etkileyebildiği gibi diğer organlara da yayılarak etkisini gösterebilir. Günümüzde her ne kadar bazı standart tedavi yöntemleri geliştirilmiş ve belirlenmiş olsa da her kanser türüne özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kalıtsal faktörler de kanser görülme olasılığını arttıran diğer bir etmen olmakla beraber, her insanın farklı bir genetik materyale sahip olması nedeniyle kansere yakalanma riski değişkenlik göstermektedir. Kanser tedavisinin yanı sıra, kansere neden olan etmenlerin tespit edilmesi, kanserin oluşmadan engellenmesi, sosyal ve psikolojik destekler ile hastanın ve hasta yakınlarının rahatlatılması kanseri son derece karmaşık ve büyük bir problem haline getirmektedir [27].

Vücudumuzdaki sağlıklı, bölünme kontrolünü kaybetmemiş normal hücreler sınırlı bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak, bu bölünme yeteneği bazı özelleşmiş hücre tiplerinde bulunmaz bu hücreler kas ve sinir hücreleridir. Hücreler bu yeteneklerini büyüme, hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması için kullanırlar. Fakat hücrelerin bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği sınırlıdır ve sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme ve kendini yenileyebilme sınırı bulunmaktadır. Normal sağlıklı bir hücrenin ne kadar bölüneceğini ve hangi durumda ve zamanda ölmesi gerektiği genetik ve duruma bağlı olarak belirlidir. Hücrelerin programlı bir şekilde ölümü "apoptosis" olarak adlandırılır. Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve daha çok hücre üretmesine gereksinim vardır. Bazen bu süreç doğal işlemesi gereken yoldan saparak yeni hücrelere gerek olmadan hücreler kendi kendine bölünmeye devam eder. Sınırlı bölünme yeteneğinin dışına çıkarak kontrolsüz şekilde bölünmeye başlayarak çoğalırlar ve fazla hücre kütleleri bir araya gelerek tümör oluştururlar. Apoptosis vücudun kendini koruma ve sağlıklı bir şekilde yaşamını devam ettirebilmesi için adeta bir kontrol mekanizması görevi üstlenmektedir ve başta kanser ve birçok hastalığın ortaya çıkmasında bu programlanmış hücre ölüm mekanizmasının doğru şekilde çalışmaması veya işlevini yitirmesinden dolayı meydana geldiği bilinmektedir [28].

Kanserli hücreler bir araya gelip birikerek tümörü oluştururlar. Tümörler iyi huylu veya kötü huylu olabilirler. İyi huylu tümörler kanser değildir. İyi huylu tümörler genellikle cerrahi yöntemlerle bulunduğu dokudan çıkarılıp temizlenir ve çoğu zaman bu tümörler tekrar oluşmazlar. İyi huylu tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar ve kişinin hayatını nadiren tehdit ederler. Kötü huylu tümörler kanserdir. Kötü huylu tümörlerdeki hücreler anormaldirler ve kontrolsüz ve düzensiz çoğalırlar. Kötü huylu tümörler normal sağlıklı dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Kanserli hücreler buldukları tümörlü yapıdan sıçrayarak ve kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilir ve tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayı metastaz olarak adlandırılır. Kanser oluşması için birçok sebep sayılabilir ancak en başta gelenleri; tütün ürünleri, alkol, uyuşturucu kullanımı, çevresel etkenler, sağlıksız beslenme, radyasyon, genetik faktörler, çeşitli virüsler ve biyolojik ve kimyasal ajanlar gibi faktörler sayılabilir [29].

Günümüzde kanser tedavisi için birçok yöntem bulunmaktadır. Cerrahi yöntemler kemoterapi, radyoterapi, en sık başvurulan yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunmakla beraber, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminden bahsetmek mümkün değildir [27].

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, kanser nedeni ile ölümlerin görüldüğü en sık kanser türü olarak bilinmektedir [30]. Akciğer kanseri genetik ve epigenetik birçok aşamadan oluşan, sonunda normal akciğer epitelinin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanan bir kanser tipidir [31]. Genelde akciğer bronş ve küçük hava yolları epitelinden köken almaktadır. Sigara kullanımı hastalığın görülmesindeki ana etmenlerden biri olarak görülmekle beraber hastaların %15-20'si hayat boyunca hiç sigara kullanmamış olması hava kirliliği, pasif içicilik gibi çevresel nedenleri ve genetik nedenleri (EGFR mutasyonları, ALK yeniden düzenlenimi vb.) ön plana çıkarmaktadır. Yeni gelişen genetik testler, görüntüleme teknikleri ve hedefe yönelik ilaçlar hastalığın tanı, takip, prognoz tayini ve tedavisinde köklü değişikliklere yol açmaktadır [32].

2.1.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Yapılan araştırmalara göre 2018 yılında dünya çapında 2,1 milyon kişi akciğer kanseri tanısı konulmuş ve akciğer kanseri nedeniyle 1,8 milyon kişi hayatını kaybetmiştir [33]. Tüm evreler birlikte düşünüldüğünde akciğer kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalım oranının %19 olduğu bildirilmiştir [34]. Akciğer kanserinde tanı/ölümlerin %90'ı 55 yaş üzerindeki hastalarda görülmekte olup akciğer kanseri tanısı medyan yaşi 70 olarak belirtilmiştir. 40 yaş altında akciğer kanseri görülme oranı oldukça düşüktür [35]. Hastaların büyük bir kısmının ileri seviyelerde teşhis konulması sebebi ile tedavi seçeneklerini kısıtlanmakta ve hastalığın seyri kötü yönde etkilemektedir [36]. Günümüzde gelişmiş ülkelerde Akciğer kanseri insidansı azalma eğiliminde olsa da gelişmekte olan ülkelerde akciğer kanseri insidansı artma eğiliminde olduğu belirtilmiştir. Bu durumun başlıca nedeni olarak sigara tüketiminin gelişmekte olan ülkelerde hala artmakta olması gösterilebilir [37]. Tüm dünyada akciğer kanseri erkeklerde kadın bireylere göre daha sık görülmektedir. Ancak erkeklerde akciğer kanseri insidansı azalma eğiliminde iken; kadınlarda akciğer kanseri insidansı artmakta bazı ülkelerde plato çizmektedir. Bu duruma neden olarak kadınlardaki sigara kullanımının erkeklerle göre daha geç pik noktasına gelmesinden dolayı olduğu gösterilebilir [37]. Tüm Dünyada olduğu gibi ülkemizde kanser vakalarındaki artış göz önüne serilmektedir.

Tüm bu veriler doğrultusunda akciğer kanseri tüm yaş gurupları içerisinde erkeklerde 1. sırada yer alırken kadınlarda ise 5. sırada yer almaktadır. Erkeklerde akciğer kanserinin bu denli yüksek grnmesindeki ana sebeplerden olan tütün mamullerinin sık kullanımı sebep olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, giderek artan evre ve hava kirliliği, çalışma koşulları da önemli rol oynamaktadır.

Son zamanlarda 2.5 μm 'den (PM2.5) daha küçük atmosferik ince partiküllere maruz kalmanın, 2010 yılında dünya çapındaki akciğer kanserinden 223.000 lme neden olduğu tahmin edilmektedir. Ortamdaki PM2.5'e atfedilebilecek akciğer kanseri ölümlerinin yarısından fazlasının in'de ve diğer Doğu Asya lkelerinde olduğu tahmin edilmektedir. ABD'de yapılan bir çalışmada, PM2.5'e uzun süre maruz kalmak, akciğer kanseri ölümüyle ilişkili bulunmuştur [38].

2.1.2. Akciğer etiyojisi

Kanser dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser sebeplidir [39, 40]. Kanserden ölümlerin yaklaşık üçte biri; tütün kullanımı, yüksek beden kütle indeksi, dengesiz beslenme, yetersiz fiziksel aktivite ve alkol kullanımına bağlı olduğu düşünülmektedir. Tütün kullanımı kanser riskini arttıran en önemli faktörlerden biri olup, kanser ölümlerinin yaklaşık %22'sinden sorumludur [39]. Hepatit ve insan papilloma virüsü (İPV) gibi kansere neden olan enfeksiyonların, gelişmemiş ülkelerde kanser vakalarının yaklaşık %25'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir [39]. Yaşlanma, kanserin oluşumunda başka temel faktör olup kanser insidansı, özellikle yaşla birlikte artan risklerin birikmesi ve hücrel onarım mekanizmalarının kişi yaşlandıkça daha az etkili olmasından dolayı artar [39]. Gelecekte gelişmiş ülkelerde dahil olmak üzere birçok ülke için, tanı konacak çok sayıdaki kanser hastasının tümünün tedavisi ve bakımı için gerekli finansal kaynağın giderek zorlaşacağı bildirilmektedir [41]. Öte yandan tüm başlangıç seviyelerinde erken teşhis ile kanserin gelişiminin önlenme şansı bulunmaktadır [41].

Akciğer kanserinin oluşumunda ise hayat tarzı ve dış etken suçlanmakta ve bunların başında tütün kullanımı gelmektedir. Akciğer kanseri görülmüş hastaların %85'i hayatlarının belli bir döneminde sigara kullanmış kişilerden oluşmaktadır [42]. Sigara dumanında 50'den fazla kanserojen madde tespit edilmiş içeriğindeki bazı maddelerin KRAS geninde aktivasyon mutasyonuna neden olduğu belirtilmiştir [43]. Kanser görülme riski sigara içme süresi ve diğer kanserojenlere maruz kalmaya bağlı olarak doğrudan ilişkilidir. Hayat boyunca hiç sigara kullanmamış akciğer kanseri hastalarında esas neden bilinmemekle birlikte çevresel faktörler ve pasif içicilik suçlanmaktadır.

Sigara kullanımını dışında asbestlere maruz kalma, iyonize radyasyon, non-hodking lenfoma [44], veya meme kanserine bağlı metastaz [45], polihidrokarbon maruziyeti [42], pulmoner fibrozis, HIV enfeksiyonu, alkol kullanımı [46, 47] suçlanmaktadır. Fiziksel aktivitenin akciğer kanseri ile ilişkisi net bilinmemekle beraber bazı çalışmalarda fiziksel aktivite artışıyla akciğer kanseri riski arasında ters ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [48].

2.1.3. Akciğer kanserinin histopatolojisi

Dünya sağlık örgütü, akciğer kanserinin histolojik bulgulara göre sınıflandırılmasında bazı değişikliklere giderek sınıflandırılmada başta immünohistokimyasal teknikler, genetik çalışmalar ve moleküler biyoloji tekniklerinin kullanımını dikkate alarak hastaların tedavi stratejilerini oluşturmak için yeni rapor yayınlamıştır [49]. Akciğer kanserinin yayılma, büyüme hızı, metastazın zamanlaması, radyoterapiye ve kemoterapiye yanıtına göre temelde, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan olmak üzere iki ana başlık altında toplanmış. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri de kendi aralarında; adenokarsinom, skuamoz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılmıştır (Tablo 2.1). Buna göre tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %83'ü küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, %16'sı küçük hücreli akciğer kanserinden oluşmaktadır [50]. Akciğer kanserlerinin %36'sına sadece cerrahi ile, %11'ine sadece radyoterapi ile, %23'üne kombine tedavilerle, %9'una da destek tedavilerle müdahale edilmektedir [51].

Tablo 2.1. Akciğer kanserinin histolojik tipleri ve radyolojik-klinik bulguları [52]

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
Adenokarsinom <ul style="list-style-type: none">• En sık görülen tür• Radyolojik olarak hava bronkogramları şeklinde prezente olabilir• Genellikle sigara içmeyen kadın hastalarda görülür• Sıklıkla periferik yerleşimli
Skuamoz Hücreli Kanseri <ul style="list-style-type: none">• İkinci en sık rastlanılan tür• Sigara ile yakın ilişkili• Kaviteleşme gösterebilir

2.1.3.1. Adenom karsinoma

Adenom karsinoma tüm akciğer kanseri türlerinin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Tütün ve diğer tütün ürünleri ile direk olarak ilişkisi diğer akciğer

kanseri türlerine göre daha azdır. Önceden var olan akciğer dokusundaki parankimdeki skar dokusundan gelişebilir ve bu nedenle “skar karsinomu” olarak da adlandırılır. Kanser teşhisinde kanserli hücrelerin görüldüğü bölgeye bağlı değişiklik gösterir ancak temelde tanı için genelde başta biyopsi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans kullanılır, ayrıca genetik ve moleküler olarak testlerde kanser teşhisinde oldukça büyük rol oynamaktadır. Tedavi seçenekleri arasında başta cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yöntemler izlenmektedir [52].

2.1.3.2. Skuamoz hücreli kanser

Ülkemizde en sık görülen kanser tiplerinden biri olmakla beraber ana sebeplerinden biri tütün ürünlerinin kullanımıyla ilişkilidir. Skuamoz hücreli kanser genellikle akciğer içinde sınırlı kalmakla beraber yakındaki lenf bezlerine de sıçrayabilir. Tütün ürünlerine ek olarak alkol, kötü ağız hijyeni, kronik irritasyon ve diğer çevresel koşullar ile genetik faktörler en önemli etyolojik faktörler olup genelde 40 yaş üstü erkek bireylerde daha fazla görülmektedir [52].

2.1.3.3. Büyük hücreli karsinom

Diğer akciğer kanseri tiplerine göre daha az rastlanılan akciğer kanseri türü olmakla beraber, tütün ürünlerinin kullanımı ile direkt ilişkilendirilmektedir, erken aşamalarda metastaz yapan ve hızlı büyüyen, hastalık seyri bakımından oldukça kötü ve ağır olan bir türdür [52, 53].

2.1.3.4. Küçük hücreli akciğer karsinomu

Küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %13-20'sini oluşturmaktadır [54]. Amerika Birleşik Devletleri ‘deki tüm kanserlerden dolayı hayatını kaybedenlerin yaklaşık %4 den sorumludur [55]. Küçük hücreli akciğer kanseri görülen kişilerde ortalama yaşam süresi erken evre hastalarda 14-18 ay, ileri evre hastalarda 6-8 ay olarak belirtilmiştir [54]. Küçük hücreli akciğer kanseri, tütün ürünlerini kullanımı ile direkt ilişkili olup, erken metastaz yapan ve hızlı büyüyen çoğalan oldukça agresif bir türdür. Kanama ve nekroz sık görülmekle beraber, yüksek oranda lenf nodu ve komşu yapılara invazyon yaparak ve lenf dolaşımı üzerinden yayılır. [56]. Birçok hastanın erken

tanı şansı olmayıp, tanı anında yaygın hastalığa sahip olduğundan cerrahi müdahale şansı düşüktür, alternatif tedavi için genelde kemoterapi ve radyoterapi uygulanır [57].

3. *NIGELLA SATIVA*

Ülkemizde halk arasında “Çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* L. *Ranunculacea* (dügünçeğigiller) familyasına ait bir bitki olup, Güney Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika’da yetişir ve ülkemizde çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur, İstanbul, Konya ve Eskişehir yörelerinde yetiştirilir [58].

Nigella sativa türü mızrak şeklinde uzun ince yapraklara sahip olup, 5-10 petalli ve çoğunlukla beyaz, sarı, soluk mavi, pembe, mor renkli narin çiçeklere sahiptir (Görsel 3.1). Birleşmiş folikülden oluşan kapsül şeklindeki bitki meyveleri geniştir. Kapsül sayısı çoğunlukla 3-7 adettir ve her bir kapsül yumurta biçiminde, açısız, yassı ve huni biçiminde olup yaklaşık 0.1cm genişliğinde ve 0.2cm boyunda birçok siyah tohum içerir [59, 60].



Görsel 3.1. “*Nigella sativa* ve tohumu” (<https://www.seeds-gallery.shop/tr/ana-sayfa/corek-otu-tohumlar-nigella-sativa.html>)

Tohumları başta çeşitli gıda sektöründe kullanımının yanında halk arasında geleneksel tıpta çeşitli birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [61]. Geleneksel tedavide çörek otu; öksürük, inflamatuvar hastalıklar, bronşit, astım, baş dönmesi, ağrı, ateşlenme, karaciğer ve böbrek işlev bozuklukları, mide-barsak sistemi problemleri, diyabet, egzama, hipertansiyon ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilirliği belirtilmektedir [62]. Kanser teşhisi konmuş kişilerde kemoterapiyle birlikte tamamlayıcı ve alternatif tıpta kullanılabileceği bildirilmektedir [61].

Çörek otunun tohumunun içinde bulundurduğu yapıların besin değerleri yüksek olup başlıca doymuş/doymamış sabit yağlar (%31-35,5), uçucu yağlar (%0,4-0,45), proteinler (%16-19,9), karbonhidratlar (%33-34), amino asitler, tanenler, saponinler, lifler, alkaloidler, mineraller (çinko, kalsiyum, fosfat), vitaminler (tiamin, askorbik asit, folik asit, niasin ve pridoksin) tespit edilmiştir (Tablo 3.1) [63].

Tablo 3.1. *Nigella sativa* L. tohumunun genel içeriği [63].

İçerik	% (a/a)
Yağ	31-35,5
Protein	16-19,9
Karbonhidrat	33-34
Lif	4,5-6,5
Saponin	0,013
Nem	5-7
Kül	3,7-7

Çörek otu tohumunda bulunan doymamış yağ asitleri (~%85) başlıca; linoleik asit oleik asit, eikozadienoik asit, linolenik (omega-6) asit, ve palmitoleik asittir. Doymuş yağ asitleri (~%18); stearik asit, miristik asit, ve palmitik asittir [63].

Çörek otu tohumu uçucu yağlarından çeşitli farmakolojik aktif kimyasal bileşenleri bünyesinde bulundurur bunlar başlıca; timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve

timoldür, ayrıca karvakrol ve nigellon, p-simen, d-limonen, α ve β -pinen, trans-anetol de içerir (Tablo 3.2.) [59, 61, 64].

Tablo 3.2. *Nigella sativa* tohum kimyasal içeriği [65]

Uçucu sekonder metabolit	% (Yüzde)	Uçucu sekonder metabolit	% (Yüzde)
Timokinon	28,70	Terpinolen	0,56
p-Simen	27,80	2,6,11,15-Tetrametil-	0,47
9-Undekenal, 2,10-dimetil	11,54	heksadeka- 2,8,8,10,14-pentaen	0,45
α -Terpinen	5,23	1. 2,3-epoksi-gerianial	
α -Tuyen	5,09	cis-4-Metoksituyan	0,44
trans-4-Metoksituyan	3,62	Sabinen	0,44
Longifolen	3,24	Sulforuz asit, 2-etilheksil-	0,32
Karvakrol	2,44	izoheksil ester	
Timohidrokinon	2,40	Nonil allil okzalit	0,24
β -Pinen	1,31	Asetamid, N-(2-hidroksi-3-	0,22
α - Pinen	1,00	pentenil)-	
4-Tridesen	0,92	Terpinen-4-ol	0,21
Sitronellil n-bütirat	0,88	2-metil heksanoik asit	0,16
cis-11,14-Eikosaienoik-	0,81	2,4-Oktadienal, (E,E),	0,15
sit metil ester		2E,4Z-Dekadienal	0,14
Longipinen	0,61		
(+)-Dihidrokarvon	0,58		

Çörek otu tohumu gıda sektöründe yiyecek, aroma arttırıcı, baharat ve koruyucu olarak kullanılmakla beraber, dünyanın birçok bölgesinde geleneksel tedavilerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Başta antialerjik, antimikrobiyal, antihistaminik ve iltihap önleyici olarak da kullanıldığı bildirilmektedir [53, 64, 66]. Tüm bu etkilerin yanında çörek otu tohumunun halk arasında başta sindirim, bağışıklık, karaciğer, böbrek ve solunum sistemi problemlerinin tedavisinde geleneksel tıbbi açıdan yararlı olabileceği düşünülmektedir [61, 62].

Ayrıca çörek otu tohumu ile yapılan tentürün başta akut gastroenterit, hazımsızlık, amenore (adet düzensizliği), dismenore (sancılı adet görme), iştah kaybı ve deri döküntüsü tedavilerinde kullanıldığı, kusma önleyici ve antiseptik olarak da kullanıldığı bildirilmektedir [66].

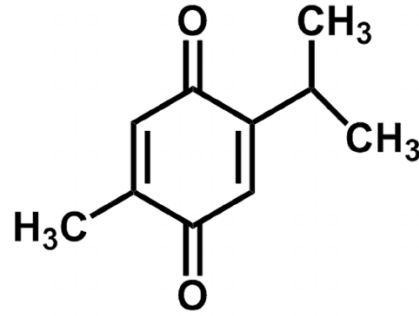
Nigella sativa'nın metanolik ve etanolik tohum ekstrelerinin, antimikrobiyal etkileri ve A549, SW480 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş, yapılan çalışmalarda ekstraktlarda bulunan biyoaktif bileşenler, antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik etkilerden sorumlu olan alkaloidler, flavonoidler, saponinler, tanenler ve fenolik bileşiklerin tespit edildiği belirtilmiştir. *N. sativa* tohumlarının, çeşitli hastalıkların iyileştirilmesinde ve yeni ilaçların geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynayabilen ve immünomodülatör etkileri araştırılabilen yüksek değerli biyoaktif moleküller içerdiği belirtilmiştir [67].

3.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri

Bir monoterpen olan timokinon ilk olarak El-Dakhkhany tarafından 1963 yılında *Nigella sativa L.*'den ekstre edilmiştir [68]. Molekül formülü $C_{10}H_{12}O_2$ ve molar ağırlığı 164,20 g/mol olan timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1, 4-kinon), tohumun uçucu yağının en biyoaktif ana bileşenidir. Keto enol ve karışık formlardan oluşur. Hidrofobik özelliği, biyo yararlanımını ve ilaç formülasyonlarında kullanımını kısıtlayan faktörlerdendir [68]. Kimyasal analizlerde çörek otu tohumu uçucu yağın yaklaşık %28'e kadar ulaşabilen oranlarda timokinon içerebildiği gösterilmiştir (Tablo 3.2) [68].

Timokinonun 0,1 N hidroklorür, PBS ve su (pH 5; 7,4 ve 9,0'da) çözeltilerinde çözünürlüğünün aynı olduğu görülmüştür. HPLC kullanılarak yapılan analizlerde timokinonun pH artışına bağlı olarak stabilitenin azaldığı belirlenmiştir ve düşük pH'da

daha stabil olduğu belirlenmiştir ayrıca timokinonun ışığa kısa süreli maruziyetinde dahi yüksek hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. Timokinonun fotoliz kinetiği etanol kullanılarak araştırılmış ve çalışmalar timokinonun %70'inden fazla bir oranda hızlıca bozulduğunu göstermiştir [69]. Timokinonun kimyasal formülü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Thymoquinone

Şekil 3.1. Timokinonun kimyasal formülü

3.1.1. Timokinonun farmakokinetik özellikleri

Timokinonun ile birçok *in vivo* deneyler yapılmış olup oral, subkütan, intraperitoneal (i.p.) [70], ve intravenöz (i.v.) [71] uygulamalar denenmiştir. 2,5-3 kg ağırlığındaki sağlıklı 10 adet Vole cinsi erkek tavşanlar ile yapılan çalışmada 5 mg/kg intravenöz ve 20 mg/kg oral hedef doza kadar, timokinonun tüm hayvanlar tarafından tolere edildiği belirtilmiştir [72]. İntravenöz uygulama sonrasındaki ortalama plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi, oral uygulama sonrasındakinden yüksek çıktığı belirtilmiştir. Timokinonun oral uygulanmasından sonra plazma konsantrasyonu 2 saat içinde pik noktasına ulaşarak hızla yükseldiği belirtilmiştir [72].

Timokinonun ağız yolu ile alınmasından sonra karaciğer enzimleri (DT-diaforaz (kinin redüktaz) ile metabolize edilerek hidrokinona indirgendiği ve hidrokinonun bağlanarak daha sonra merkaptürik asite dönüştürülerek idrarla uzaklaştırıldığı bildirilmektedir [62].

Timokinon proteinlere yüksek oranda bağlanır ve timokinon-protein bağlanmasının tahmini yüzdesi insanlarda ve tavşanlarda yaklaşık %99 civarında olduğu bildirilmiştir [72].

Birçok terapötik uygulamaları olmasına karşın düşük çözünürlüğü ve yüksek hidrofobik özelliğinden dolayı timokinonun ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi

açısından sınırlandırıcı etki yaratmaktadır [73]. Timokinonun bu problemi, nanopartikül at enkapsülasyon sistemleri ile çözülmüştür ve biyo yararlanımı, aktivitesi artırılarak son yıllarda katı lipid nanopartiküller, timokinon-yüklü nano-yapılı lipid taşıyıcılar gibi yeni analoglar elde üretildiği bildirilmiştir [62, 74, 75].

3.1.2. Timokinonun moleküler etki mekanizmaları

Timokinonun tüm etki mekanizmaları tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Yapılan çalışmalar ile ortaya koyulan genel moleküler etki mekanizmaları; oksidatif parametreler, inflamasyon araçları, peroksizom proliferator aktiflenmiş reseptörler (PPARs), transkripsiyon faktörleri, apoptoz üzerine etkileri belirtilmektedir. Çörek otu yağının etken maddesi olan timokinonun antiinflamatuvar, antioksidan, kemokoruyucu etkileri belirtilmekle beraber hücrelere minimum toksik etki göstererek, meme, kemik, yumurtalık, kolon, miyeloid lösemi ve pankreas ve akciğer olmak üzere birçok tümör hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı bildirilmiştir [76-78].

3.1.2.1. İnflamasyon araçları üzerine etkisi

Prostanoid yapımında görev alan COX1 ve COX2 inhibitörleri, sikloosijenaz (COX) enzim tipidir. COX2'nin fazla ekspresyonu ile mide, akciğer, meme ve pankreas gibi birçok kanser tipinin ilişkili olduğu bildirilmektedir [79]. Bu durum prostaglandinin (PG) anjiyogenezisi yukarı yönlü regülasyonu ve apoptoza direnci arttırmasından dolayı önem arz etmektedir (80-81). COX2 inhibisyonun sağlıklı dokular üzerinde istenmeyen yan etkiler oluşturabileceği düşünülmesinden dolayı son zamanlarda COX2 inhibisyon mekanizmasıyla kanser koruyuculuğu seçeneğinde doğal ürünlere olan ilgi artmaktadır [49]. Timokinon ile yapılan *in vivo* çalışmalarda alerjik solunum yolu inflamasyonun da COX2 ekspresyonunun ve PG üretimini düşmesinde kritik rol oynadığı rapor edilmiştir [82]. Timokinonun, p47PHOX fosfor peptitlerinin Ser-328 ve Ser-304'indeki fosforilasyonun bozulmasıyla indüklenmiş FLMP inflamasyonunu düşürdüğü belirtilmiştir [83].

3.1.2.2. Peroksisom çoğalma aktiflenmiş reseptörler üzerine etkisi

PPAR'lerin çeşitli regülasyonları sonucu bazı genetik yolları düzenleyerek olası kanser engelleyici etki gösterdiği belirtilirken, timokinonun PPAR- γ reseptörü ile yukarı yönlü regülasyonu sağladığı ve hücre ölümünde ve meme kanserin proliferasyonunu sağlayan genleri inhibe ettiği bildirilmiştir [84], timokinon ile PPAR- γ aktivasyonu arasındaki ilişkinin kanser önleyici bir mekanizmaya sahip olduğu belirtilmektedir [85].

3.1.2.3. Oksidatif parametreler üzerindeki etkisi

Reaktif oksijen türleri (ROS) kısa ömürlü oksijen kaynakları içeren küçük yapılı moleküller olup hidroksit (OH.), süperoksit (O_2^-), peroksil (RO_2) ve alkoksil (RO.) radikallerini içerirler. Hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), hipoklorik asit (HOCl) ve ozon (O_3), gibi radikal olmayan yapılar okside edici ajanlar gibi davranarak rahatlıkla radikallere dönüşürler [86]. Hidrojen peroksit çekirdek zarını aşar, metal iyonları ile oksidasyon reaksiyonuna girerek ve hidroksil radikalleri ortaya çıkar [87]. Hidroksil oluşumunu teşvik ettiği düşünülen demir ile bakır buna örnek olarak gösterilmektedir [88]. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneylerde oksidatif stresi başlatan serbest radikallere karşı timokinonun antioksidan ve serbest radikalleri uzaklaştırdığı belirtilmiştir. Timokinonun organ bozukluklarına, oksidatif hasara, sebep olan çeşitli çevresel toksinleri ve ksenobiyotiklerin yan etkilerini azaltabileceği bildirilmiştir [89, 90]. Ayrıca, Süperoksit Dismutaz'ın aktivitesinin timokinon ile arttığı ve çeşitli deneysel patolojik koşullar altında Glutatyon'u indükleyerek hücrel oksidatif stresi düşürdüğü gösterilmiştir [91-93].

3.1.2.4. Apoptoz üzerindeki etkisi

Timokinonun, tümör baskılayıcı genleri aktive ederek kansere karşı korunmada önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir [69]. Timokinonun, p21, p27 ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin modülasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir [94, 95]. Timokinonun p53 bağımlı sinyal yolağı aracılığı ile insan kolon kanser hücreleri ve hayvan modellerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir [96]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda DNA parçalanması, kaspazın uyarılması ve PARP süpürülme (klevajı) ile apoptozu düzenlenmesinde timokinonun etkili olduğu gösterilmiştir [97]. Ayrıca Bax/Bcl-2

aktivasyonlarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiş ve apoptotik modülatör olan p53 ekspresyonunun yukarı yönlü regüle ettiği belirlenmiştir [98, 99]. Timokinonun ERK1/2 sinyal yolağını etkileyerek hücre proliferasyonunu azalttığı da gösterilmiştir [100].

3.1.2.5. *Timokinonun antikanser etkisi*

Timokinon ile çeşitli prelinik çalışmalar yapılmış ve insan kanser hücrelerine seçici sitotoksikite gösterdiği yerlerde hücre büyümesini engelleyici özelliği ile apoptoza etkisi araştırılmıştır [101]. Yapılan çalışmalarda, Akt aktivasyonunun ve hücre dışı kinaz sinyal yollarının ve NF-κB sinyal yolağının timokinon tarafından baskılanarak kanserli hücreleri apoptoza götürdüğü belirtilmiştir. İnvazyon, metastaz ve anjiyogenez, dahil diğer tümörjenik gelişmelerde de timokinonun ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [102]. Timokinonun çoklu hedefleri tümör oluşumu veya ilaç direnci geliştirmeye dahil olan ve kanserojen madde metabolize edici enzimler, transkripsiyon faktörler, hücre döngüsünü düzenleyici proteinler için tanımlanmıştır. Birçok *in vivo* hayvan modeli çalışmada mide, karaciğerde, kolonda, ön deride, ağız boşluğunda indüklenmiş karsinogenezin, timokinonun tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [103].

In vitro ve *in vivo* çalışmalarda *Nigella sativa* tohumlarındaki hem yağ hem de aktif madde olan timokinonun anti-kanser etkisinin gözlemlendiği belirtilmiştir. Bir çalışmada timokinonun doza bağlı olarak değişimiyle, hepatosellüler karsinoma hücrelerindeki çoğalmanın önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [104]. Pankreatik kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda ise timokinonun apoptozu arttırdığı tümör büyümesini inhibe ettiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda belirtilmiştir [105]. Ayrıca, anti-apoptotik Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-xL(B-cell lymphoma-extra large), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)' in negatif yönlü regülasyonunu, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax gibi pro-apoptotik moleküllerin de pozitif yönlü regülasyonunun sağladığı görülmüştür [105].

Timokinon ile yapılan başka bir çalışmada ise kolanjiokarsinom hücrelerinde etkisi araştırılmış olup hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş, *in vivo* modelde ise tümör büyümesi ve anjiogenezin inhibe edildiği belirtilmiştir. Ayrıca Bcl-2, COX-2 (Cyclooxygenase-2), AKT, p65, XIAP, VEGF (Vascular endothelial growth factor) gibi genleri negatif yönlü baskıladığı gözlenmiştir [106]. Yapılan diğer bir çalışmada, *Nigella sativa* tohumu yağı ve timokinonun, insan servikal kanser hücresi üzerindeki etkileri

incelenmiştir. HeLa hücre hatları kullanılan bu çalışmada timokinonun kanser hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe ettiğinin yanı sıra pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını indüklerken (BIK, FASL, BCL2L10 ve CASP1), kanser ve NFkB (Nükleer Faktör kapa B) sinyali ve kanserden sorumlu anti-apoptotik genlerdeki ekspresyon seviyesini de düşürdüğü belirtilmiştir [107].

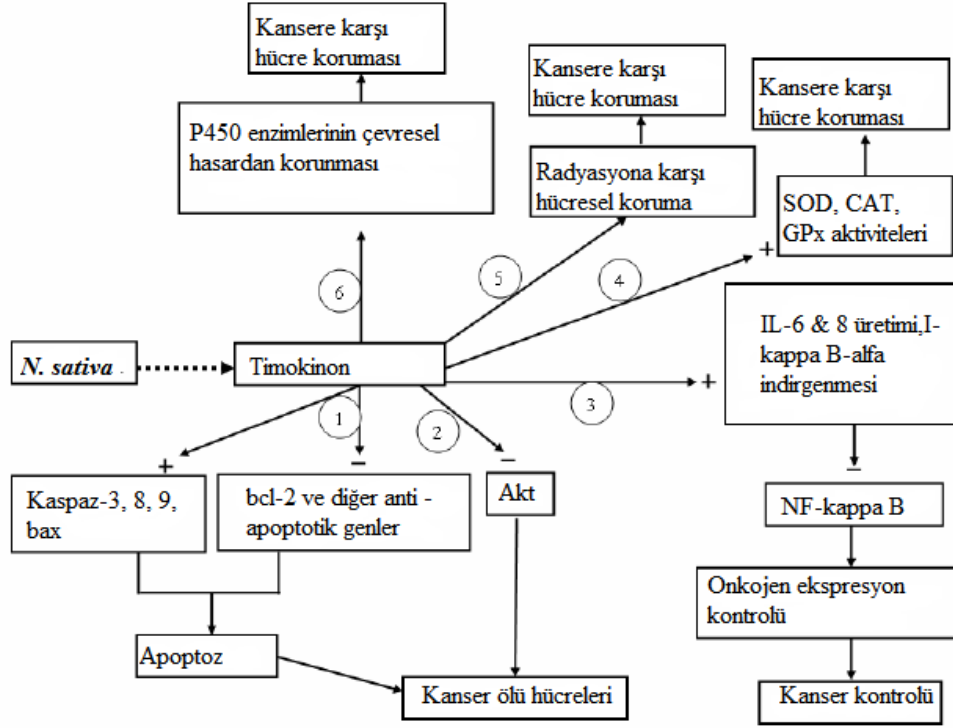
Bir diğer çalışmada ise, HL-60 insan miyoblastik kanser hücre hattı üzerine timokinonun etkisi araştırılmıştır [108]. Çalışma sonucunda timokinonun HL-60 hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği ve mitokondrinin membran yapısının bozulduğu, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivasyonlarının düzenlenerek apoptozun indüklendiği belirtilmiştir. Ayrıca, timokinon uygulanan HL-60 hücrelerinde proapoptotik Bax proteinini pozitif yönde düzenleyerek, anti-apoptotik protein olan Bcl2'yi de negatif yönde düzenleyerek Bax/Bcl2 oranının artmasına sebep olduğu belirtilmiştir [108].

Timokinonun A549 hücre hattı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada üç gün boyunca yapılan farklı konsantrasyon çalışmalarında hücre canlılığının doza bağlı azaldığı, kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonunun timokinona bağlı olarak aktive ettiği Bax/Bcl-2 aktivasyonlarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiş ve apoptatik modülatör olan p53 ekspresyonunun yukarı yönlü regüle ettiği belirlenmiştir ve timokinonun akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olabileceği öne sürülmüştür [99].

Timokinon ve A549 ile yapılan diğer bir çalışmada, timokinonun hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu inhibe etmede rol oynadığını, ayrıca PCNA, siklin D1, MMP2 ve MMP9 mRNA ve proteinin doza ve zamana bağlı bir şekilde ekspresyon seviyesini de inhibe ettiği belirtilmiştir, hücre döngüsü inhibitörü P16 ekspresyonu ve MMP2 ve MMP9'un jelatinaz aktiviteleri de timokinon tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği ayrıca ERK1/2'nin fosforilasyonunu azalttığı; bununla birlikte, timokinonun A549 hücreleri üzerindeki proliferasyon ve istila önleyici etkileri, ERK1/2 inhibitörü PD98059 tarafından nötralize edildiği belirtilmiştir [100].

Yapılan diğer çalışmalarda timokinonun kanser koruyucu mekanizmaları araştırılmıştır. Timokinonun kanserli hücrenin sağ kalımını engellemek için Akt aktivasyonunu baskıladığı, onkojenik ekspresyonu kontrol etmek için NF-kappa B yolağını deaktive ettiği, kanserli dokulardaki apoptotik hücre ölümünü, apoptotik gen ifadelerini yukarı yönlü regüle ve anti-apoptotik gen ekspresyonunu aşağı yönlü regüle

ederek azalttığı, antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı, kanser tedavisinde normal hücreleri koruduğu, CYP450 enzimlerini hasardan koruduğu belirtilmiştir (Şekil 3.2) [109].



Şekil 3.2. Timokinonun kansere karşı muhtemel etki mekanizmaları [109]

3.2. Timokinonun Toksisitesi

Nigella sativa tohum ekstreleri düşük toksik etkiye sahiptir, yapılan çalışmalarda toksik etki oldukça yüksek dozlarda görülmüştür. *N. sativa* tohum ekstresi ile yapılan *in vivo* çalışmasında sıçanlara düzenli olarak deri altı enjeksiyon ile uygulanan uygulanan 50mg/kg'lık ekstrenin böbrek ve karaciğer enzimlerinin metabolik aktivitesinde 5 gün boyunca 50mg/kg ekstrenin önemli bir sorun teşkil etmediği belirtilmiştir [110]. Oral yol ile uygulanan 10ml/kg tohum ekstresinin uygulama sonrası herhangi bir ölüme veya karaciğer enzimlerine belirlenmiş toksik etkisi görülmemiştir [91, 111].

Fareler ile yapılan oral timokinon uygulanmasında lethal doz oranı (LD50) değeri 2,4 g/kg olarak hesaplanmıştır. Sıçanlar ile yapılan yüksek doz (2-3 g/kg) uygulamasının ardından başta kalp, karaciğer ve böbrek gibi dokularda indirgenmiş GSH miktarında belirgin bir azalma görülmüştür. Laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin fosfokinaz, (ALT)

gibi çeşitli enzimlerin katalitik etkisinde timokinon uygulaması sonucu belirgin artışlar gözlenmiştir [112].

Farklı dozlarda (4, 8, 12,5, 25 ve 50 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanan timokinonun LDH, aspartat transaminaz (AST) ve alanin amino transferaz, enzim aktiviteleri üzerine önemli değişiklikler oluşturmadığı belirlenirken LD50 90,3 mg/kg olarak hesaplanmıştır [113].

LD50 değerinin belirlenmesi için fareler ile yapılan intraperitoneal uygulanan timokinon çalışmasında, LD50 değeri 104,7 mg/kg olarak bulunurken oral uygulamada LD50 değeri 870,9 mg/kg olarak bulunmuştur. Sıçanda ise LD50 değeri intraperitoneal uygulama için 57,5 mg/kg, oral uygulamada ise 794,3 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Oral olarak uygulandığında timokinonun daha güvenli olduğu tespit edilmiştir [114].

Fareler ile yapılan akut toksisite çalışmalarında, oral olarak timokinon uygulamasında LD50 2,4 g/kg, sıçanlarda intraperitoneal uygulama ile LD50 değeri 10 mg/kg olarak tespit edilmiştir (98,99). Yapılan diğer bir *in vivo* çalışmada farelerdeki ve sıçanlardaki intraperitoneal LD50 değeri sırasıyla 104,7 mg/kg ve 57,5 mg/kg olarak belirlenirken, oral LD50 değerleri fare ve sıçan için sırasıyla 870,9 mg/kg ve sıçanlarda ise 794,3 mg/kg olarak bildirilmiştir [114].

Çörek otu yağı ile sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, erkek sıçanlara 14 hafta boyunca 200 mg/kg/ gün olarak verilen çörek otu yağının dalak, böbrek, karaciğer, ve diğer organlar incelendiğinde patolojik olarak herhangi bir önemli değişikliğe neden olmadığı ve biyokimyasal olarak önemli bir değişiklik görülmediği tespit edilmiştir [87].

Üreme toksisitesini belirlemek için sıçanlar ile yapılan intraperitoneal uygulamada gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz miktarı 15 mg/kg olarak bulunmuştur [115]. Erkek ve dişi sıçanlar üzerinde yapılan intraperitoneal timokinon uygulama sonucu maksimum tolere edilen doz erkek sıçanlar için 22,5 mg/kg, dişi sıçanlar için ise 15 mg/kg; oral olarak verildiğinde ise erkek ve dişi sıçanda 250 mg/kg olarak ölçülmüştür [44]. Timokinonun yüksek doz olarak akut 2 g/kg veya üstü uygulandığında solunum güçlüğü ve hipoaktivite belirtileri gözlenmiştir [112, 116].

Hamilelik ve emzirme döneminde dermal ve oral etkisine dair yeterli araştırma ve veri olmadığında kullanımı güvenli değildir. Yapılan çeşitli *in vivo* çalışmalarda timokinonun uterus düz kas kasılmasını konsantrasyona bağımlı olarak inhibe ettiği

belirtilmiştir [117]. Hamilelik döneminde timokinonun anti-anjiyojenik etkisi yüzünden kullanımının riskli olduğu bildirilmiştir [66].

4. *NIGELLA DAMASCENA*

Nigella damascena 5 ile 25 arası sepali bulunan, yapraklar alternat, iplik gibi ve pinnat bölünmüştür. Sepali taşıyan çiçekler genelde mavi olmakla beraber beyaz, pembe ve soluk mor da olabilir (Görsel 4.1.). Halk dilinde Şam Çörek Otu olarak bilinir. Petaller, stamenlerin tabanında bulunur, küçük ve tırtıklı yapıdadırlar. Bitki her yıl aynı yerde büyür. Orta nemli geçirgen toprakta ve güneşli bir bölgede kolayca yetiştirilebilir. Yer değişikliğini karşı oldukça naziktir. Nem oranının aynı düzeyde olmasını tercih eder. Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında çiçek açar. Tohumlar Ağustos ile Ekim aylarında olgunlaşır. Çiçekler hermafrodit'tir ve 50 cm'ye kadar büyüyebilir [118, 119].

Tek yıllık bir bitki olan *Nigella damascena* Avrupa ve Asya kıtasında ılıman iklimime hakim olan yerlerde yetişmektedir. Tohumları şekil olarak *Nigella sativa* tohumlarına benzer ve karakteristik çilek aroması barındırır ve Asya yaygın gastronomisinde kullanılmaktadır. Literatürde *Nigella damascenanın* idrar söktürücü, östrojenik aktivite, etkisi bildirilmektedir [15, 118, 119]. *Nigella damascena* tohum içeriğindeki bileşikleri Tablo 4.1'de belirtilmiştir.



Görsel 4.1. “*Nigella damascena*” bitkisi (<https://landscapeofus.com/love-mist-nigella-damascena/>).

Tablo 4.1. *Nigella damascena* tohumları'nın içerik bileşikleri [119]

Bileşikler	(%)
a-copaene	0.1
p-elemene	38.4
P-caryophyllene	1.4
P-cadinene	0.3
germacrene D	0.1
p-selinene	0.6
a-selinene	0.6
viridiflorene	0.3
germacrene A	52.8
7-epi-a-selinene	0.1
methyl 2-amino-3- methoxyl benzoate	0.2
damascenine	0.1

5. MATERYAL METOT

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's High Glucose (Sigma Aldrich), Fetal sığır serumu (FBS) (Sigma Aldrich), Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich), EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) (Sigma Aldrich), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)(100gr) (Sigma Aldrich), Penisilin-Streptomisin (Sigma Aldrich), Tripsin-EDTA solution (Sigma Aldrich), Tıbbi Kullanım Amaçlı Etil Alkol (Aytaş), Timokinon (%99.97) (1gr) (BLD pharma), PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen), Cytotoxicity Detection Kit plus (LDH) (Roche)

5.2. Kullanılan Aletler, Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Buzdolabı (Bosch), Derin Dondurucu (-20oC, Liebherr), Derin Dondurucu (-86 °C, Nuair), Soğuk Sıkım Yağ Makinesi (Özel Üretim), Ultra Saf Su Cihazı (Sartorius), Orbital Platform Çalkalayıcı (HEIDOLPH), Vortex (HEIDOLPH), Su banyosu (Nüve), Otoklav (Eryiğit Tıbbi Cihazlar AŞ), Laminar akımlı kabin (Scanlaf), İnkübatör (CO2'li, Binder), Inverted Mikroskop (Olympus), Santrifüj (Hettich), Akış Sitometrisi (Accuri C6,

BD), Elisa Cihazı (BioTek), Hassa Terazı (Precisa), Ultra Performans Birleşim Kromatografisi (Waters), Kolon (Waters Acquity UPC2 HSS C18 1.9µm (3.0x150mm)), Mikropipetler (0.5-10, 2-20, 10-100, 100-1000µl'lik, 12 kanallı (30-300 µl) Ependorf), Pipet ucu (0.5-10, 20-200, 100-1000µl'lik Ependorf), Falkon Tüp (15-50ml'lik, ISOLAB), Pipet 10ml (Capp), Santrifüj Tüpü (2ml, Ependorf), Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm², SPL Life Sciences) Cryovial tüp (Greiner bio one), Rezervuar Kabı (ISOLAB), Otoklav Şişesi (ISOLAB), Mikrofiltre (Sartorius), Enjektör (5-15ml, AYSET)

5.2.1. Kullanılan araç ve gerecin hazırlanması

Yapılan çalışmalarda gerekli olan bazı plastik ve cam malzemeler ile sıvılar alüminyum folyo ile uygun şekilde sarılarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan yağlar ise 20µm şırınga mikrofiltre yardımı ile filtrelenmiştir.

5.3. Yöntem

5.3.1. Yağların eldesi

Nigella sativa ve *Nigella damascena* tohumları Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından temin edilmiştir. Her iki türünde tohumları bir soğuk sıkım makinası ile bir Süperkritik CO₂ Ekstraksiyon (SFE) cihazı ile ayrı olarak elde edilmiştir. Önce *Nigella sativa* tohumları yaklaşık 100gr tartıldı ve soğuk sıkım makinasından yaklaşık 20gr yağ elde edilmiştir. Elde edilen yağ 50ml corning tüpte 1200 devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve ağzı parafinli bir şekilde karanlık ortamda deneylere kadar muhafaza edilmiştir. Aynı işlem *Nigella damascena* içinde yapılmıştır. SFE yağı eldesi için Çörek Otu tohumları bir havanda dövülmüştür ve SFE eldesi için Tablo 5.1'de belirtilen değerler uygulanmıştır ve yağ hekzan ile toplanmış ve hekzan'ın yağdan uzaklaştırılması için bir rotorlu evaporatör kullanılmıştır ve elde edilen yağ bir pipet yardımı ile toplanıp bir koyu renkli temiz şişede stoklanmıştır. Aynı işlem *Nigella damascena* içinde tekrarlanmıştır. Tüm yağlar kullanımına kadar ışık görmeyen bir ortamda saklanmıştır.

Yağ eldesi için kullanılan yöntemlerin en verimlisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, hindistan cevizi kullanılmış soğuk sıkım, ve soxhlet yöntemi karşılaştırılmış yapılan analizlerde yağ asidi içeriği incelendiğinde en verimli yöntem soxlet olmasına rağmen süper kritik akışkan ekstraksiyon yöntemi ile arada önemli bir farkın olmadığı ve gereksiz çözelti kullanmaya gerek olmaması ve içerik bakımından yüksek verimlilik sağlaması nedeniyle SFE yönteminin en verimli yöntem olduğu belirtilmiştir [120].

Sıkım yöntemlerini içerik verimliliği bakımından karşılaştıran diğer bir çalışmada ise çay tohumları soğuk sıkım ve süper kritik akışkan ekstaksiyonu ile sıkılarak içerikleri incelenmiş ve SFE yöntemi ile elde edilen yağların soğuk sıkıma göre daha yüksek oranda skualen, lupeol ve toplam sterol oranları içerdiği belirlenmiş daha yüksek antioksidan tespit edildiği belirtilmiştir [121].

Tablo 5.1 Süper Kritik Yağ Eldesi Prosedürü

Adım	CO ₂ Akışı(ml/dk)	Ekstraksiyon Sıcaklığı	Ekstraksiyon Basıncı	Dinamik Süre1(dk)	Statik Süre (dk)	Dinamik Süre2 (dk)
1	5.00	40	250	15.00	20.00	15.00
2	5.00	40	250	0.00	20.00	20.00

5.3.1.1. Yağlardaki timokinon oranı ve ölçümü

Yağların içindeki timokinon oranlarını hesaplamak için Waters Acquity UPC2 sistemi kullanılarak UV spekturumuna (PDA) göre tespit edilmiştir. Yağ numunelerinin %4' lük çözeltisi 2-isopropil alkol ile hazırlanıp, sisteme 1µl enjekte edilmiştir. Tablo 5.2'de timokinon ölçümü için gerekli kromatografik koşullar ve Tablo 5.3'de yağların türlere ve elde edilme yöntemine göre içeriğinde bulunan timokinon oranı belirtilmiştir.

Tablo 5.2. Kromatografik Koşullar

Sistem: Waters Acquity UPC ²
Kolon: Waters Acquity UPC ² HSS C18 1.9µm (3.0x150mm)
Kolon Sıcaklığı: 40°C
Mobil Faz: %94 CO ₂ - %6 MeOH (% 0.1Formik Asit) 0.6mL/dk
Geri Basınç: 200psi
Enjeksiyon Sıcaklığı: 15°C
Dedektör: 1) PDA 3 Boyut: 210-500nm tarama 2 Boyut: 238 nm

Tablo 5.3. Verim ve yağlardaki timokinon oranı

Yağ Türü	Tohumdan Elde Edilen Yağ Verimi %	Timokinon Miktarı mg /100mg
<i>Nigella sativa</i> Soğuk Sıkım	15-20	1,99
<i>Nigella sativa</i> Süper Kritik	8	4,45
<i>Nigella damascena</i> Soğuk Sıkım	12,1	Tespit Edilemedi
<i>Nigella damascena</i> Süper Kritik	2,8	Tespit Edilemedi

5.3.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Hücre kültüründe hücre hattı olarak Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection: ATCC) temin edilen insan akciğer kanser hücreleri (A549, ATCC® CCL-185™) kullanılmıştır. Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda 5×10^3 hücre olacak şekilde %10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama

alışması için 37°C’de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 saat 37°C’de CO2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %0,1’i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde %0,1 olacak şekilde 1 ml içinde 1 µl DMSO’da verilmiştir.

5.3.3. Elde edilen yağların ve timokinon için gerekli konsantrasyonun belirlenmesi

Çörek otu yağlarının ana stok çözeltisinin hazırlanmasında daha önceden yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak, çörek otu yağları 20 µg /ml DMSO çözeltisi içinde hazırlanmıştır (97). Yağların gerekli dozların hesaplanması için tüm yağların 1ml’deki ağırlıkları ölçülmüştür. Ölçülen ağırlık oranlarına göre çözücü olarak kullanılan DMSO ve medium oranları hesaplanmıştır. Timokinon için ana stok çözeltisi için 8,21mg tartılıp 500µl DMSO içerisinde çözdürülerek hazırlanmış, çörek otu yağlarının ve timokinonun ana stoğunda toksik sınır olan 1/1000 oranı aşılmamıştır, ardından deneylerde kullanılacak olan dilüsyonlar taze besiyeri ile seri dilüsyonlar, yapılarak hazırlanmıştır. *Nigella sativa* yağları için 50 µg /ml, 100 µg /ml, 200 µg /ml ve 400 µg /ml, *Nigella damascena* yağları için 25 µg /ml, 50 µg /ml, 100 µg /ml, 200 µg /ml, timokinon için ise 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM olarak belirlenip taze olarak hazırlanmıştır.

5.4. Sitotoksite deneyleri

5.4.1. Mtt ile mitokondriyal aktiviteye dayalı sitotoksik etkinin belirlenmesi

Farklı yöntemlerle elde edilen çörek otu tohumunun yağları ve satın alınan timokinon ana stokları belirlenen doz miktarlarına göre MTT deneyi için taze olarak hazırlandı. MTT deneyi için 24 saat öncesinden 96 kuyucuklu plakanın, her bir kuyucuğa 5 bin hücre ekim yapıldı ve 24 saat bekletildi. Test maddeleri ile 24 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5mg/ml MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözülme formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için karbondioksit inkübatöründe 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası

uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mosmann 1983).

5.4.2. LDH testi

LDH salım testi olarak da bilinen LDH testi, bir hücre popülasyonunda plazma zarı hasarı seviyesini değerlendirmek için kullanılan bir hücre ölümü, sitotoksosite deneyidir [116].

Yapılan MTT çalışması sonrası belirlenen dozlar, kontrol ve çözücü kontrol olan DMSO içeren mediumlar 96 kuyucuklu plakadan çekilerek diğer bir boş plakaya aktarıldı ve deney esnasına kadar -20 °C de bekletildi. Deney yapılmadan bir gün önce, -20 °C de tutulan 96'lı plaka +4 °C ye taşındı ve mediumların erimesi sağlandı.

LDH için gerekli olan doz seçimleri MTT sonuçlarına bakılarak değerlendirildi ve her bir doz, kontrol ve DMSO grubu için 4 adet kuyucuk seçildi ve bu kuyucuklarda bulunan mediumlardan 50 µl alınıp başka bir 96'lı plakaya aktarıldı, daha sonra üzerlerine ışık görmeyen bir ortamda her bir kuyucuğa 50 µl Cytotoxicity Detection Kit (LDH) Dye solution ilave edildi ve 37 °C'de, 30 dakika boyunca bekletildi. 30 dakika bekletilen plaka yine ışık görmeyen bir ortama alınarak her bir kuyucuğa 25 µl Stop solution ilave edildi ve 492 nm'de Elisa cihazında okutuldu.

5.5. Çörek Otu Yağlarının ve Timokinonun A549 Hücre Hattındaki Kaspaz-3 Aktivasyonunun Akış Sitometrisi ile Belirlenmesi

Kaspaz-3 aktivitesinin araştırılması için MTT deneyi ile belirlenen uygun dozların uygulanması için 6 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa yaklaşık 300.000 bin hücre ekildi ve protokol gereği ulaşılması gereken hücre sayısının elde edilmesi için 48 saat boyunca plaka inkübatörde tutuldu ve bu sürenin sonunda plaka kabin içine alınarak üzerindeki eski medium çekili ve hücrelerin üzerine taze olarak hazırlanmış kontrol ve dozlar ilave edildi, ilave edilen dozlar timokinon için 100 µM, *Nigella sativa* soğuk sıkım ve süper kritik için 200 µg /ml, *Nigella damascena* soğuk sıkım ve süper kritik için 200 µg /ml

olarak belirlendi. Kaspaz-3 aktivasyonu için uygulanan adımlar sırasıyla aşağıdaki protokole göre uygulandı;

24 saatlik deney için yapılan doz uygulaması sonrası kontrol ve doz içeren hücrelerin mediumları ayrı tüplere toplandı ve hücrelerin üzerine 80µl Tripsin-PBS EDTA ilave edilip 2 dakika inkübatörde tutuldu ve hücrelerin kalması sağlandı ve hücreler sayıldı ve protokol gereği 0,5 ml'de 1 milyon hücre olacak şekilde hücreler toplandı.

Toplanan hücreler 5G de 5 dakika santrifüj edildi ve üzerindeki medium uzaklaştırıldı, daha sonra üzerlerine 0,5 ml soğuk PBS ilave edilip tekrar 5G de 5 dakika santrifüj edildi ve tekrar PBS çekilip PBS ile yıkanıp santrifüj edildi. İkinci kez PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 0,5 ml Cyt/Cyt buffer solüsyonu eklendi ve hücreler süspansiyon hale getirilerek buz içinde 20 dakika boyunca bekletildi.

20 dakika buz içerisinde bekletilen hücreler 5G'de 5 dakika santrifüj edildi ve Cyt/Cyt buffer uzaklaştırıldı. Hücreler daha önce hazırlanan her bir örnek için (1x) 0,5ml p/w buffer solüsyonu ile 2 kez yıkanıp santrifüj edildi ve buffer uzaklaştırıldı.

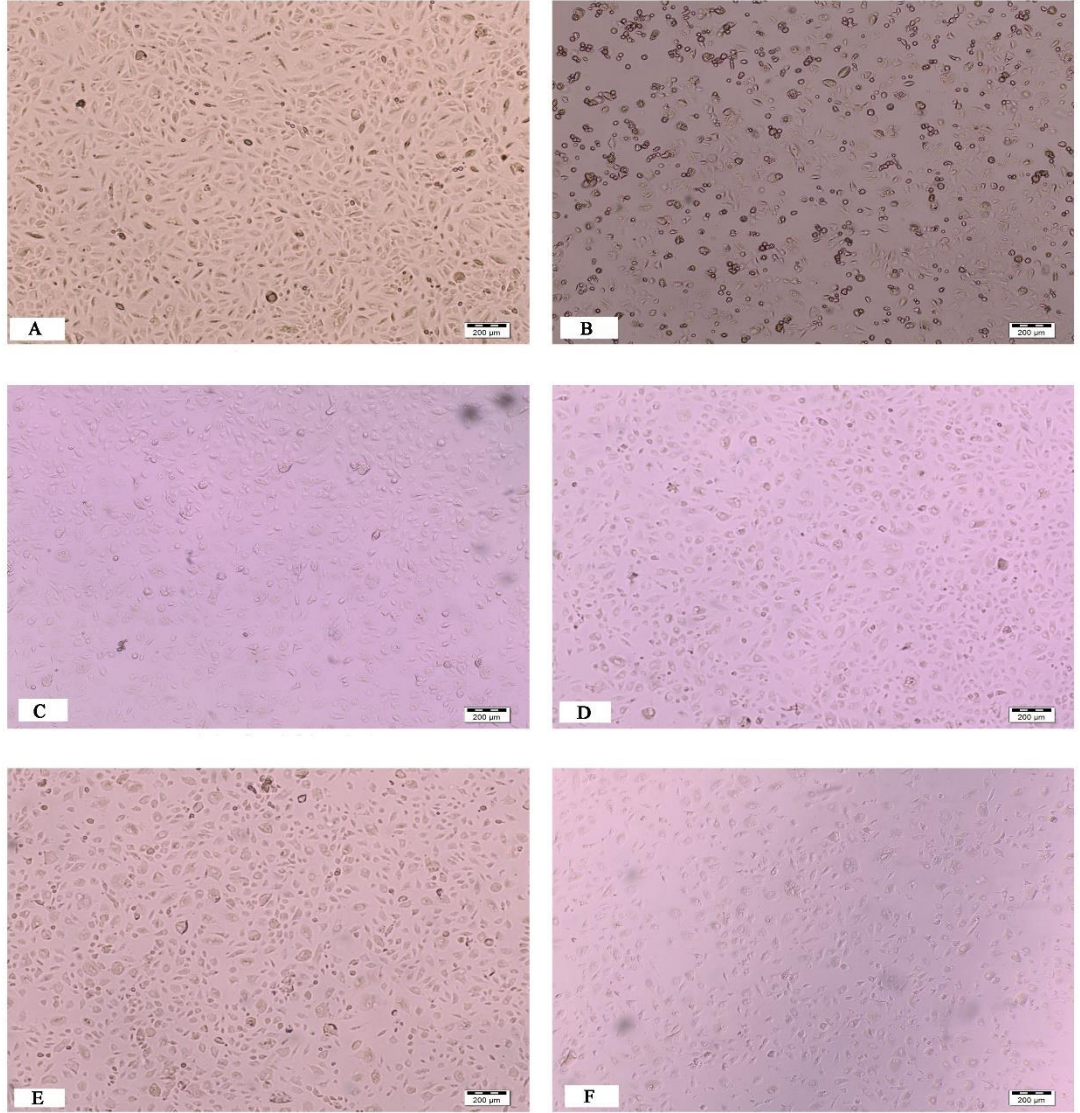
Ayrı bir eppendorf tüpüne her bir örnek için 100µl (1x) p/w buffer ve 20µl antibody ilave edildi ve pipetlendi. Hazırlanan solüsyondan her bir örneğe 120µl ilave edilip pipetlenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında ışık görmeyen bir ortamda 30 dakika bekletildi.

30 dakika ardından örneklerin üzerlerine 1000µl (1x) p/w ilave edildi ve 5G'de 5 dakika santrifüj edildi ve üzerindeki buffer uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerine 500 µl (1x) p/w ilave edildi ve hücreler süspansiyon hale getirilip Akış Sitometrisi cihazında kaspaz-3 aktivasyonu ölçüldü.

6. BULGULAR

6.1. MTT Bulguları

Timokinon ile *Nigella sativa* soğuk sıkım, *Nigella sativa* süper kritik sıkım, *Nigella damascena* soğuk sıkım ve *Nigella damascena* süper kritik sıkım yağları A549 hücre hattı üzerindeki 24 saat uygulanarak hücre canlılığı MTT testi ile araştırılmıştır. Yapılan hücre canlılığı testindeki hücrelerin morfolojik yapıları Görsel 6.1.'de yer verilmiştir.

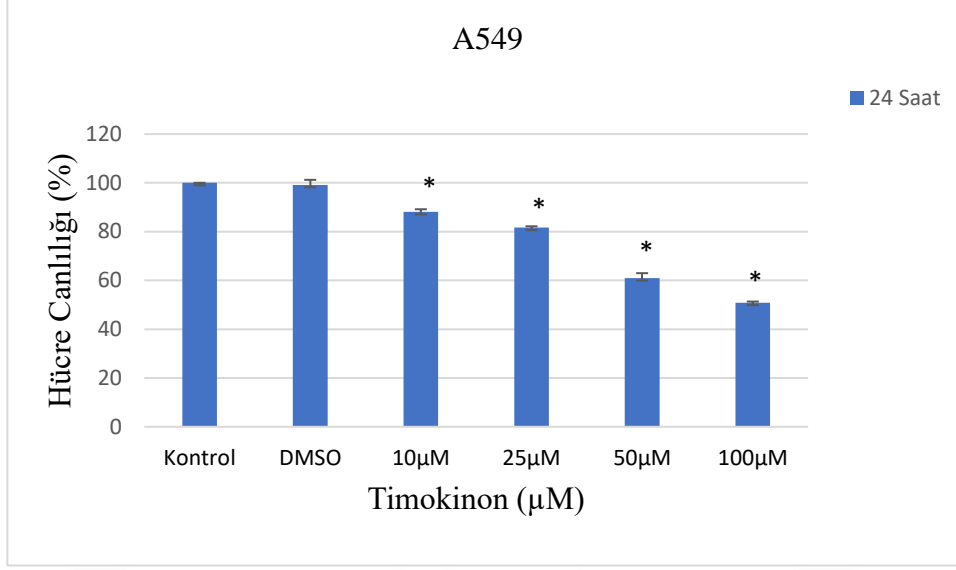


Görsel 6.1. A549 hücre hattı, inverted mikroskop görüntüleri (24 saat).

A) Kontrol, B) Timokinin (100 µM), C) *Nigella sativa* soğuk sıkım (200 µg/ml),
D) *Nigella sativa* süper kritik sıkım (200 µg/ml), E) *Nigella damascena* soğuk sıkım (200 µg/ml), F) *Nigella damascena* kritik sıkım (200 µg/ml).

6.1.1. Timokininun A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları

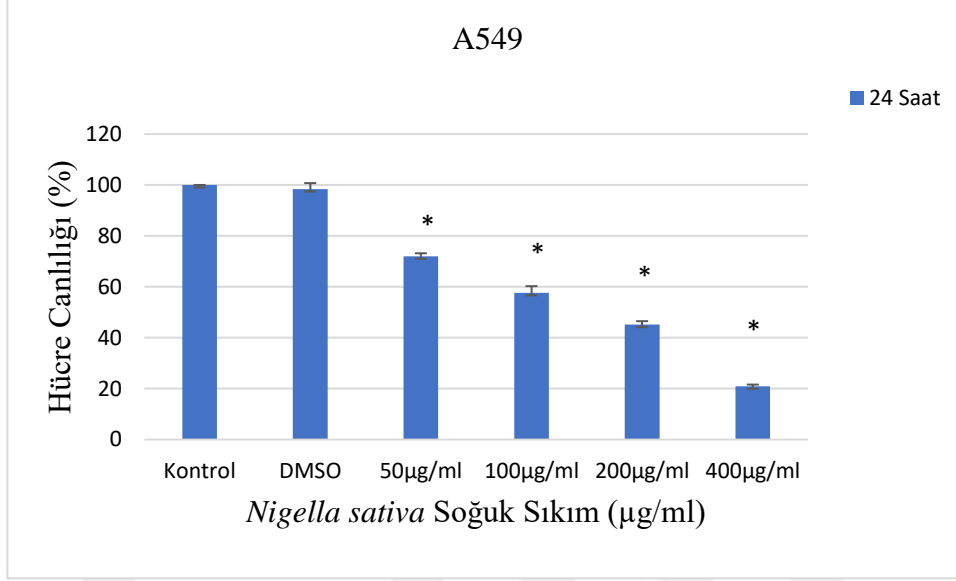
Timokininun A549 hücrelerine 10-25-50-100 µM 24 saat boyunca uygulanmış. Uygulama sonrası kontrol grubuna göre 10µM yaklaşık %12, 25µM yaklaşık %19, 50µM yaklaşık %40, 100µM %50 oranında hücre canlılığında azalma göstermiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Timokinonun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

6.1.2. *Nigella sativa* soğuk sıkımının A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları

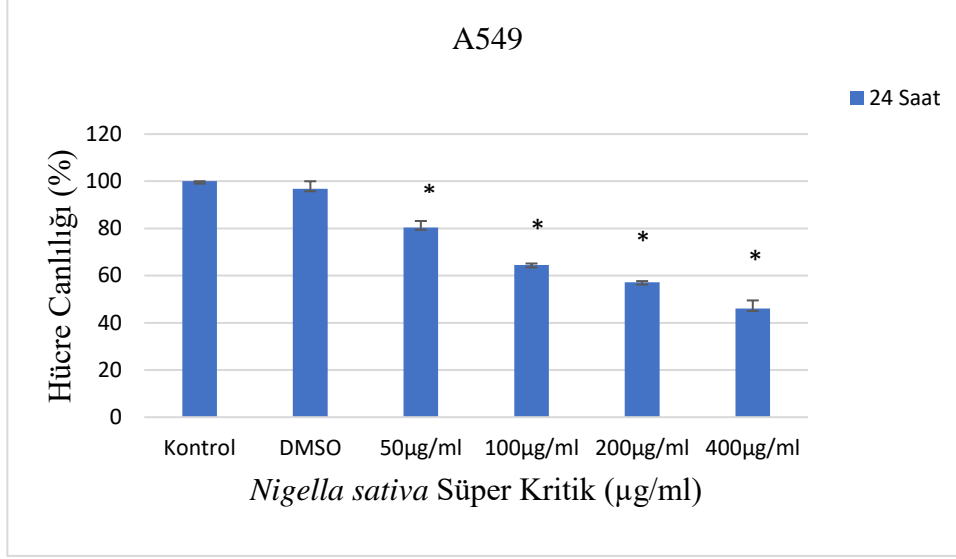
Nigella sativa soğuk sıkımının A549 hücrelerine 50-100-200-400 µg /ml 24 saat boyunca uygulanmış. Uygulama sonrası kontrol grubuna göre 50 µg /ml de yaklaşık %30, 100 µg /ml de %45-%50, 200 µg /ml de %55 ve 400 µg /ml de %80 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. *Nigella sativa* soğuk sıkımının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

6.1.3. *Nigella sativa* süper kritik sıkım'ın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları

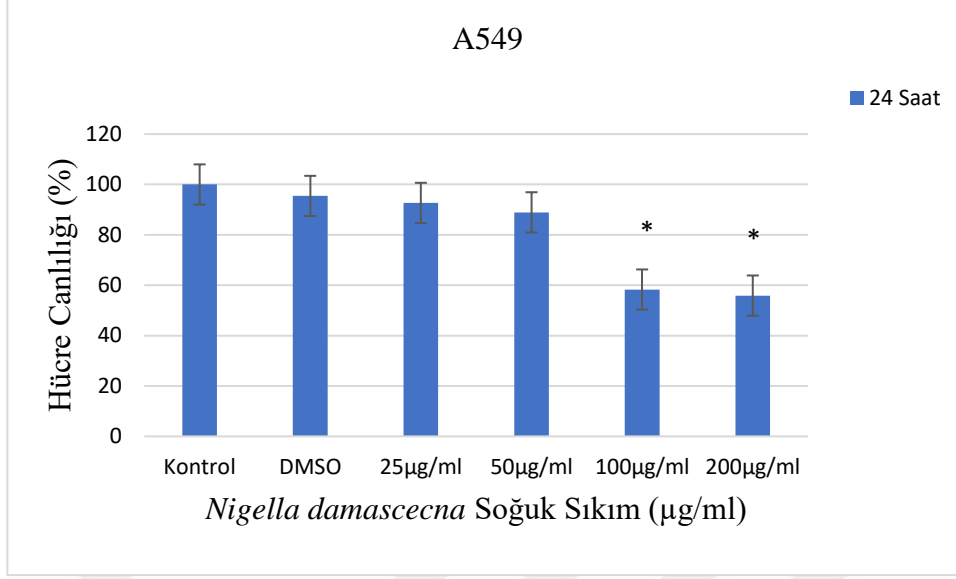
Nigella sativa soğuk sıkımının A549 hücrelerine 50-100-200-400 µg /ml 24 saat boyunca uygulanmış. Uygulama sonrası kontrol grubuna göre 50 µg /ml de yaklaşık %20, 100 µg /ml de %35, 200 µg /ml de %45-%50 ve 400 µg /ml de %55 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. *Nigella sativa* süper kritik sıkkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$)

6.1.4. *Nigella damascena* soğuk sıkkım'ın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları

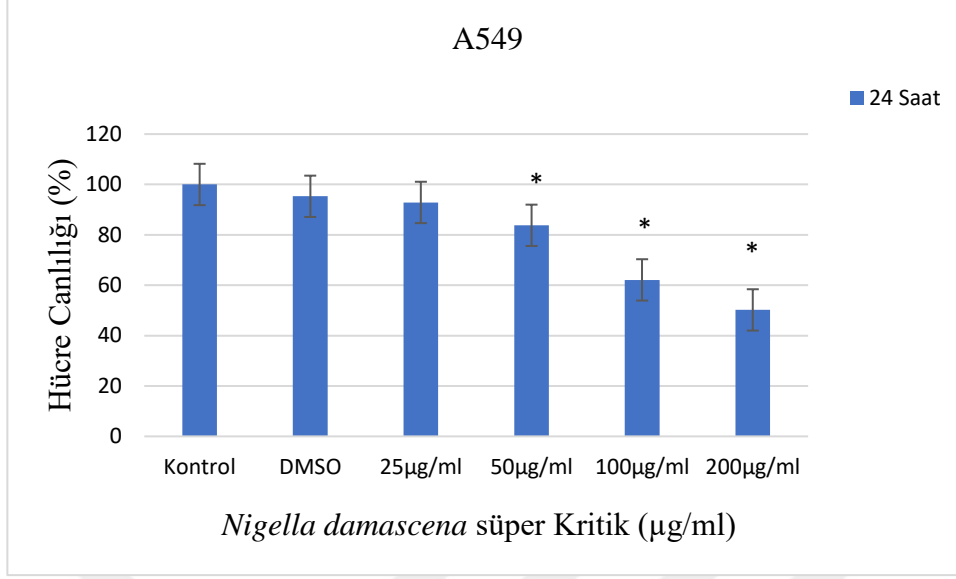
Nigella damascena soğuk sıkkımın A549 hücrelerine 25,50,100,200 µg /ml 24 saat boyunca uygulanmış. Uygulama sonrası kontrol grubuna göre 25 µg /ml de yaklaşık %8, 50 µg /ml de yaklaşık %11, 100 µg /ml de yaklaşık %40, 200 µg /ml de ise yaklaşık %45 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. *Nigella damascena* soğuk sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

6.1.5. *Nigella damascena* süper kritik sıkımın A549 hücrelerinde sitotoksik etki MTT bulguları

Nigella damascena süper kritik sıkımın A549 hücrelerine 25,50,100,200 µg /ml 24 saat boyunca uygulanmış. Uygulama sonrası kontrol grubuna göre 25 µg /ml de yaklaşık %8, 50 µg /ml de yaklaşık %17, 100 µg /ml de yaklaşık %38, 200 µg /ml de ise yaklaşık %50 oranında hücre canlılığında azalma görülmüştür (Şekil 6.5).



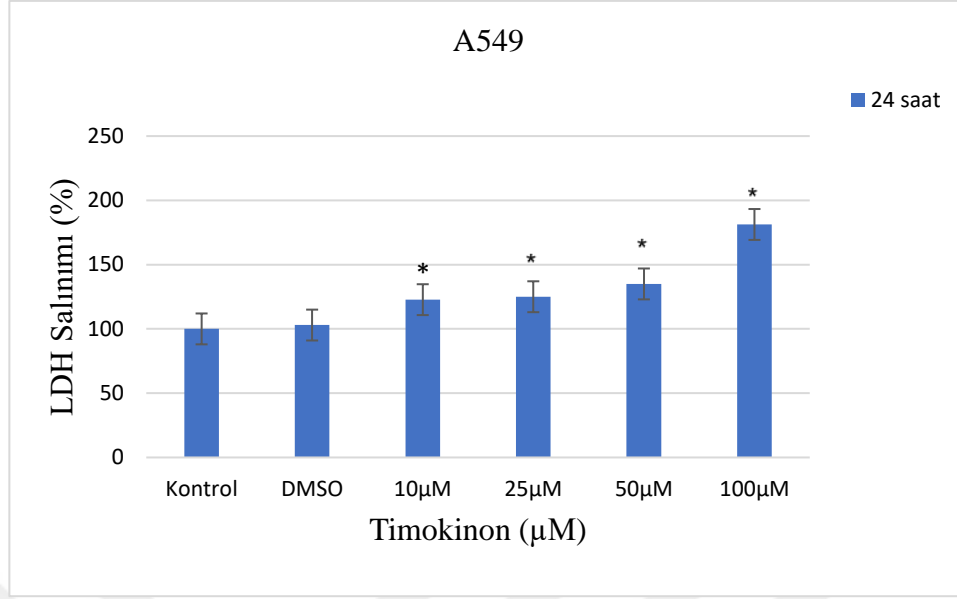
Şekil 6.5. *Nigella damascena* süper kritik sıklım A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. ((*)) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$)

6.2. LDH Bulguları

Yapılan LDH çalışmalarında sırasıyla timokinon, *Nigella sativa* soğuk sıklım, *Nigella sativa* süper kritik sıklım, *Nigella damascena* soğuk sıklım, *Nigella damascena* süper kritik sıklımın farklı konsantrasyonları 24 saat süreyle uygulanarak dış ortama salınan Laktat dehidrojenaz enzim salınımı LDH testi ile araştırılmıştır ve grafikleri SPSS One-Way Anova ile hesaplanmıştır.

6.2.1. Timokinonun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları

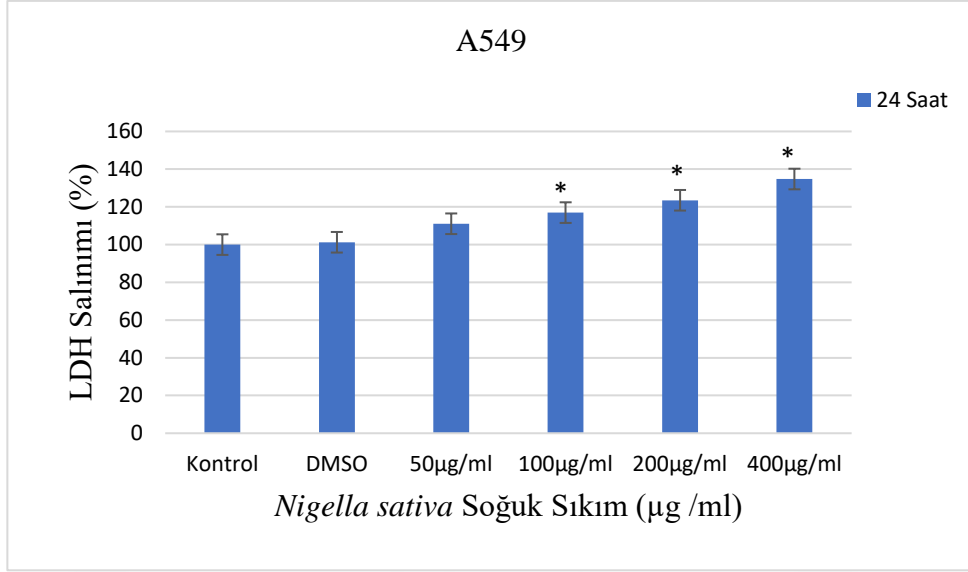
Timokinon ile yapılan LDH çalışmasında 10 µM timokinon için LDH salınımı kontrole göre yaklaşık %22, 25 µM için %25ve 50 µM için %35 en yüksek doz olan 100 µM için ise %81 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 6.6).



Şekil 6.6. Timokinonun A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

6.2.2. *Nigella sativa* soğuk sıkım'ın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları

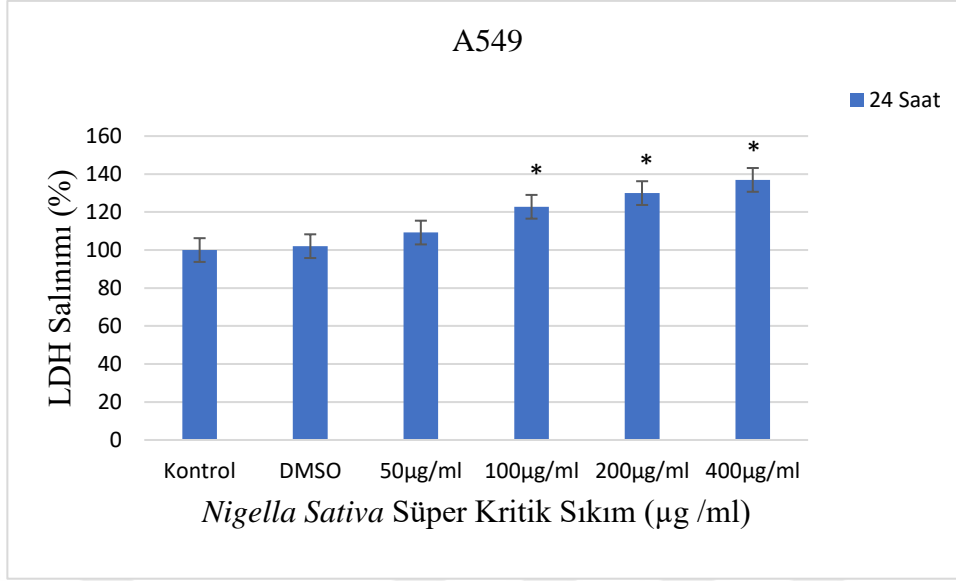
Nigella sativa soğuk sıkım ile yapılan LDH çalışmasında kontrol grubuna göre 50 µg /ml'de yaklaşık %10, 100 µg /ml'de %17, 200 µg /ml'de %23, ve 400 µg /ml'de ise yaklaşık %35 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. *Nigella sativa* soğuk sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$)

6.2.3. *Nigella sativa* süper kritik sıkım'ın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları

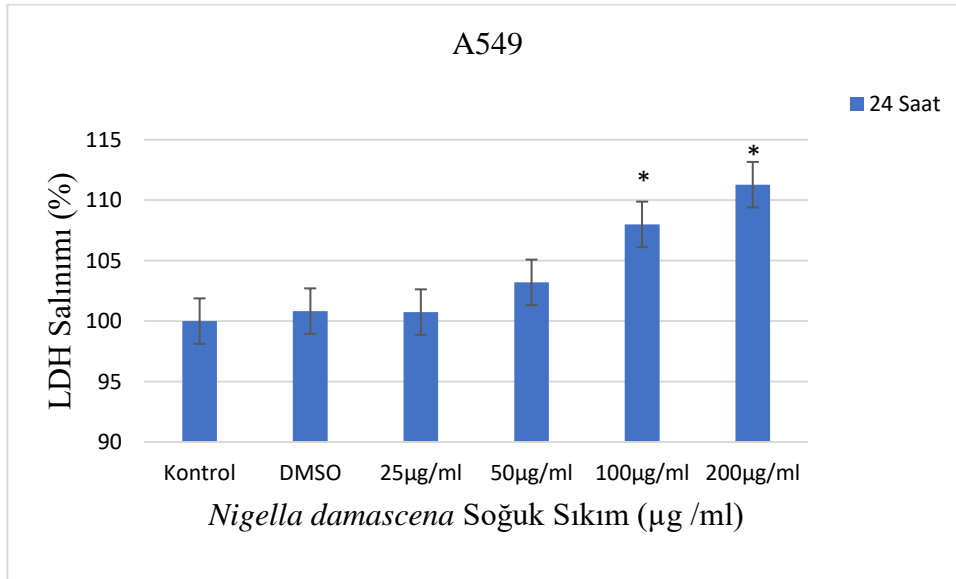
Nigella sativa süper kritik sıkım ile yapılan LDH çalışmasında kontrol grubuna göre 50 µg /ml'de yaklaşık %9, 100 µg /ml'de %22, 200 µg /ml'de %29, ve 400 µg /ml'de ise yaklaşık %36 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 6.8.).



Şekil 6.8. *Nigella sativa* süper kritik sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi. ((*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$)

6.2.4. *Nigella damascena* soğuk sıkımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları

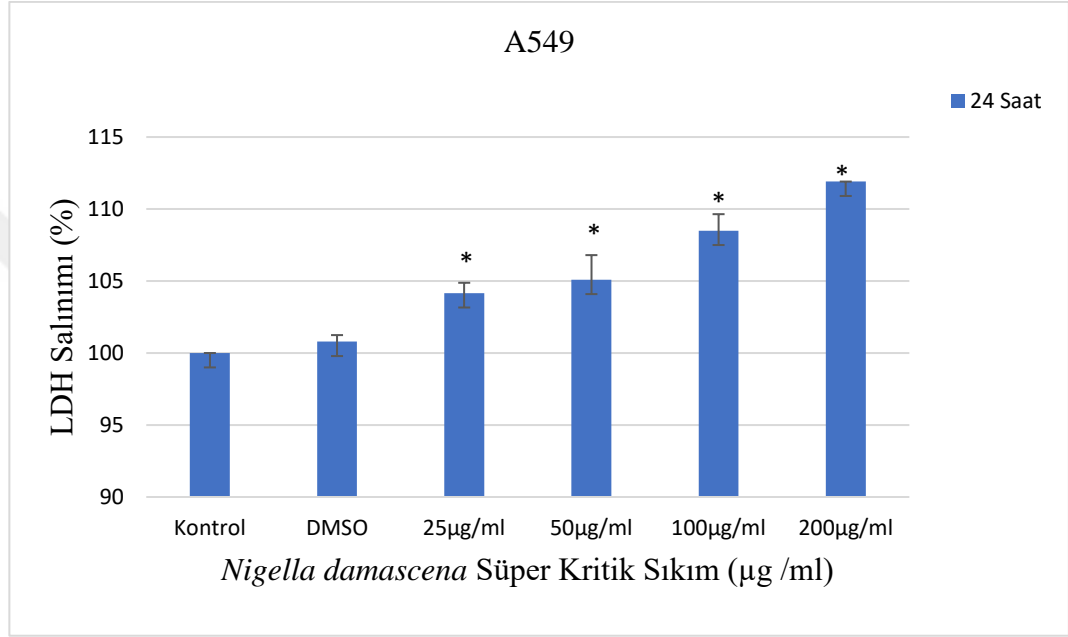
Nigella damascena soğuk sıkım ile yapılan LDH çalışmasında kontrol grubuna göre 25 µg /ml'de yaklaşık %0,7, 50 µg /ml'de yaklaşık %3, 100 µg /ml'de %8, 200 µg /ml'de %11 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 6.9).



Şekil 6.9. *Nigella damascena* soğuk sıkım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi. ((*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$)

6.2.5. *Nigella damascena* süper kritik sıklımın A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH bulguları

Nigella damascena soğuk sıklım ile yapılan LDH çalışmasında kontrol grubuna göre 25 µg /ml'de yaklaşık %4, 50 µg /ml'de yaklaşık %5, 100 µg /ml'de %8, 200 µg /ml'de %11 oranında artış gözlenmiştir (Şekil 6.10).

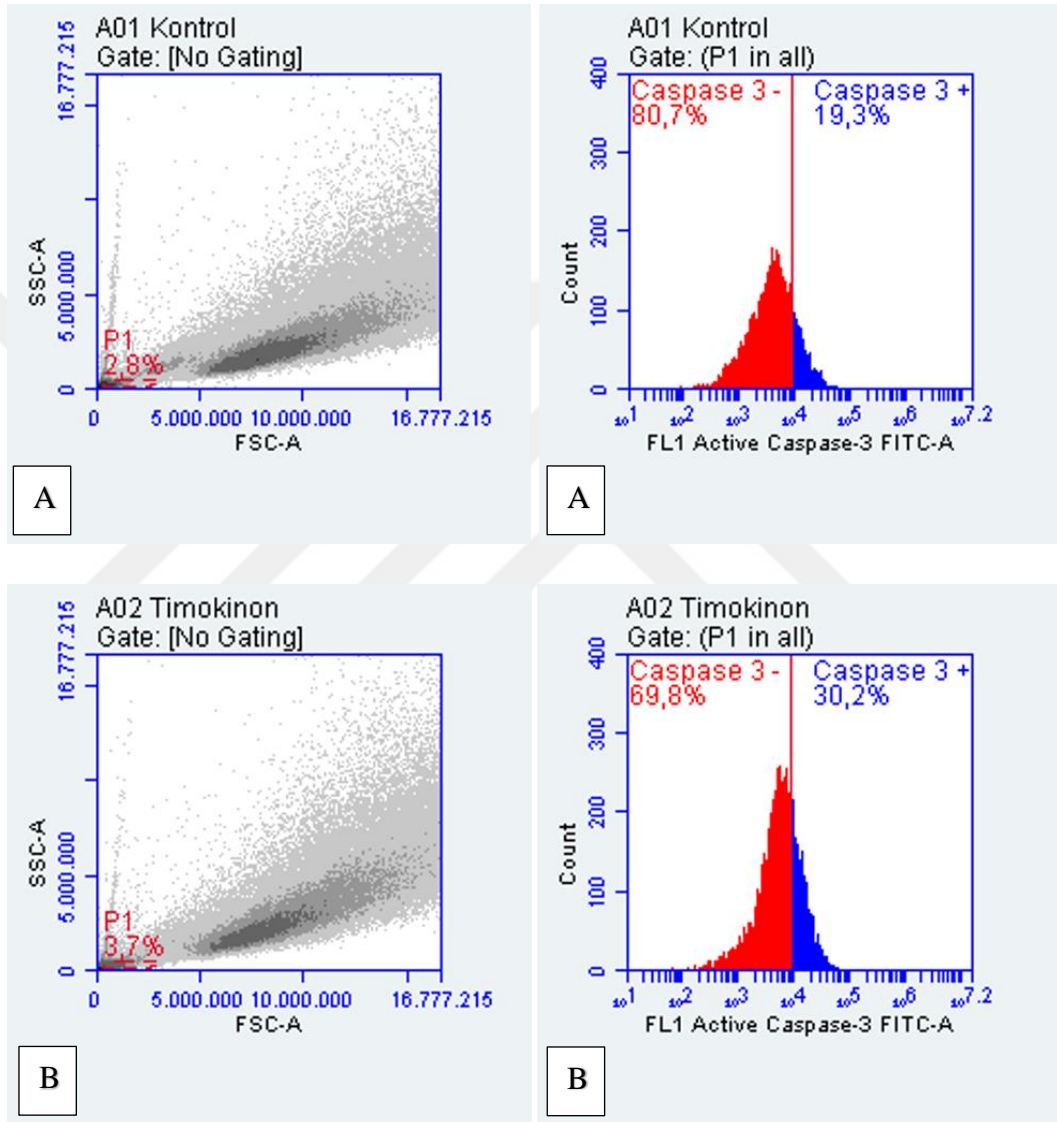


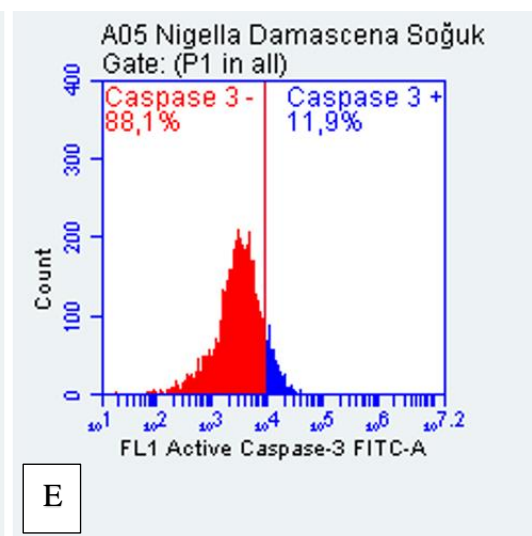
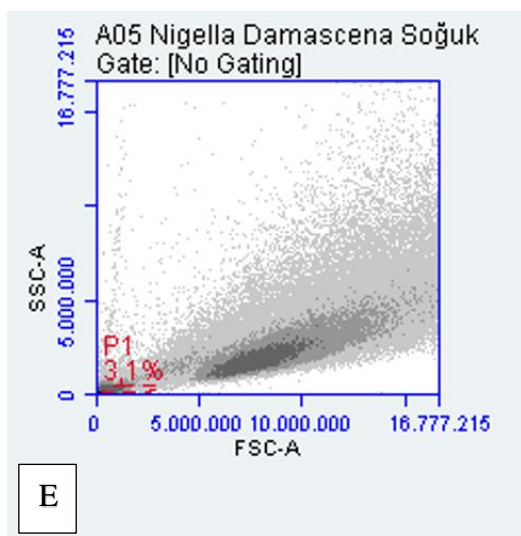
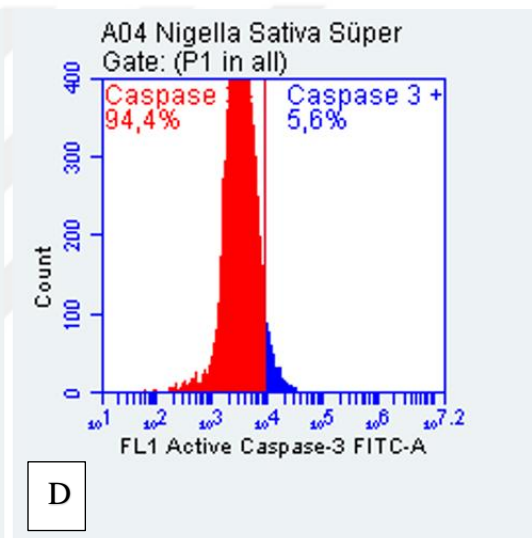
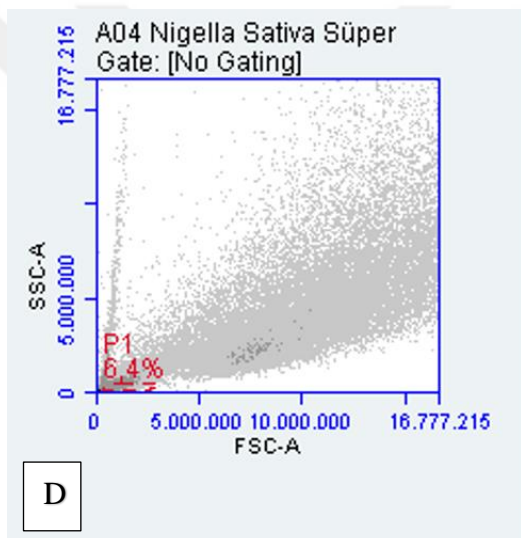
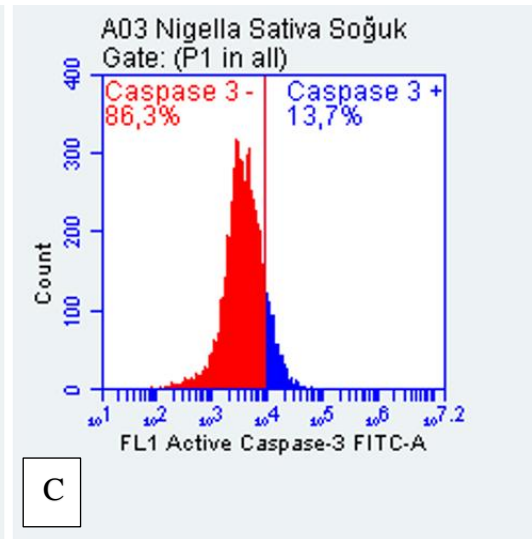
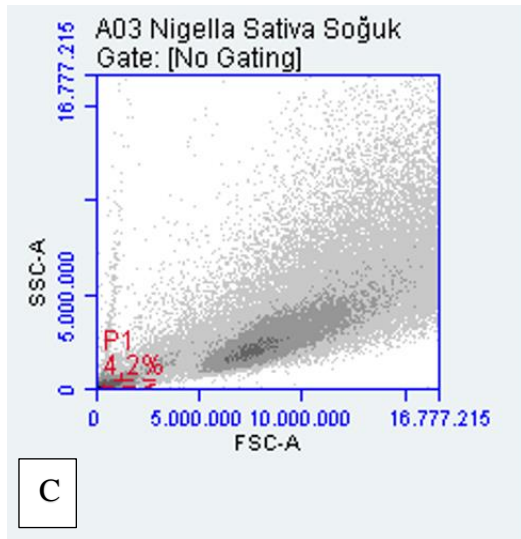
Şekil 6.10. *Nigella damascena* süper kritik sıklım A549 hücre hücreleri üzerine sitotoksik etkisi LDH testi ile değerlendirilmesi. ((*)) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

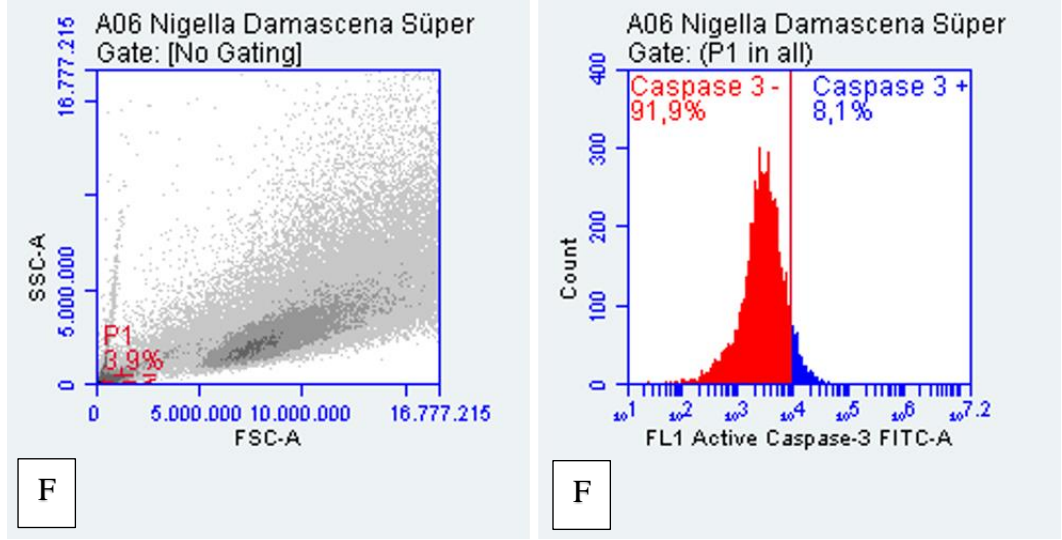
6.3. Kaspaz-3 Aktivasyonun Bulguları

Timokinon 100 µM, *Nigella sativa* soğuk sıklım 200 µg /ml, *Nigella sativa* süper kritik 200 µg /ml, *Nigella damascena* 200 µg /ml, *Nigella damascena* süper kritik 200 µg /ml konsatrasyonları 24 saat uygulama sonrası A549 hücrelerindeki meydana gelen apoptotik aktivite PE Active Caspase 3 Apoptosis kiti ile akış sitometrisi kullanılarak belirlenmiştir. Akciğer kanser hücre hattı olan a549 hücre hattı ile yapılan kaspaz-3 çalışmasında kontrol grubunun kaspaz-3 aktivasyonu kontrol grubunda (%19,3), timokinon (%30,2), *Nigella sativa* soğuk sıklım (%13,7), *Nigella sativa* süper kritik (%5,6), *Nigella damascena* soğuk sıklım (%11,9), *Nigella damascena* süper kritik (%8,1) olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmadaki kaspaz-3 aktivitesi sonuçları verilmiştir (Şekil

6.11.). Çalışma iki kez tekrar edilmiş ve kaspaz aktivitesi sonuçları SPSS ile analiz edilerek ortalamaları alınmış ve maddeler arasındaki farklar grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 6.12.). Kontrol gurunu için kaspaz-3 aktivitesi yaklaşık %15, timokinon için %28, *N.sativa* SK için %8,75, *N.sativa* SFE için %5, *N.damascena* SK için %7,9 ve *N.damascena* SFE için ise %8,1 olarak bulunmuştur.

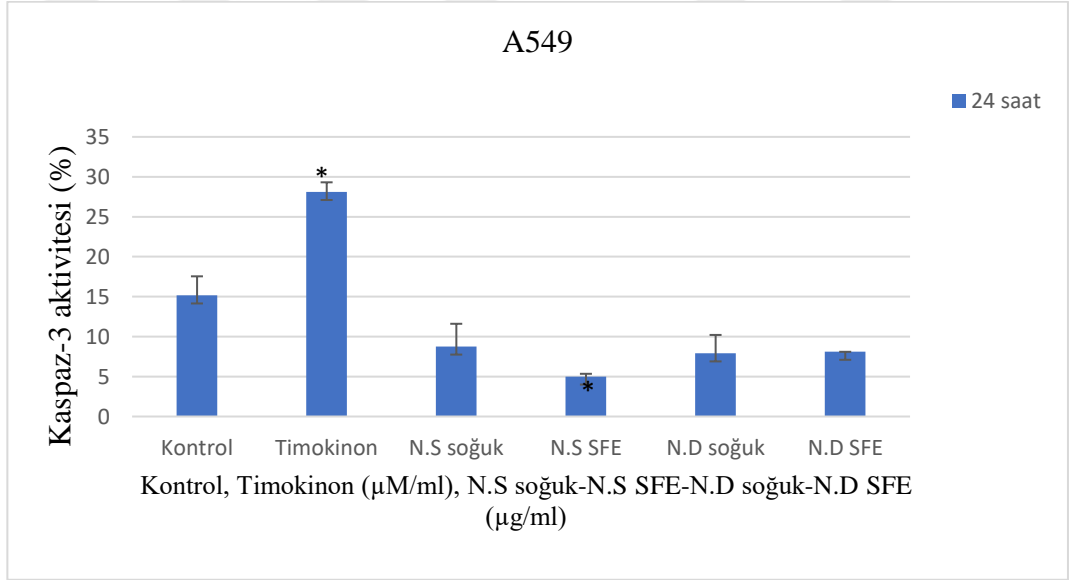






Şekil 6.11. Kaspaz-3 aktivitesi

A) Kontrol, B) Timokinon (100 μ M) Kaspaz-3 aktivitesi, C) Nigella sativa soğuk sıkım (200 μ g /ml) Kaspaz-3 aktivitesi, D) Nigella sativa süper kritik sıkım (200 μ g /ml) Kaspaz-3 aktivitesi, E) Nigella damascena soğuk sıkım (200 μ g /ml) Kaspaz-3 aktivitesi, F) Nigella damascena süper kritik sıkım (200 μ g /ml) Kaspaz-3 aktivitesi.



Şekil 6.12. Tekrarlanmış Kaspaz-3 aktivite SPSS analiz sonuçları

(Kontrol, Timokinon, N.S soğuk (Nigella sativa soğuk), N.S SFE (Nigella sativa süper kritik), N.D soğuk (Nigella damascena soğuk), N.D SFE (Nigella damascena süper kritik) (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

7. TARTIŞMA

Kanser günümüzde insan sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biri olup kanser insidansı dünya çapında hızla artmakta ve kanserin çoğu geç bir aşamada tespit edilmektedir. Geç evrede teşhis, kanser hastalarının hayatta kalma şansını önemli ölçüde azaltmaktadır. Mevcut antikanser ilaçları ilaç direncine ve olumsuz yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Doğal ürünler veya antikanser ilaçlarla birlikte doğal ürünlerin kullanımı daha yüksek etkinlik ve daha az yan etki gösterir. Antioksidan aktiviteye sahip doğal ürünlerin kullanımı, kanser gibi hastalıklarla mücadele için önemli rol oynamaktadır. Doğal ürünlerin antioksidan aktivitesi, serbest radikal süpürücü özelliği sayesinde hastalıkların patogenezi engeller [122].

Çörek otu başta Orta Doğu ile Uzak Doğu'da çeşitli hastalıkların tedavisinde ve gündelik kullanımda baharat ve tatlandırıcı olarak kullanılan doğal bir üründür. *Nigella sativa* tohum yağının aktif bileşeni olan timokinon ise günümüzde birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda çeşitli hastalıklara karşı etkinliği kanıtlanmıştır [122].

Çörek otu yağı günümüzde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından tarafından genellikle güvenli olarak kabul edilir ve hem gıda hem de doğal ilaç olarak pazarlanmaktadır. Genellikle soğuk pres ile elde edilir ve anti-oksidan, anti-tümör ve anti-inflamatuar özellikleri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [123].

Akciğer kanseri, kanser nedeni ile ölümlerin görüldüğü en sık kanser türü olarak bilinmektedir (30). Akciğer kanseri genetik ve epigenetik birçok aşamadan oluşan, sonunda normal akciğer epitelinin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanan bir kanser tipidir

Akciğer kanseri küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları, veya küçük hücreli akciğer karsinomları olarak sınıflandırılır. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'i küçük hücreli olmayan olarak sınıflandırılır ve bunlar arasında hastaların yaklaşık %30'u ileri evrede tanımlanır. Özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, kötü bir prognoz oluşturan agresif bir metastatik fenotip sergiler. Küçük hücreli olmayan akciğer karsinom tipi olan A549 hücre hattı 58 yaşındaki bir erkek hastadan köken almaktadır ve tip II alveolar akciğer hücrelerinin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini gösterirler, günümüzde sıklıkla temel akciğer kanseri ve ilaç keşfi araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [99]. Bu tez çalışmasında temel akciğer kanseri çalışmalarında yaygın kullanımı ve gösterdiği morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinde dolayı A549 hücre hattı seçilmiştir.

Ülkemizde yetişen *Nigella sativa L.* ve *Nigella damascena* türlerinden elde edilen çörek otu yağları halk arasında akciğer kanserine karşı kullanılmaktadır. Satışa sunulan çörek otu yağlarının etkinliği elde edilme yöntemine göre değişmektedir. Tez çalışmasında farklı sıklım yöntemleri ile elde edilmiş olan çörek otu yağlarının A549 hücreleri üzerindeki etkinliği, çörek otu yağının etken maddesi olan timokinon ile karşılaştırılarak analiz edilmeye çalışılmıştır.

Timokinon, *Nigella sativa* soğuk sıklım, *Nigella sativa* SFE, *Nigella damascena* soğuk sıklım ve *Nigella damascena* SFE ile A549 hücreleri üzerinde hücre canlılığı ve kaspaz-3 aktivitesi çalışmalarında; timokinon için MTT hücre canlılığı deneyinde en düşük doz olan 10µM'dan itibaren tüm dozlarda anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlenmiş ve doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma (2015) ile Acharya BR ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışma ve Bayrakçı (2016) tarafından yapılan çalışma timokinonun A549 hücreleri üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik etki bizim sonuçlarımızla benzerdir [100, 124, 125].

LDH testi sonuçlarına göre timokinonun en düşük dozdan itibaren LDH salınımı kontrole göre anlamlı bir şekilde artmaya başlamış en yüksek dozda LDH salınımı %81 oranında artış göstermiştir.

Yaptığımız çalışmada *Nigella sativa* tohumunun yağlarını farklı yöntemlerle elde edilerek, içeriğindeki etken madde olan timokinon miktarı Ultra Performans Birleşim Kromatografisi ile ölçüldüğünde *Nigella sativa* soğuk sıklımda 1,99 mg /100mg, *Nigella sativa* süper kritik sıklımda ise 4,45 mg /100mg olarak belirlenmiştir. SFE yöntemi ile elde edilen *Nigella Sativa* tohum yağındaki timokinon oranının soğuk sıklıma göre yaklaşık %140 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Çörek otu ile yapılan bir başka çalışmada kullanılan ekstre elde etme yöntemine bağlı olarak elde edilen yağın içeriğindeki timokinon miktarının değiştiği rapor edilmiştir [126].

Nigella sativa'dan soğuk sıklım ile elde edilen yağın kullanıldığı MTT çalışmamızda en düşük doz olan 50µg/ml'den itibaren tüm dozlarda kontrole göre hücre sayısında anlamlı bir biçimde azalma görülmüştür. 200µg/ml de hücre canlılığı yaklaşık yarı yarıya azalmış, 400µg/ml den itibaren hücre canlılığında %80 oranında düşüş meydana geldiği saptanmıştır. *Nigella sativa* süper kritik ile elde edilen yağ ile yapılan

çalışmada ise yine tüm dozlarda kontrole göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığı düşüşü gözlenmekle beraber *Nigella sativa* soğuk sıkımın, süper kritik sıkıma göre tüm dozlarda daha etkili olduğu MTT sonuçlarında gözlenmiştir. Al-Sheddi ve arkadaşlarının yaptığı [127] bir başka çalışmada, *Nigella sativa* tohum yağının doza bağlı hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir ve bu sonucun *Nigella sativa* tohum yağının anti-kanser özelliğini destekler nitelikte olduğu düşünülmektedir [127]. *Nigella sativa* yağlarının LDH sonuçları karşılaştırıldığında yağların dozları arası sonuçlar birbirine yakın olarak gözlenmiş olup aralarında ciddi farkların olmadığı düşünülmektedir. Her iki yağında 100µg/ml'den itibaren kontrole göre LDH salınımında anlamlı bir artış görülmüş ve doza bağlı olarak artış gerçekleşmiştir. Yaptığımız MTT ile LDH testlerinin birbirini destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

Literatürde *Nigella damascene* ile yapılmış *in-vivo* veya *in-vitro* çalışma çok sınırlı olmakla beraber A549 hücre hattı üzerindeki etkileri daha önce çalışılmamıştır *Nigella damascena* tohumlarından soğuk sıkım yöntemi ile elde edilen yağ ile yapılan MTT çalışmasında 25µg/ml'de kontrole göre hücre canlılığında anlamlı bir sonuç görülmezken 50µg/ml'den itibaren hücre canlılığında anlamlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir. 200µg/ml'de hücre canlılığı yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. *Nigella damascena* süper kritik ile yapılan MTT çalışmasında ise benzer sonuçlar elde edilmiştir. 25µg/ml'de hücre canlılığında anlamlı bir azalma olmazken 50µg/ml'den itibaren düşüş anlamlı bir şekilde doza bağlı olarak artmıştır ve 200µg/ml'de yine hücre canlılığı yaklaşık yarı yarıya azalmıştır. *Nigella damascena* tohum yağları ile yapılan LDH ölçümünde soğuk sıkımda 25 µg/ml ve 50 µg/ml dozlarında LDH salınımında anlamlı bir şekilde artış görülmemiş, 100 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemiştir. *Nigella damascena* süper kritik ile yapılan LDH ölçümünde 25 µg/ml'den itibaren kontrole göre anlamlı bir LDH salınımında artış gözlenmiştir. *Nigella damascena*'nın *Nigella sativa* gibi anti-kanser aktive gösterdiği düşünülmektedir. *Nigella damascena* yağlarının hücreler üzerindeki morfolojik ve biyokimyasal aktivitelerinin *Nigella sativa* ile benzer nitelikte olduğu ancak *Nigella sativa* türünün hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MTT ve LDH testleri göz önüne alındığında daha etkin olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında *N. sativa* ve *N. damascena* soğuk sıkım ve SFE yoluyla elde edilen yağlar ve anti-kanser özellikteki timokinonun A549 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri apoptoz belirteçlerinden biri olan kaspaz-3'ün aktif formunun miktarındaki değişikliklerin akış sitometrisinde ölçülmesiyle belirlenmiştir. Elde edilen

bulgulara göre, timokinonla muamele edilen hücre grubunda aktif kaspaz-3 miktarı kontrol grubuna göre %12,95 oranında anlamlı olarak artmıştır. Literatürde timokinonun serviks [128], meme, ovaryum [23] ve nöroblastoma [95] gibi çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediği bilinmektedir. Aynı şekilde akciğer adeno karsinomlarında timokinonun apoptozu indükleyerek tümör oluşumunu engellediği belirtilmiştir [99]. Bu tez çalışmasından elde edilen timokinonun kaspaz bağımlı bir şekilde A549 hücre hattında apoptozu indüklediği sonucu literatürdeki çalışmalarla uyumludur.

A549 hücre hattına uygulanan *N. sativa* ve *N. damascena* 'dan soğuk sıkım ve SFE yoluyla elde edilen uçucu yağların aktif kaspaz-3 oranları kontrol grubuna ve timokinona göre düşüş göstermiştir. İstatistiksel analizlere göre, kontrol grubuyla karşılaştırma yapıldığında, sadece *N. sativa* 'dan SFE yöntemiyle elde edilen uçucu yağ sonuçlarında anlamlılık gözlenirken; timokinon sonuçlarıyla karşılaştırmada *N. sativa* ve *N. damascena* 'nın hem soğuk sıkım hem de SFE yoluyla elde edilmiş yağ sonuçlarının ikisinde de anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar *Nigella sp.* yağlarının içeriğinde bulunan diğer bileşenlerin A549 hücre hattında kaspaz-bağımsız bir ölüm yolağını tetiklediğini düşündürmektedir [129] kolon kanseri hücre hatlarında yaptığı bir çalışmada timokinonun düşük dozlarının kaspaz-bağımlı olarak apoptozu indüklediğini ancak yüksek dozlarda kaspaz-3 seviyesinde bir değişim olmadan otofajik ölümün arttığını gözlemlemiş ve otofajik ölümün apoptozun indüklenmesinin ardından gerçekleştiğini belirtmiştir. Yine aynı şekilde böbrek kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, timokinonun otofajiyi arttırarak anti-tümör etki gösterdiği belirtilmiştir [130]. Literatürdeki bu bilgiler ışığında, tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular *N. sativa* ve *N. damascena* 'dan elde edilen yağların A549 hücre hattında otofajik hücre ölümünün indüklediğini düşündürmektedir. Bu bilgiyi doğrulamak için ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda timokinonun 10-25-50-100µM, *Nigella Sativa* soğuk sıkım ve süper kritik ekstaraksiyon (SFE) ile elde edilen yağların 50-100-200-400 µg/ml, *Nigella damascena* soğuk sıkım ve SFE ile elde edilen yağların 25-50-100-200 µg/ml konsantrasyonları ile A549 hücreleri üzerinde sitotoksosite kapsamında

MTT ile hücre canlılığı testi ile LDH ile Laktat dehidrojenaz enzim salınımı ölçülmüş ve kaspaz-3 aktivitesi akış sitometrisi ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda timokinonun A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki etkisinin kaspaz-3 sinyal yolağı ile belirgin bir biçimde ilgili olduğu, en düşük dozdan itibaren yapılan MTT çalışması ile A549 hücrelerinin üzerindeki hücre canlılığının azaldığı, LDH salınımının en düşük dozdan itibaren kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı göz önüne alındığında, timokinonun akciğer kanserine karşı etkin bir etken madde olduğu düşünülmektedir.

Nigella sativa soğuk sıkım ve *Nigella sativa* süper kritik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen yağların A549 hücreleri üzerindeki etkisi yapılan sitotoksisite çalışmaları ile belirlenmiş ve her iki yağında etkilerinin benzer nitelikte olduğu, *Nigella sativa* SK yağının hücre canlılığına etkisi bakımından *Nigella sativa* SFE'ye göre daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Nigella damascena soğuk sıkım ve süper kritik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen yağlar hakkında literatür tarandığında daha önce A549 hücreleri ile çalışmadığı görülmüştür. *Nigella damascena* tohumları ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında hücre canlılığı MTT testi ile çalışmış *Nigella damascena* soğuk sıkım için LDH testi ile yapılan çalışmada MTT sonuçlarını destekler nitelikte olduğu ve *Nigella damascena* tohumundan elde edilen yağların anti-kanser özellikleri için yeni araştırmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir. Bu tez çalışma kapsamında etken madde olan timokinon ile *Nigella sativa* ve *Nigella damascena* bitki tohumlarının soğuk sıkım ve SFE yöntemi ile elde edilen yağların karşılaştırmalı olarak A549 hücreleri üzerine etkileri *in vitro* deneylerle ispat edilerek literatüre sunulmuştur. Elde edilen sonuçların *in vitro* ve *in vivo* deneylerle desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- [2] Ji, G., Bao, T., Li, Z., Tang, H., Liu, D., Yang, P., Li, W., & Huang, Y. (2021). Current lung cancer screening guidelines may miss high-risk population: a real-world study. *BMC cancer*, 21(1), 50.
- [3] Cao, M., & Chen, W. (2019). Epidemiology of lung cancer in China. *Thoracic cancer*, 10(1), 3–7.
- [4] Kara, F., İltter, H., Keskinkılıç, B., Türkyılmaz, M., Hacıkamiloğlu, E., Baran Deniz, E., ... & Seynem, E. (2018). Türkiye kanser istatistikleri 2015. *Halk Sağlığı Genel Müd. Sağlık Bakanlığı*.
- [5] Moorman, P. G., & Terry, P. D. (2004). Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *The American journal of clinical nutrition*, 80(1), 5–14.
- [6] Dattner, A. M. (2003). From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatologic therapy*, 16(2), 106–113.
- [7] AL Juhaimi, F., & Figueredo, G., & Özcan, M., & Chalard, P., (2013). Comparison of Chemical Constituents of Essential Oils of Black Cumin (*Nigella sativa* L.). *Asian Journal of Chemistry*. 25. 10407-10409. 10.14233/ajchem.2013.15582.
- [8] Ramadan, M.F. (2007), Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 1208-1218.
- [9] Atta-ur-rahman, Malik, S., & Zaman, K. (1992). Nigellimine: a new isoquinoline alkaloids from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of Natural Products*: 55 (5), 676-678
- [10] Al-Gaby, A. M. (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. *Die Nahrung*, 42(5), 290–294.

- [11] Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K., & Amoli, M. A. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 58(9-10), 629–631.
- [12] Chopra, R.N., Nayar, S.L. and Chopra, I.C. (1956) *Glossary of Indian Medicinal Plants*. CSIR, New Delhi, 256.
- [13] Nadkarni, K. (1976). *Crocus sativus, Nigella sativa*. *Indian materia medica*, 386-411.
- [14] Ragheb, A., Attia, A., Eldin, W. S., Elbarbry, F., Gazarin, S., & Shoker, A. (2009). The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 20(5), 741.
- [15] Rchid, H., Nmila, R., Bessiere, J. M., Sauvaire, Y., & Chokairi, M. (2004). Volatile components of *Nigella damascena* L. and *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Essential Oil Research*, 16(6), 585-587.
- [16] Al-Ghamdi, M. S. (2001). The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of ethnopharmacology*, 76(1), 45-48.
- [17] Worthen, D. R., Ghosheh, O. A., & Crooks, P. A. (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer research*, 18(3A), 1527-1532.
- [18] Morsi, N. M. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiologica Polonica*, 49(1), 63-74.
- [19] Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5), 323-328.
- [20] Kanter, M., Coskun, O., & Uysal, H. (2006). The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of toxicology*, 80(4), 217-224.
- [21] Mert, N., Aġaoġlu, Z. T., Gündüz, H., Ertekin, A., & Dede, S. (2000). *Nigella sativa* (Çörek Otu), vitamin C, E ve selenyumun, nitrosoguanidin uygulanan tavşanların tüylerindeki iz element seviyelerine etkileri. *Uludağ Üniv Týp Fak Derg*, 26(3), 87-90.
- [22] Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*, 5(13-14), 1749-1770.

- [23] Shoieb, A. M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L., & Tithof, P. K. (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*, 22(1), 107-113.
- [24] Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., & Schneider-Stock, R. (2004). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*, 25(4), 857-866.
- [25] Gali-Muhtasib, H. U., Abou Kheir, W. G., Kheir, L. A., Darwiche, N., & Crooks, P. A. (2004). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*, 15(4), 389-399.
- [26] Kaseb, A. O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejwani, S., Menon, M., ... & Reddy, G. P. V. (2007). Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 67(16), 7782-7788.
- [27] Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- [28] Akşit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.
- [29] Doğan, A. L., & Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, 35(1), 34-42.
- [30] Ji, G., Bao, T., Li, Z., Tang, H., Liu, D., Yang, P., ... & Huang, Y. (2021). Current lung cancer screening guidelines may miss high-risk population: a real-world study. *BMC cancer*, 21(1), 1-10.
- [31] Ji, G., Bao, T., Li, Z., Tang, H., Liu, D., Yang, P., ... & Huang, Y. (2020). Current Lung Cancer Screening Guidelines may Miss the High-risk Population in the Real-world Physical Examination Population: A Large Prospective Study.
- [32] DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (2019). *Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer*. 11 ed. United States of America: Wolters Kluwer

- [33] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- [34] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- [35] Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25(1), 16-27.
- [36] Ost, D. E., Yeung, S. C. J., Tanoue, L. T., & Gould, M. K. (2013). Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5), e121S-e141S.
- [37] Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 778-790.
- [38] <https://www.medikaynak.com/n/hava-kirliliginin-akciger-kanseri-ile-iliskisi> (Erişim tarihi: 30.08.2021)
- [39] World Health Organization. (2018). Cancer: key facts. *WHO fact sheets* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [40] TÜİK. (2016). Ölüm Nedeni İstatistikleri. Ankara <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2016-24572>
- [41] Boyle, P., & Levin, B. (Eds.). (2008). *Dünya kanser raporu*. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi.
- [42] Alberg, A. J., & Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123(1), 21S-49S.
- [43] Hoffmann, D., Djordjevic, M. V., Rivenson, A., Zang, E., Desai, D., & Amin, S. (1993). A study of tobacco carcinogenesis. LI. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumours in AJ mice. *Cancer letters*, 71(1-3), 25-30.

- [44] Lorigan, P., Radford, J., Howell, A., & Thatcher, N. (2005). Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *The lancet oncology*, 6(10), 773-779.
- [45] Huang, Y. J., Huang, T. W., Lin, F. H., Chung, C. H., Tsao, C. H., & Chien, W. C. (2017). Radiation therapy for invasive breast cancer increases the risk of second primary lung cancer: a nationwide population-based cohort analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(5), 782-790.
- [46] Drummond, M. B., Lambert, A. A., Hussien, A. F., Lin, C. T., Merlo, C. A., Wise, R. A., ... & Brown, R. H. (2017). HIV infection is independently associated with increased CT scan lung density. *Academic radiology*, 24(2), 137-145.
- [47] Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S., & Britton, J. (2000). Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis: a population-based cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(1), 5-8.
- [48] Tardon, A., Lee, W. J., Delgado-Rodriguez, M., Dosemeci, M., Albanes, D., Hoover, R., & Blair, A. (2005). Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes & Control*, 16(4), 389-397.
- [49] Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... & Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*, 6(2), 244-285.
- [50] Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D. J., Groome, P. A., Rami-Porta, R., Postmus, P. E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, & Participating Institutions (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2(8), 706-714.
- [51] Groome, P. A., Bolejack, V., Crowley, J. J., Kennedy, C., Krasnik, M., Sobin, L. H., ... & International Staging Committee. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(8), 694-705.

- [52] Ergelen, R., & Cagatay Çimşit, N. (2013). AKCİĞER TÜMÖRLERİ. *Bulletin of Thoracic Surgery/Toraks Cerrahisi Bülteni*, 4(3).
- [53] Rosado-de-Christenson, M. L., Templeton, P. A., & Moran, C. A. (1994). Bronchogenic carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, 14(2), 429-446.
- [54] Sculier, J. P., Chansky, K., Crowley, J. J., Van Meerbeeck, J., & Goldstraw, P. (2008). The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(5), 457-466.
- [55] Govindan, R., Page, N., Morgensztern, D., Read, W., Tierney, R., Vlahiotis, A., ... & Piccirillo, J. (2006). Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *Journal of clinical oncology*, 24(28), 4539-4544.
- [56] Müller, N. L., & Miller, R. R. (1990, January). Neuroendocrine carcinomas of the lung. In *Seminars in roentgenology* (Vol. 25, No. 1, pp. 96-104). WB Saunders.
- [57] Hinson Jr, J. A., & Perry, M. C. (1993). Small cell lung cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 43(4), 216-225.
- [58] Can, M., Katar, D., Katar, N., Bagci, M., & Subasi, I. (2021). Yield and Fatty Acid Composition of Black Cumin (*Nigella sativa L.*) Populations Collected from Regions under Different Ecological Conditions. *Applied Ecology and Environmental Research*, 19(2), 1325-1336.
- [59] Forouzanfar, F., Bazzaz, B. S. F., & Hosseinzadeh, H. (2014). Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 929.
- [60] Salem, M. L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. *International immunopharmacology*, 5(13-14), 1749-1770.
- [61] Khader, M., & Eckl, P. M. (2014). Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 950.
- [62] Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H., & Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*, 95, 138-158.

- [63] El-Tahir, K. E. D. H., & Bakeet, D. M. (2006). The black seed *Nigella sativa* Linnaeus-A mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 1(1), 1-19.
- [64] Hammad Shafiq, A. A., Masud, T., & Kaleem, M. (2014). Cardio-protective and anti-cancer therapeutic potential of *Nigella sativa*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 967.
- [65] Kalidasu, G., Reddy, G. S., Kumari, S. S., Kumari, A. L., & Sivasankar, A. (2017). Secondary volatiles and metabolites from *Nigella sativa* L. seed.
- [66] Mollazadeh, H., & Hosseinzadeh, H. (2014). The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 958.
- [67] Kumar, A., Singh, D., Rehman, H., Sharma, N. R., & Mohan, A. (2019). Antibacterial, antioxidant, cytotoxicity and qualitative phyto-chemical evaluation of seed extracts of *nigella sativa* and its silver nanoparticles. *IJPSR10*, 4922-4931.
- [68] Gali-Muhtasib, H., Roessner, A., & Schneider-Stock, R. (2006). Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(8), 1249-1253.
- [69] Goyal, S. N., Prajapati, C. P., Gore, P. R., Patil, C. R., Mahajan, U. B., Sharma, C., ... & Ojha, S. K. (2017). Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. *Frontiers in pharmacology*, 8, 656.
- [70] Abdel-Fattah, A. F. M., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2000). Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*, 400(1), 89-97.
- [71] El Tahir, K. E., Ashour, M. M., & Al-Harbi, M. M. (1993). The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: elucidation of the mechanism (s) of action. *General Pharmacology: The Vascular System*, 24(5), 1115-1122.
- [72] Alkharfy, K. M., Ahmad, A., Khan, R. M., & Al-Shagha, W. M. (2015). Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 40(3), 319-323.

- [73] Surekha, R., & Sumathi, T. (2016). An efficient encapsulation of thymoquinone using solid lipid nanoparticle for brain targeted drug delivery: physicochemical characterization, pharmacokinetics and bio-distribution studies. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(12), 1616-1624.
- [74] Odeh, F., Ismail, S. I., Abu-Dahab, R., Mahmoud, I. S., & Al Bawab, A. (2012). Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. *Drug delivery*, 19(8), 371-377.
- [75] Singh, A., Ahmad, I., Akhter, S., Jain, G. K., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., & Ahmad, F. J. (2013). Nanocarrier based formulation of Thymoquinone improves oral delivery: stability assessment, in vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 822-832.
- [76] Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Sung, B., & Anand, P. (2008). Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta medica*, 74(13), 1560-1569.
- [77] Worthen, D. R., Ghosheh, O. A., & Crooks, P. A. (1998). The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer research*, 18(3A), 1527-1532.
- [78] Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., ... & Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed* 3 (5): 337–352.
- [79] Khuri, F. R., Wu, H., Lee, J. J., Kemp, B. L., Lotan, R., Lippman, S. M., ... & Xu, X. C. (2001). Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(4), 861-867.
- [80] Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J. S., Leitao, D., Amendoeira, I., & Schmitt, F. C. (2002). Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of clinical pathology*, 55(6), 429-434.
- [81] Santos, C. I., & Costa-Pereira, A. P. (2011). Signal transducers and activators of transcription—from cytokine signalling to cancer biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(1), 38-49.

- [82] El Mezayen, R., El Gazzar, M., Nicolls, M. R., Marecki, J. C., Dreskin, S. C., & Nomiyama, H. (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunology letters*, *106*(1), 72-81.
- [83] Boudiaf, K., Hurtado-Nedelec, M., Belambri, S. A., Marie, J. C., Derradji, Y., Benboubetra, M., & Dang, P. M. C. (2016). Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo. *Biochemical pharmacology*, *104*, 62-73.
- [84] Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, *83*(6), 835.
- [85] Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *63*(9), 901-910.
- [86] Yi, T., Cho, S. G., Yi, Z., Pang, X., Rodriguez, M., Wang, Y., ... & Liu, M. (2008). Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics*, *7*(7), 1789-1796.
- [87] Huang, H. Y., Helzlsouer, K. J., & Appel, L. J. (2000). The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *9*(7), 647-652.
- [88] Frelon, S., Douki, T., Favier, A., & Cadet, J. (2003). Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chemical research in toxicology*, *16*(2), 191-197.
- [89] Mansour, M., & Tornhamre, S. (2004). Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *19*(5), 431-436.
- [90] Kanter, M. (2008). Effects of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemical research*, *33*(1), 87-96.
- [91] Khanna, T., Zaidi, F. A., & Dandiya, P. C. (1993). CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia-Milano*, *64*, 407-407.

- [92] Badary, O. A., Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Al-Sawaf, H. A., Al-Sohaibani, M. O., & Al-Bekairi, A. M. (1997). Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(12), 1356-1361.
- [93] Badary, O. A. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 67(2), 135-142.
- [94] Lei, X., Lv, X., Liu, M., Yang, Z., Ji, M., Guo, X., & Dong, W. (2012). Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(2), 864-868.
- [95] Paramasivam, A., Sambantham, S., Shabnam, J., Raghunandhakumar, S., Anandan, B., Rajiv, R., ... & Jayaraman, G. (2012). Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP. *Toxicology letters*, 213(2), 151-159.
- [96] Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., & Schneider-Stock, R. (2004). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*, 25(4), 857-866.
- [97] Das, S., Dey, K. K., Dey, G., Pal, I., Majumder, A., MaitiChoudhury, S., ... & Mandal, M. (2012). Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma.
- [98] Mu, G. G., Zhang, L. L., Li, H. Y., Liao, Y., & Yu, H. G. (2015). Thymoquinone pretreatment overcomes the insensitivity and potentiates the antitumor effect of gemcitabine through abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR regulated signaling pathways in pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences*, 60(4), 1067-1080.
- [99] Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., & Farkhondeh, T. (2019). Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *Journal of cellular physiology*, 234(7), 10421-10431.
- [100] Yang, J., Kuang, X. R., Lv, P. T., & Yan, X. X. (2015). Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. *Tumor Biology*, 36(1), 259-269.

- [101] Gali-Muhtasib, H. U., Abou Kheir, W. G., Kheir, L. A., Darwiche, N., & Crooks, P. A. (2004). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs*, 15(4), 389-399.
- [102] Peng, L., Liu, A., Shen, Y., Xu, H. Z., Yang, S. Z., Ying, X. Z., ... & Shen, W. D. (2013). Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncology reports*, 29(2), 571-578.
- [103] Kundu, J., Chun, K. S., Aruoma, O. I., & Kundu, J. K. (2014). Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, 22-34.
- [104] ElKhoely, A., Hafez, H. F., Ashmawy, A. M., Badary, O., Abdelaziz, A., Mostafa, A., & Shouman, S. A. (2015). Chemopreventive and therapeutic potentials of thymoquinone in HepG2 cells: mechanistic perspectives. *Journal of natural medicines*, 69(3), 313-323.
- [105] Mu, G. G., Zhang, L. L., Li, H. Y., Liao, Y., & Yu, H. G. (2015). Thymoquinone pretreatment overcomes the insensitivity and potentiates the antitumor effect of gemcitabine through abrogation of Notch1, PI3K/Akt/mTOR regulated signaling pathways in pancreatic cancer. *Digestive diseases and sciences*, 60(4), 1067-1080.
- [106] Xu, D., Ma, Y., Zhao, B., Li, S., Zhang, Y., Pan, S., ... & Jiang, H. (2014). Thymoquinone induces G2/M arrest, inactivates PI3K/Akt and nuclear factor- κ B pathways in human cholangiocarcinomas both in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 31(5), 2063-2070.
- [107] Sakalar, C., Yuruk, M., Kaya, T., Aytakin, M., Kuk, S., & Canatan, H. (2013). Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 383(1), 243-251.
- [108] El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., & Wani, A. A. (2005). Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer*, 117(3), 409-417.
- [109] Khan, A., Chen, H. C., Tania, M., & Zhang, D. Z. (2011). Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cumin). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5S).

- [110] El Daly, E. S. (1998). Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *Journal de pharmacie de Belgique*, 53(2), 87-93.
- [111] Zaoui, A., Cherrah, Y., Mahassini, N., Alaoui, K., Amarouch, H., & Hassar, M. (2002). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*, 9(1), 69-74.
- [112] Badary, O. A., Al-Shabanah, O. A., Nagi, M. N., Al-Bekairi, A. M., & Elmazar, M. (1998). Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Research*, 44(2-3), 56-61.
- [113] Mansour, M. A., Ginawi, O. T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A. S., Al-Shabanah, O. A., & Al-Sawaf, H. A. (2001). Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 110(3-4), 239-252.
- [114] Al-Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A., & Shaikh, N. A. (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20(2), 25-27.
- [115] AbuKhader, M. M., Khater, S. H., & Al-Matubsi, H. Y. (2013). Acute effects of thymoquinone on the pregnant rat and embryo-fetal development. *Drug and chemical toxicology*, 36(1), 27-34.
- [116] Ali, B. H., & Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research: An international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*, 17(4), 299-305.
- [117] Aqel, M., & Shaheen, R. (1996). Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. *Journal of ethnopharmacology*, 52(1), 23-26.
- [118] Kokdil, G., İlçim, A., Özbilgin, B., & Uygün, C. (2006). Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella L.* in Turkey. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(1), 19-41.

- [119] Fico, G., Bader, A., Flamini, G., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2003). Essential oil of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) seeds. *Journal of Essential Oil Research*, 15(1), 57–58 101.
- [120] Aytaç, E. (2021). Comparison of extraction methods of virgin coconut oil: cold press, soxhlet and supercritical fluid extraction. *Separation Science and Technology*, 1-7.
- [121] Shao, P., Liu, Q., Fang, Z., & Sun, P. (2015). Chemical composition, thermal stability and antioxidant properties of tea seed oils obtained by different extraction methods: Supercritical fluid extraction yields the best oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(3), 355-365.
- [122] Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Alsahli, M. A., Khan, A. A., & Rahmani, A. H. (2020). Thymoquinone, an active compound of *Nigella sativa*: role in prevention and treatment of cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 21(11), 1028-1041.
- [123] Silva, A. F. C., Haris, P. I., Serralheiro, M. L., & Pacheco, R. (2020). Mechanism of action and the biological activities of *Nigella sativa* oil components. *Food Bioscience*, 38, 100783.
- [124] Acharya, B. R., Chatterjee, A., Ganguli, A., Bhattacharya, S., & Chakrabarti, G. (2014). Thymoquinone inhibits microtubule polymerization by tubulin binding and causes mitotic arrest following apoptosis in A549 cells. *Biochimie*, 97, 78-91.
- [125] Bayrakçi, O (2016) *Akciğer kanserinde timokinonun hücre düzeyinde etkileri* Yayınlanmış Uzmanlık Tezi. Gaziantep: Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı
- [126] Işık, S (2018) *Türkiye’de yetiştirilen çörek otu (nigella sativa l.) tohumlarına ön uygulama (priming) ve biyoteknolojik yöntemler uygulayarak standardize çörek otu yağının elde edilmesi* Yayınlanmış Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
- [127] Al-Sheddi, E. S., Farshori, N. N., Al-Oqail, M. M., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A. A., & Siddiqui, M. A. (2014). Cytotoxicity of *Nigella sativa* seed oil and extract against human lung cancer cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(2), 983–987.

- [128] Latifah, S. Y., Ng, W., Ghanya, A. N., & Maznah, I. (2009). Cytotoxicity of thymoquinone (TQ) from *Nigella sativa* towards human cervical carcinoma cells (HeLa). *Journal of Pharmacy Research*, 2(4), 585-589.
- [129] Chen, M. C., Lee, N. H., Hsu, H. H., Ho, T. J., Tu, C. C., Hsieh, D. J. Y., ... & Huang, C. Y. (2015). Thymoquinone induces caspase-independent, autophagic cell death in CPT-11-resistant lovo colon cancer via mitochondrial dysfunction and activation of JNK and p38. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1540-1546.
- [130] Zhang, Y., Fan, Y., Huang, S., Wang, G., Han, R., Lei, F., ... & Zhao, X. (2018). Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway. *Cancer science*, 109(12), 3865-3873.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ender Erdem

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans (2021)

Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Biyoloji A.B.D., Moleküler, Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Tez Konusu: Farklı Yöntemlerle Elde Edilmiş Çörek Otu Yağlarının *In Vitro* Değerlendirmesi

Lisans (2017)

Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (%30 İngilizce)

Bir yıl süreli İngilizce Hazırlık, Anadolu Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu

Lisans Bitirme Tezi: Stem Cell Biology

İŞ DENEYİMİ

Proje Personeli (Nisan-Mayıs 2020)

TUSEB

COVID-19 QPCR tanı işlemleri (Numune kabul, izolasyon vb.)

STAJLAR

Gönüllü Stajyer (Mayıs-Haziran 2019)

MstLab

Doku takibi, dokudan kesit alma, (Pcr, qPcr, Elisa) çalışmaları, DNA, RNA, miRNA izolasyonu.