



**RATLARA UYGULANAN TARTRAZİN VE
TİMOKİNONUN KARACİĞERE ETKİLERİ**

Nursena DEMİRCİGİL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ

Yüksek Lisans Tezi - 2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARA UYGULANAN TARTRAZİN VE TİMOKİNONUN
KARACİĞERE ETKİLERİ**

Nursena DEMİRCİGİL

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ**

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL- 2021/2441 Proje numarası ile tarafından desteklenmiştir.

**MALATYA
2022**

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

Doç. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum ‘‘Ratlara Uygulanan Tartrazin ve Timokinonun Karaciğere Etkileri’’ başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

26/04/2022

Nursena DEMİRCİGİL

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tartrazin.....	2
2.1.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler	2
2.1.2. Tartrazin'in Kullanım Alanları	3
2.1.3. Tartrazin'in Metabolizması.....	3
2.1.4. Tartrazin'in İnsan Sağlığı Açısından Önemi.....	4
2.2. Nigella Sativa.....	5
2.2.1. Timokinon.....	7
2.2.2. Timokinonun Etki Mekanizması	8
2.2.3. Timokinonun Farmakolojik Etkileri	9
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Kimyasallar Malzemeler	14
3.1.2. Kullanılan Aletler	14
3.2. Ratların Temini ve Bakımı	14
3.2.1. Deney Grupları	15
3.3. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri.....	15
3.4. Biyokimyasal Analizler	15

3.4.1. MDA Analizi	16
3.4.2. Redükte GSH Analizi	16
3.4.3. SOD Aktivitesi Analizi.....	16
3.4.4. KAT Aktivitesi Analizi.....	17
3.4.5. GSHPx Aktivitesi Analizi.....	17
3.4.6. Protein Analizi	18
3.4.7. TAS Analizi	18
3.4.8. TOS Analizi	18
3.4.9. OSI Analizi.....	18
3.5. Biyokimyasal Serum Analizleri.....	19
3.6. Histolojik Analizler.....	19
3.6.1. İmmünohistokimya	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Ratların Ağırlık Değişimleri	21
4.2. Biyokimyasal Bulgular	22
4.2.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri	25
4.2.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri	26
4.2.3. Karaciğer Dokusu SOD Aktivite Düzeyleri	27
4.2.4. Karaciğer Dokusu KAT Aktivite Düzeyleri	28
4.2.5. Karaciğer Dokusu GSH-P _x Düzeyleri	29
4.2.6. Karaciğer Dokusu TAS Düzeyleri	30
4.2.7. Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri	31
4.2.8. Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres İndeksi.....	32
4.2.9. Serum TNF- α Düzeyleri	33
4.2.10. Serum IL-6 Düzeyleri	34
4.3. Histolojik Bulgular	35

5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
EKLER.....	66
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	65
EK 2. ETİK KURUL ONAYI.....	66



TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum deneysel çalışmalarda ve tezimin her aşamasında bana yol gösteren ve destek olan, akademik bilgisi ile bu yolda bana ışık tutan danışmanım sayın Doç. Dr. Mehmet Erman ERDEMLİ'ye,

Tezimin histolojik inceleme aşamasında benden desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet GÜL ve Araştırma Görevlisi Elif KAYHAN KUŞTEPE'ye ,

Çalışmam boyunca yanımda olarak bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Nurcan GÖKTÜRK, Meral YENİCE ASLAN, Emine KOÇ ve Nilüfer BULUT'a ve tüm biyokimya araştırma laboratuvarı çalışanlarına,

Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nin değerli çalışanları Gamze Karakuş ÖZKAYA ve Onur ÖZKAYA'ya,

Tüm hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

TYL- 2021-2441 nolu projeme maddi yönden katkılarından dolayı Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

Ratlara Uygulanan Tartrazin ve Timokinonun Karaciğer Etkileri

Amaç: Endüstriyel alanlar ve gıdalarda boya maddesi olarak yaygın kullanım alanına sahip olan tartrazin' in karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin gözlenmesi ve timokinon ile beraber kullanıldığında bu toksik etkinin giderilip giderilmediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet 200-250 gram ağırlığında *Wistar albino* cinsi erkek ratlar kullanıldılar. Bu ratlar rastgele 4 farklı eşit gruba; Kontrol grubu, timokinon grubu, tartrazin grubu, timokinon + tartrazin grubu olarak ayrıldı. Uygulamalar 21 gün boyunca devam etti. Süre sonunda ratların karaciğer dokuları ve kan numuneleri alınıp biyokimyasal ve histolojik incelemelere tabi tutuldu.

Bulgular: Tartrazin uygulanmasıyla, Karaciğer dokusunda oksidan ve oksidatif stres indeks parameterelerini arttırmış, anti oksidan parametreleri azaltmış, histopatolojik olumsuzluklara yol açmış ve serum numunelerinde inflamasyonlara neden olmuştur. Timokinon uygulaması karaciğer dokusunda anti oksidan parameterleri seviyelerini arttırmış ve serum inflamasyon seviyelerinde düşüslere neden olmuştur ($p<0.001$). Tartrazin ile birlikte timokinon uygulaması tartrazinin biyokimyasal ve histopatolojik olumsuz etkilerini azaltmaya çalışmıştır.

Sonuç: Tartrazin karaciğer dokusunda hücre hasarlarına yol açarak hepatoksisiteye sebep olmuş bununla da kalmayarak inflamasyonlara neden olmuştur. Timokinon ise antioksidan ve anti inflamasyonu artırıcı etkiye neden olmuştur. Tartrazin' in toksik etkilerini azaltmak için Çörek otu ve onun aktif bileşeni olan timokinonun günlük tüketimini tavsiye ediyoruz.

Anahtar Kelimeler: Tartrazin, timokinon, karaciğer, rat, oksidatif stres parametreleri, histopatoloji

ABSTRACT

The Impact of Tartrazine and Thymoquinone Administration on Rat Liver

Aim: The current study aimed to observe the toxic effects of tartrazine, a commonly used dyestuff in industries and foods, on the liver, and investigate whether this toxicity could be eliminated with Thymoquinone coadministration.

Material and Method: The study was conducted on 32 200-250 g male Wistar albino rats, procured from İnönü University Experimental Animals Breeding and Research Center. The rats were randomly assigned to 4 equal groups: Control group, Thymoquinone group, tartrazine group, Thymoquinone + tartrazine group. The trials were conducted for 21 days. Then, rat liver tissue and blood samples were obtained and biochemical and histological examinations were conducted on the samples.

Results: Tartrazine administration increased the oxidant and oxidative stress index parameters in the liver tissue, decreased the antioxidant parameters, led to histopathological problems and inflammation in the serum samples. Thymoquinone administration increased the antioxidant parameter levels in liver tissue and decreased serum inflammation levels ($p < 0.001$). Thymoquinone and tartrazine coadministration reduced the adverse biochemical and histopathological effects of tartrazine.

Conclusion: Tartrazine caused hepatotoxicity via cellular damage in the liver tissue and led to inflammation. Thymoquinone, on the other hand, improved antioxidant and anti-inflammatory effects. We recommend daily consumption of black cumin and its active ingredient, thymoquinone to reduce tartrazine toxicity.

Keywords: Tartrazine, thymoquinone, liver, rat, oxidative stress parameters, histopathology.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	:Alkale Fosfataz
ALT	:Alanin Aminotransferaz
AST	:Aspartat Aminotransferaz
BSA	:Sığır Serum Albumini
CASP-3	:Kaspaz-3
CASP-9	:Kaspaz-9
CCl₃	:Triklorometil
CCl₄	:Karbon Tetraklorür
COX	:Siklooksijenaz
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	:5,5' Dithiobis 2 Nitrobenzoik Asit
EDTA	:Etilendiamintetraasetik Asit
GC	:Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
GLU	:Glutamat
GSH	:Redükte Glutatyon
GSH-Px	:Glutatyon Peroksidaz
H₂O₂	:Hidrojen Peroksit
IL-6	:İnterlökin-6
İ.P.	:İntra Peritoneal
KAT	:Katalaz
MDA	:Malondialdehit

-N=N-	:Azo Grubu
NBT	:Nitroblue Tetrazolium
NO	:Nitrik Oksit
NO₂	:Nitrojen Dioksit
O²⁻	:Süperoksit Radikali
OH-	:Hidroksil Radikali
OSI	:Oksidatif Stres İndeksi
P.O.	:Per Oral (Ağız Yoluyla)
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
RO-	:Alkoksil Radikali
ROO-	:Peroksil Radikali
SOD	:Süperoksit Dismutaz
TAS	:Total Antioksidan Seviyesi
TBA	:Tiobarbutirik Asit
TCA	:Triklorasetik Asit
TG	:Trigliserit
TNF-α	:Tümör Nekrozis Faktör
TOS	:Total Oksidan Seviyesi
TQ	:Timokinon
WHO	:World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Tartrazinin kimyasal formülü	2
Şekil 2.2. Nigella Sativa bitkisi, kapsülü ve tohumları	6
Şekil 2.3. Nigella Sativa yağının başlıca aktif bileşenleri ve kimyasal yapıları	7
Şekil 2.4. Timokinonun kimyasal yapısı.....	8
Şekil 4.1. Grupların karaciğer dokusu MDA düzeyleri.	25
Şekil 4.2. Grupların karaciğer dokusu GSH düzeyleri.....	26
Şekil 4.3. Grupların karaciğer dokusu SOD aktivite düzeyleri.	27
Şekil 4.4. Grupların karaciğer dokusu KAT aktivite düzeyleri	28
Şekil 4.5. Grupların Karaciğer Dokusu GSH-Px aktivite düzeyleri.	29
Şekil 4.6. Grupların karaciğer dokusu TAS düzeyleri.	30
Şekil 4.7. Grupların Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri.....	31
Şekil 4.8. Grupların Karaciğer Dokusu OSI Düzeyleri.....	32
Şekil 4.9. Grupların Karaciğer Dokusu TNF- α Düzeyleri.....	33
Şekil 4.10. Grupların Serumda IL-6 Düzeyleri	34
Şekil 4.11. (1a) Kontrol grubu ışık mikroskobu görüntüsü	35
Şekil 4.12. (1b) Kontrol grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	36
Şekil 4.13. (1c) Kontrol grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	36
Şekil 4.14. (1d) Kontrol grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	37
Şekil 4.15. (2a) Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	37
Şekil 4.16. (2b) Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü	38
Şekil 4.17. (2c) Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	38
Şekil 4.18. (2d) Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü	39

Şekil 4.19. (3a.) Tartrazine grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	40
Şekil 4.20. (3b) Tartrazine grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	41
Şekil 4.21. (3c) Tartrazine grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	41
Şekil 4.22. (3d) Tartrazine grubu. ışık mikroskobu görüntüsü.....	42
Şekil 4.23. (4a)Tartrazine+Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	43
Şekil 4.24. (4b)Tartrazine+Timokinon grubu. ışık mikroskobu görüntüsü.....	44
Şekil 4.25. (4c)Tartrazine+Timokinon grubu. ışık mikroskobu görüntüsü.....	44
Şekil 4.26. (4d) Tartrazine+Timokinon grubu ışık mikroskobu görüntüsü.....	45



TABLolar DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 4.1.	Ratların haftalara göre ağırlık değişimleri	21
Tablo 4.2.	Oksidan – antioksidan parametreler	22
Tablo 4.3.	Oksidatif stres indeks parametreler	23
Tablo 4.4.	İnflamasyon Parametreler.....	24
Tablo 4.5.	Histolojik ve Caspase-3 Hata skorları.....	46



1. GİRİŞ

Avrupa Birliği tarafından gıda katkı maddelerini belirlemek amacıyla verilen kodlardan E102 koduna sahip olan tartrazin gıda sanayinde renklendirici olarak kullanılan sentetik bir boyadır. İlk olarak 1884 yılında Alman Kimyager J. H. Ziegler tarafından kömür katranından izole edilmiştir. Tartrazin, turuncu-sarı renge sahiptir ve toz yada tanecikli yapıda bulunabilir. Petrol ürünlerinden sentez edilerek elde edilmektedir. Tartrazin suda çözünebilen ve birçok ürün içeriğinde renklendirme amacıyla kullanılan ayrıca düşük maliyetli olması sebebiyle sıklıkla tercih edilen bir boya maddesidir. Yaygın kullanıldığı gıda maddelerinin başında puding, unlu mamüller, içecekler, süt ürünleri, et ve balık ürünleri, şekerlemeler gelmektedir.

Tartrazin sadece gıda boyası olarak değil aynı zamanda birçok kişisel bakım ürünü (sabun, nemlendirici, diş macunu, şampuan, ve saç bakım ürünleri) ve bazı ilaçlarda sarı-turuncu rengi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bazı kişilerde tartrazinin dil ve dudaklarda şişme, deri döküntüleri, nefes alma zorlukları gibi alerjik reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tartrazin içeren gıdalar bazı çocuklarda konsantrasyon kaybı ve hiperaktivite gibi olumsuz etkilere neden olabilmektedir.

Çörek otunun biyoaktif bileşimi olarak bilinen ve bu bitkinin biyolojik etkilerinden sorumlu olan timokinonun antioksidan, İmmün düzenleyici, hepatoprotektif, antikanser, gastroprotektif, anti-inflamatuar, hipoglisemik antimikrobiyal, nefroprotektif, antidiyabetik, nöroprotektif, hipo-lipidemik, antihistaminik, kalp ve solunum sistemi hastalıklarında, apoptozda etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca otoimmün hastalıklar için de doğal bir ilaç olabileceği bildirilmiştir.

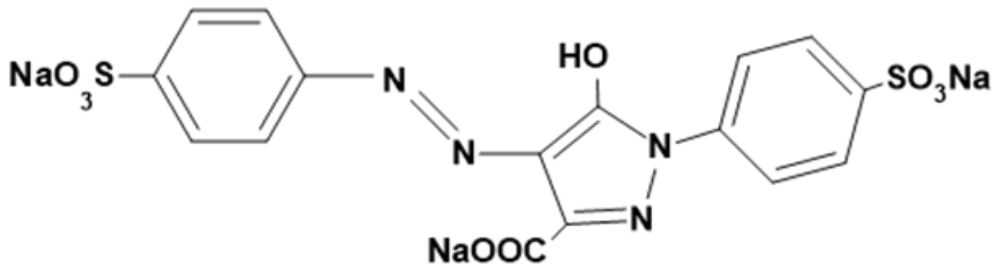
Bu çalışmamızda tartrazinin karaciğer üzerinde olumsuz etkiler oluşturup oluşturmayacağı eğer oluşturacak ise koruyucu etkisi bildirilen timokinonun bu toksik etki üzerinde hepatoprotektif etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tartrazin

2.1.1. Tartrazin Hakkında Genel Bilgiler

Tartrazinin kimyasal adı trisodyum 5-hidroksi-1-(4-sülfanato-fenil)-4-(4-sulfanatofenilazo)-H-pirazol-3-karboksilat (sodium tuzu) ve kimyasal formülü $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ olarak bilinmektedir (1). Yapısında azo (-N=N-) grubu bulunduran boyalar azo boyalar olarak tanınırlar. Tartrazin de yapısında tek bir azo grubu içermesi nedeniyle monoazo boyalar sınıfına dahil edilen sentetik yapıda bir boyadır. Azo boyalar sınıfında en çok kullanılan boya olarak bilinen tartrazin pirazolin halkası içerir ve suda rahatça çözünen hidrofilik bir bileşiktir. Sarı-turuncu renge sahiptir ve çözeltilerine de bu rengi verir (2). Tartrazin iki şekilde sentezlenebilir. Birincisi; bir mol dihidroksitartarik asitin iki mol fenilhidrazin-p-sülfonik asit ile kondenzasyonudur. İkincisi ise oksaloasetik ester ile fenilhidrazin-p-sülfonik asidin kondenzasyonudur. Diazot içeren sülfanilik asit ile birleştirilen reaksiyon ürünü ester oluşturur. Daha sonra bu ester sodyum hidroksit ile hidroliz edilir. Tartrazin; CI Food Fellow 4, FD&C Yellow No.5, Color Index (1975) No. 19140, INS No.102 isimleriyle de bilinir (2, 3).



Şekil 2.1 Tartrazinin kimyasal formülü

2.1.2. Tartrazinin Kullanım Alanları

Tartrazin oldukça geniş bir kullanım alanına sahip sentetik bir azo boyadır. Alkolsüz içecekleri, cipsleri, tahılları, hardalları, dondurmaları, pastacılık ürünlerini renklendirmek için kullanılan tartrazin aynı zamanda el losyonları, diş macunu, sabunlar, göz farı, allık, yüz tozu, ruj, tırnak cilası, oje, geçici dövmelemler ve bronzlaşma losyonları gibi kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra ipek, deri, naylon, kağıt boyama, yün, plastik sektörü, mürekkep hazırlanması ve hayvan histolojisinde kontrast boya olarak da kullanılmaktadır (4, 5).

2.1.3. Tartrazinin Metabolizması

Gıdalarda bulunan tartrazinin oral yolla alınması ile insan, rat ve tavşanlarda birincil mekanizma olarak bakteriler tarafından metabolize edildiği bildirilmiştir. Sülfanilik asit ve aminopirozolon tartrazinin başlıca metaboliti yani metabolizma ürünleridir. Tavşan ve ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada oral yolla alınan tartrazinin herhangi bir değişime uğramadan idrar ve safra yoluyla atıldığı tespit edilmiştir (6–9).

Tartrazininde içinde bulunduğu azo boyalar, içerdiği azo bağının indirgeyici biyotransformasyon etkisiyle mutajenik, karsinojenik ve toksik etkilerinin olabileceği ileri sürülmüştür (10, 11). Oral yolla vücuda giren tartrazin, bağırsakta bulunan mikroorganizmalar tarafından azoredüktaz enzimleri kullanılarak metabolize edilir ve bunun sonucunda aromatik aminler oluşur (10). Azo bağlarının koparılmasında akciğerde bulunan azoredüktaz enzimi de rol alabilir (11).

Bağırsaktaki anaerobik koşullar ve bakterilerin saldığı elektron taşıyıcıları etkisiyle tartrazin sülfanilik asit ve aminopirozolon olarak iki metabolite indirgenir. Bu metabolitler ve tartrazinin büyük bir kısmı dışkı ile atılır fakat az miktarda da geri emilir (7–9, 11, 12).

Hücre döngüsü ve rejeneratif hiperplazi sürecinde interfaz evresi boyunca sülfanilik asit ve aminopirazon hücreleri değiştirme potansiyeline sahiptir. Bu sebeple kanser gelişimine neden olabilir (9). Karaciğer ve bağırsakta meydana gelen reaksiyonlardan sonra azo boyaların tamamen aromatik aminlere indirgenmesi sağlanırsa; P450 enzimleri ile bu aromatik aminlerin N-hidroksi türevlerine okside edilmesi gerçekleşir (10).

2.1.4. Tartrazinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Tartrazinin her on bin kişiden 1-10 arası insanda aşırı duyarlılık reaksiyonlarına sebep olmaktadır. Bu reaksiyonlar; rinit, ürtiker, astım, sistemik anafilaksi şeklinde görülür. Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda çocuklar üzerinde hiperaktiviteye, astımlı ve aspirine duyarlı kişilerde ise migren, öğrenme güçlüğü, deride yanma ve kızarma, nezle, gibi istenmeyen reaksiyonlara sebep olduğu saptanmıştır. Tartrazine olan duyarlılık mekanizması net bir şekilde bilinmese de bu reaksiyonlara tartrazinin bir metabolitinin sebep olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çocuklarda detoksifikasyon sürecinin daha yavaş ilerlemesi de buna sebep olabilir (2, 13).

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hiperaktivite, anksiyete ve depresyon gibi davranışsal bozuklukların tartrazin ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilerek halk sağlığı için tartrazinin olumsuz etkileri olabileceği üzerinde durulmuştur (14).

Başka bir çalışmada ise; düşük dozlarda dahi tartrazinin karaciğer ve böbrek gibi organları etkileyerek biyokimyasal parametreleri olumsuz yönde değiştirdiği gösterilmiştir (15). Tartrazin gibi azo boyalar immün mekanizmalarla ilgili çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır (16).

Gıdaları renklendirmek için kullanılan bazı maddelerinin DNA hasarına yol açarak genotoksik etki gösterebileceği öne sürülmektedir. Sentetik boyaların fonksiyonel grupları ve aromatik halka içermeleri nedeniyle sağlığa zararlı oldukları belirtilmiştir. Tartrazin de mono azo yapıda pirazolon halkası içeren sentetik bir boyadır. tartrazinin DNA ile etkileşime girebildiği ve DNA hasarına neden olabildiği, serbest radikal oluşumuna sebep olarak oksidatif stresi arttırabildiği ayrıca bazı memeli hücrelerinde kromozom anormalliklerine sebep olabildiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra tartrazinin hücre canlılığını azaltabileceği belirtilmiştir (4, 10–12, 17–20).

Gıda katkı maddelerinin mutajenik etkisinin β Galaktozidaz enzim aktivitesi değişimi ve salmonella/mikrozom sistemi ile araştırıldığı bir çalışmada Salmonella/mikrozom test sisteminde salmonella typhimurium TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmıştır. S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda deneyler tekrar edilmiştir. S9 fraksiyonu yokluğunda tartrazin mutajenik aktivite göstermezken fare karaciğer enzimleri varlığında deneyler tekrarlandığında, tartrazinin mutajenik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (21).

Farklı bir çalışmada tartrazinin fareler üzerindeki genotoksik etkisi araştırılmıştır. Farelere ağız yoluyla 7.5 Kg/gün ve 15 Kg/gün olacak şekilde yedi hafta boyunca tartrazin uygulanmıştır. Komet testi sonucunda tartrazinin karaciğer ve böbrek dokularında DNA hasarına sebep olduğunu belirtilmiştir (19).

Kashanian ve Zeidali; buzağı timus DNA'sının, Nötr PH 7.4'teki 10mm Tris-HCl sulu çözeltisinde tartrazin ile etkileşimini incelemiştir. Tartrazin, 3.75×10^{-4} M bir iç bağlama sabiti ile buzağı timus DNA'sı ile etkileşime girdiği bildirilmiştir (20).

Ratlarda yapılan 13 haftalık bir subkronik oral toksisite çalışmasında hayvanlar, çeşitli dozlarda tartrazin içeren bir diyetle beslenmiştir. Daha sonra kan örnekleri hematolojik ölçümler, glukoz, kreatinin, kan üre azotu, total kolesterol, trigliserid, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz için analiz edilmiştir. Mide, jejunum, karaciğer, böbrek dokuları histolojik inceleme için işlenmiştir. Bu çalışma, tartrazinin, kırmızı kan hücrelerinde morfolojik bir değişikliğe neden olduğunu göstermektedir. Karaciğerin nispi ağırlıkları, 10 mg / kg canlı ağırlık tartrazin uygulanan grupta, anlamlı olarak artmıştır. Veriler, kontrole kıyasla tartrazin uygulanan ratların serumunda glukoz, kreatini, kolesterol, trigliserit, aspartat aminotransferaz ve toplam proteinde önemli bir artış göstermiştir. Yüksek dozlarda düşük doza kıyasla daha belirgin artış görülmüştür. Karaciğer ve böbreğin histopatolojik değişiklikleri biyokimyasal bulgulara uygun bulunmuştur (8).

2.2. Nigella Sativa

Nigella sativa, Ranunculacea familyasına mensup olup bir yıllık, çift çenekli, otsu bir bitkidir. Bitki, ismini tohumlarının siyah renginden almıştır. 'Nigella' kelimesi Latince siyahımsı anlamına gelen 'nigellus' dan türetilmiştir. Nigella cinsinin en çok kullanılan türlerinden biri olan *Nigella sativa* (Çörek Otu), ülkemizde çoğunlukla Afyon, Isparta, Konya ve Burdur'da yetiştirilir ve siyah tohum, bereket tanesi, çörek otu olarak da bilinir. Yaklaşık 30-40 cm boyunda olan bu bitki beyaz, mavi renklere çiçeklere sahip olup meyve kapsülünde tohumları bulunur. Bu tohumlar hava ile temas ettiğinde siyah rengini alır. *Nigella sativa*'nın tohumlarında karbonhidratlar (% 33.9), sabit yağlar (% 32-40), mineraller (potasyum, kalsiyum, sodyum, demir) (% 1.79-3.44), uçucu yağlar (% 0.4-0.45), proteinler (% 16-19.9), lifler (5.5%), alkaloidler, amino asitler, tanenler, niasin, saponinler, tiamin, pridoksin askorbik asit, ve folik asit

bulunmaktadır. Belirtilen oranlar bitkinin yetiştiği ortam şartlarına göre farklılık gösterebilir (22, 23).

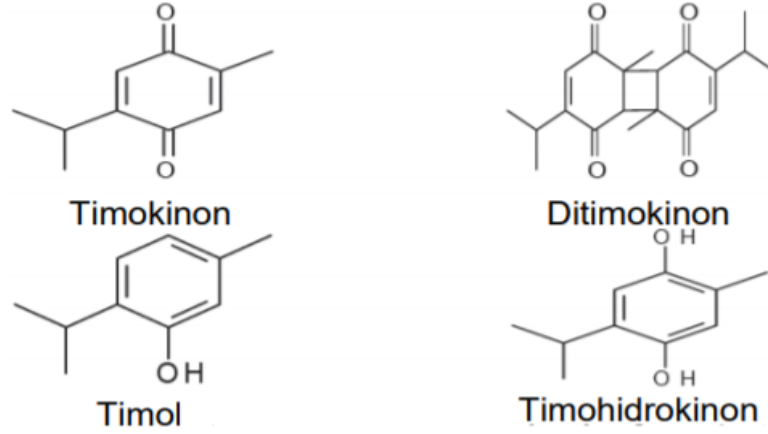


Şekil 2.2. Nigella sativa bitkisi, kapsülü ve tohumları

Geleneksel tıbbi tedavilerde oldukça sık kullanılan çörek otu tohumları, bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (23). Antik Mısır ve Yunan doktorları tarafından baş ağrısı, diş ağrısı, ödeme bağlı burun tıkanıklığı ve barsak kurdu tedavisinde, menstrual döngüyü desteklemek için, idrar söktürücü olarak ve kadınlarda süt oluşumunu artırmak amacıyla kullanılırken; Orta ve Doğu Asya’da ise gastrointestinal problemler, baş ağrısı, enfeksiyonlar, obezite, sırt ağrısı, dizanteri, hipertansiyon ve astım, gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmıştır.

Dünya genelinde egzema gibi deri hastalıklarında kullanımı oldukça kabul görmektedir. Tohumları toz şekline getirilerek, romatizmal hastalıklar, apse, halk arasında testis iltihabı olarak bilinen orşit, nazal ülserler gibi hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır.

Nigella sativa uçucu yağının başlıca aktif bileşenleri “timokinon (TQ)”, “ditimokinon (*nigellone*)”, “timohidrokinon” ve “timol”dür (24). *Nigella sativa*, tıbbi alanda ve gıdalarda da kullanılır (25).

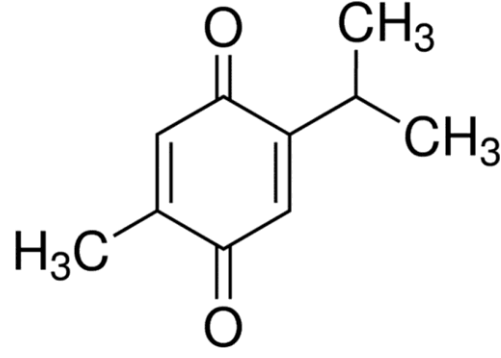


Şekil 2.3. *Nigella sativa* yağının başlıca aktif bileşenleri ve kimyasal yapıları

2.2.1. Timokinon

Nigella sativa'nın uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olan timokinon, 164.2g/mol molekül ağırlığı da, koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir monoterpen kinondur. *Nigella sativa* uçucu yağında %18.4-24 oranında bulunan ve kimyasal formülü $C_{10}H_{10}O_2$ olan timokinonun kimyasal adı 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon'dur. Hidrofob bir yapıdadır ve ışığa karşı oldukça yüksek duyarlılık gösterdiğinden ışığa maruz kalma durumunda yapısal olarak bozunmaktadır. Yüksek pH'da yani bazik ortamda stabilitesi azalırken, düşük yani asidik pH'da stabilitesi artmaktadır. *Nigella sativa*'nın uçucu yağında %18.4-24 oranında bulunan timokinonun, birçok biyolojik ve farmakolojik yararı bulunmaktadır (26–28).

Timokinonun kanser üzerine etkisini anlatan çalışmalarda, birçok kanser türünde hücre bölünmesini engelleyici özellikte olduğu tespit edilmiştir. Bunlar; göğüs adenokarsinoması, over adenokarsinoması (29), kolorektal kanser, neoplastik keratinosi (30), insan osteosarkoması (31), fibrosarkoma, akciğer sarkoması (32) olarak sıralanabilir.



Şekil 2.4. Timokinonun kimyasal yapısı

Bu bileşik *Nigella sativa* dışında *Monarda fistulosa L.* bitkisinde de ana bileşik olarak bulunur. Ayrıca *Callitris quadrivalvis*, *Juniperus cedrus Webb*, *Tetraclinis articulata* ve *Nepeta leucophylla* bitkilerinin bileşiminde de bulunur (33).

Timokinonun Etki Mekanizması

Timokinonun etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır fakat histopatolojik ve patofizyolojik durumlarda birden fazla faktörü hedef aldığı bildirilmiştir. Bilinen başlıca etkileri hücre çoğalması, hücre döngüsü, anjiyogenez, apoptozis, migrasyon, invazyon ve metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir (34)

Akut toksisite bakımından çok düşük bir etkiye sahiptir. Sürekli timokinon verilmesi sonucu sadece hipoglisemi görülmüştür (35).

Timokinon, intravenöz, intraperitoneal ve oral olarak çeşitli çalışmalarda denenmiştir. Oral yolla uygulamada toplam klerensi 12.3 ml/kg/dk, tahmini dağılım hacmi ise 5,109.46 ml/kg'dır. İntravenöz uygulamada ise toplam klerensi 7.19 ml/kg/dk, denge durumunda dağılım hacmi 700.9 ml/kg'dır. İntravenöz yolla 5 mg/kg uygulamada plazma konsantrasyonunda lineer kinetik gösteren timokinon, oral uygulama sonrası yavaş absorpsiyon ve hızlı eliminasyon gösteren bir bileşiktir (35).

Oral yolla alınan timokinon, karaciğer enzimleri [DT- diaforaz (kinin reduktaz)] ile metabolize olur ve hidrokinona indirgenir ve sonrasında merkaptirik asite dönüştürülerek idrar ile atılır. Timokinonun yarılanma ömrü yaklaşık 217 dk'dır (35, 36).

2.2.2. Timokinonun Farmakolojik Etkileri

Antioksidan Etkisi

Kararsız yapıları nedeniyle serbest radikaller biyolojik yapılarda oldukça önemli oksitleyici hasar oluşturlar. Bu hasarlar kardiyovasküler anormallikler ve kanser gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Hücre membranından geçen serbest radikaller, proteinler, nükleik asitler, ve enzimler gibi makro moleküller ile tepkimeye girer ve hasara sebep olurlar (37).

Antioksidanlar, vücudu serbest radikallere karşı korumada çok önemli bir rol oynar. Çörek otu tohumları, zengin çoklu doymamış yağ asitleri kaynakları olan ve vücudun Prostaglandin E1 üretmesine yardımcı olan 100'den fazla bileşen içerir. Mükemmel bir şifacıdır ve zayıf bağışıklık sistemini güçlendirmek için faydalıdır. *Nigella sativa*'daki bazı bileşikler, timokinon, karvakrol, t-anetol ve 4-terpinol gibi farklı bileşikler antioksidan etki gösterir ve oksidatif hasara karşı korur (38).

Timokinonun çeşitli mekanizlar aracılığıyla antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Süperoksit radikal anyon ve hidroksil radikalleri içeren reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak oksidatif stresi azaltır. Karbon tetra klorür (CCl₄) ve D-galaktozamin'in sebep olduğu hepatoksisiteye karşı timokinonun koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak; doza bağlı olarak ratlardaki verimli demir bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir (39, 40).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar sonucunda timokinonun güçlü bir OH radikal süpürücü antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (41).

Yapılan başka bir çalışmada; gentamisin ile oluşturulan toksisitenin timokinon ile tedavisi edilmesiyle, glutatyon konsantrasyonu ve renal korteksteki toplam antioksidan sisteminde meydana gelen artış sayesinde nefrotoksisitenin biyokimyasal ve histolojik göstergelerini doz-bağımlı düzelttiği ortaya konmuştur (42). KBrO₃ aracılıklı renal oksidatif stres oluşturulan ratlarda yapılan diğer bir in vivo araştırmada ise oral yolla verilen timokinonun, renal GSH içeriği ve antioksidan enzimlerdeki iyileşmelerle birlikte oksidatif streste azalma sağlamıştır (37).

Ratlarda yapılan çalışmada periferik, serebral ve koroner damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı timokinon'un koruma sağladığı ayrıca

Timokinonun *Nigella sativa* tohumundaki diğer bileşenlere kıyasla daha yüksek antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir (42, 43).

Antiinflamatuvar ve Antihistaminik Etkisi

Siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz enzimleri inflamasyonun düzenlenmesinde rol alır. Siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) enzimleri hücre içerisinde araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda görevli enzimlerdir. Timokinon, bu enzimleri inhibe ederek inflamasyona sebep olan eikosanoidlerin üretimini engeller (45).

Alerjik hava yolu inflamasyonu oluşturulan fare modelinde, timokinonun prostaglandin ve siklooksijenaz- 2 (COX2) inhibisyonuna neden olduğu ayrıca akciğer eozonofili ve goblet hücrelerinde hiperplaziye neden olduğunu bu nedenle de anti-inflamatuar etki gösterdiği bildirilmektedir (46).

Farelerde ovalbümin tarafından indüklenen alerjik konjivit üzerine timokinonun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, timokinon uygulaması, eozinofillerin, IgE seviyesinin, histamin ve sitokinlerin alımını azaltarak alerjik konjunktiviteki oküler semptomları önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bulgular, timokinonun alerjik konjivit için tedavi ve gelecekteki araştırmalar için yararlı bir teşvik olabileceğini göstermiştir (47).

İmmünolojik Etki

Nigella sativa'nın değerli özelliklerinden biri, bileşenlerinin immünomodülatör etkileridir. Uzun bir süre önce başlayan çalışmalar, *N. sativa*'nın insanda bağışıklık yanıtlarını artırabileceğini göstermektedir. 4 hafta boyunca *N. sativa* yağı ile tedavi edilen gönüllülerin çoğunluğu CD4 ile CD8 T hücre oranında % 55 artış ve doğal öldürücü (NK) hücre fonksiyonunda %30 artış gösterdi (37).

İnflamasyonlu ve otoimmün hastalıklarının iyileştirilmesinde timokinon'un makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini azaltarak yararlı olabileceğini ortaya koymuştur. Timokinon, lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan makrofajların süpernatantlarında nitrit üretimini azaltmış, periton makrofajlarındaki indüklenebilir

nitrik oksit sentaz (iNOS) protein düzeyini de konsantrasyona bađlı olarak dūřurmuřtur (48).

Sıçan periton makrofajları tarafından nitrik oksit (NO) üretimi üzerine timokinonun etkisi araştırılmıştır. Belirli koşullar altında, makrofajlar ve bazı hücreler indüklenebilir nitrik oksit sentaz yolu ile öncül L-argininden yüksek konsantrasyonlarda NO üretebilir. Timokinon, doz ve zamana bağlı olarak lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan makrofajların supernatantlarında nitrit üretimini azaltmış, periton makrofajlarındaki indüklenebilir nitrik oksit sentaz protein düzeyini de dūřurmuřtur (23).

Ek olarak, timokinon ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirtilen LPS tarafından indüklenebilir nitrik oksit sentaz mRNA ifadesindeki artışı engellemiştir.

Kontrol grubundaki LPS stimölasyonlu hücreler ile karşılaştırıldığında timokinon ile tedaviden sonra makrofajlarda iNOS için immünreaktivitenin azaldığı görüldü. Bu sonuçlar, timokinon'un NO üretimini makrofajlarla bastırđını göstermektedir. Bu durum inflamatuvar ve otoimmün durumları iyileştirmede yararlı olabilecek bir etkidir (48).

Hepatoprotektif Etkisi

Timokinonun karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkisi çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Çeřitli ajanların karaciğer dokusu üzerindeki hasarlarını antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri sayesinde nötrale edebildiği dūřünölmektedir.

Oral yolla uygulanan timokinonun, CCl₄ toksisitesine karşı önemli ölçüde koruma sağlamıştır. Timokinon karaciğer homojenatındaki enzimatik olmayan lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir. Bu, timokinon'nin CCl₄ kaynaklı toksisiteye karşı koruyucu etkisinin, timokinon'nin antioksidan etkisinin aracılık edebileceğini göstermektedir (49).

Yapılan bir çalışmada, izole sıçan hepatositlerinde timokinonun tert-butil hidroperoksit (TBHP) toksisitesine karşı hepatoprotektif etkisi test edildi. Oksidatif hasar oluşturmak için 2 mM TBHP kullanıldı ve kademeli olarak hücre içi GSH'ın tükenmesine neden oldu. Hepatositlerin 1 mM timokinon ile ön inkübasyonu, ALT ve

AST sızıntısının azalması ve TBHP'ye kıyasla tripan mavisi alımının azalmasına neden olarak, izole hepatositlerin TBHP kaynaklı toksisiteye karşı korunmasıyla sonuçlandı (50).

Ratlarda etanol ile indüklenen lipid peroksidasyonu ve böbrek ile karaciğer dokularındaki histopatolojik değişiklikleri azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca timokinon karaciğer enzimleri olan ALT, AST, ALP'nin serum düzeylerini ve karaciğer ve böbrek dokularındaki glutatyon içeriğini düzeltti. Bu çalışma gösteriyor ki etanol sebebiyle karaciğer ve böbrek dokusunda meydana gelen lipid peroksidasyonu ve inflamasyonun zararlarına karşı timokinon önleyici etki gösterebilmektedir (51).

Ratlarda asetaminofenin ile oluşturulan hepatotoksistide timokinonun antioksidan etkisi sayesinde karaciğer toksisitesine karşı tedavide edici etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca kadmiyumun sebep olduğu hepatoksisite üzerine de önleyici etkisi bulunmaktadır (51, 52).

Antikanserojenik ve Antitümör Etkisi

Çeşitli çalışmalar timokinon'nun göğüs ve yumurtalık adenokarsinomu (29), neoplastik keratinositler (54), insan osteosarkomu (31), fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri (32), gibi birçok kanser türünde olumlu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Hücre bölünmeye hazırlık evresinin G1 fazında iken timokinon apoptozisi indükleyerek kanserli hücrenin çoğalmasını durdurmaktadır (54).

Benzopirenin ile oluşturulan ön mide karsinomu ve kemik iliği hücrelerindeki kromozomal bozukluklarda kromozom anormallikleri ve hasarlı olan hücreleri önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (55).

İnsan osteosarkoma hücrelerinde timokinonun hücre büyümesini ve çoğalmasını engelleyici ve proapoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada timokinon, normal osteoblastlara karşı çok daha az toksisite göstermesi sebebiyle umut verici bir bileşik olarak değerlendirilmiştir (31).

Hepatoselüler karsinoma üzerinde timokinonun olası faydalı etkilerini araştırmak için tasarlanan bir çalışmada timokinon, programlanmış hücre ölümünde temel rol oynayan proteaz enzimleri olan kaspaz aktivasyonunu sağladı ve apoptozu tetiklemiştir.

Bu sonuç ile hepatoselüler karsinoma için timokinonun umut verici antikanser bir ajan olduğu belirtilmiştir (56).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar Malzemeler

Araştırma süresi boyunca kullandığımız kimyasallar; tartrazin, timokinon, tiyobarbutirik asit (TBA), fosforik asit (H_3PO_4), n-butanol, disodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4), trisodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7$), 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB), ksantin, ksantin oksidaz (XO), triklorasetik asit (TCA), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), disodyum EDTA (Na_2EDTA), NBT ($C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$), Bovine Serum albümine (BSA), Hidrojen peroksit (H_2O_2), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum sodyum tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), Sodyum hidroksit (NaOH), bakır sülfat ($CuSO_4$), TNF- α , İnterlökin-6 ve TAS-TOS ELISA kitleri kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hettich Universal 320 R Soğutmalı Santrifüj. Velp Scientifica vorteks. PMC series 300 Bath San Diego Su banyosu, Netheler-Hinz GmbH Mikrosantrifüj, Köttermann Labortechnik Su Banyosu, Medispec Roller Mikse, Shimadzu UV-1800-240V Spektrofotometre, WTW xylem brand pH metre, Binder etüv araştırmalar süresince kullanıldı.

3.2. Ratların Temini ve Bakımı

Araştırmamızda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 2020/17-4 numaralı kararı ile İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet 200-250 gram ağırlığında *Wistar Albino* cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar, her kafeste dört adet olacak şekilde gruplandırılarak 21° C, % 55 - 60 nem ortamında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olarak ışıklandırılan odada barındırıldı. Çalışma boyunca ad libidum olacak şekilde standart pelet sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Kafeslerin temizliği günlük olarak yapıldı.

3.2.1. Deney Grupları

1.Grup (Kontrol grubu): Mısır yağı uygulandı.

2.Grup (Tartrazin grubu): 100 mg/kg/gün tartrazin uygulandı (Sigma-Aldrich 1934-21-0, St. Louis, USA) (57).

3.Grup (Timokinon grubu): 50 mg/kg/gün timokinon uygulandı (Sigma-Aldrich-490-91-5, St. Louis, USA) (58).

4.Grup (Tartrazin+Timokinon grubu): 100 mg/kg/gün tartrazin+50 mg/kg/gün timokinon uygulandı.

Ratlar tartılarak yukarıda belirtilen dozlara göre uygulanacak madde miktarları belirlendi. Tartrazin serum fizyolojik içinde, çözüldükten sonra her gün aynı saatlerde ve rat başına 1 ml/ gün olacak şekilde oral yolla (gavaj) uygulandı. Timokinon ise mısır yağında çözüldükten sonra rat başına 0.250 ml/ gün olacak şekilde oral yolla (gavaj) uygulandı. Uygulama 21 gün boyunca devam etti.

3.3. Numune Alınması ve Hazırlık İşlemleri

Uygulamalar sonlandıktan sonra etik kurul protokolüne göre ratlar anestezi altında (ksilazin ve ketamin) karın bölgeleri açıldı ve kalp dokusundan kan örnekleri uygun kan tüplerine alındı. Karaciğer dokuları çıkartıldı ve fazla kanın dokudan uzaklaştırılması için serum fizyolojikte yıkandı. Karaciğer dokularının bir kısmı steril kaplara konularak biyokimyasal incelemeler için -80 C° ye hızlıca kaldırıldı. Yine karaciğer dokularının geri kalan kısmı histopatolojik incelemeler için %10'luk formol içeren uygun kaplara konuldu.

3.4. Biyokimyasal Analizler

Çalışma zamanı geldiğinde dokular -80 C° den çıkarıldı ve çözünmesi bekletilmeden hızlı bir şekilde tartıldı. Dokulara ağırlıklarının 9 katı kadar fosfat tamponu ilave edildi. +4 C°'de 1 dakika boyunca 15000 devir/dakika homojenize edildi (IKA, Germany). Bu elde edilmiş homojenatlardan malondialdehit (MDA) seviyeleri

ölçüldü. Elde edilmiş doku homojenatları +4 C° derecede, 4000 rpm' de 25 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlardan; Glutatyon (GSH), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (KAT), Total oksidan kapasite (TOS), Total antioksidan kapasite (TAS), Oksidatif stres indeks (OSI) protein, Tnf- α ve İL-6 seviyeleri ölçüldü.

3.4.1. MDA Analizi

0.24ml doku homojenatı 1.5 ml %1 H₃PO₄ ve 0.5 ml %0.6 tiyobarbitürik asit ile karıştırıldı. TBA'nın iyice çözünmesi için 30°C'de ısıtıldı. Karışım 100°C'de 45 dakika boyunca ısıtıldı. Bu sürenin sonunda tüplerde kırmızı bir renk oluşumu gözlemlendi ve tüpler çeşme suyunda soğutulduktan sonra her numuneye 2ml n-bütanol eklendi. Her tüp 5 dakika boyunca vortekslendi. 5 dakikanın sonunda numuneler 25°C'de 5000rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant (n-bütanol fazı) dikkatlice 250µl alındı ve ayrı ayrı kuvarz mikropileyt kuyucuklarına aktarıldı. 535 nm'de okuma yapıldı. Kör olarak n-bütanol, standart eğrisi oluşturmak için ise tetraetoksipropan kullanıldı. Sonuçlar nanomol/gram yaş doku olarak değerlendirildi (59).

3.4.2. Redükte GSH Analizi

Süpernatant trikarboksilik asit (TCA) ile deproteinize edildi. Bunun için 125 µl numuneye 125 µl TCA eklendi. Karışım iyice vortekslendikten sonra +4°C'de 5000rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Böylece proteinden arındırılmış süpernatant elde edildi. 29 µl deproteinize numune, 29 µl DTNB ve 235 µl Na₂HPO₄ olacak şekilde her numune ayrı ayrı mikropileyt kuyucuklarına ilave edildi. Hafifçe vorteks yapılarak 5 dk beklendi. Daha sonra 5 dakika içinde 410 nm'de okumalar yapıldı. Sonuçlar nanomol/gram yaş doku olarak değerlendirildi (60).

3.4.3. SOD Aktivitesi Analizi

Yöntem; süperoksit kaynağı olarak ksantin+ksantin oksidaz sistemi kullanılarak, süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesiyle ortamda renk oluşturması ve bu rengin şiddetinin spektrofotometrede ölçülmesiye SOD aktivitesinin hesaplanmasına dayanır. Bu indirgenme mavi renkli farmazon oluşturur ve 560 nm'de maksimum absorbans

vermektedir. Ortamda enzim olmadığında bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşur. SOD varlığında ise enzim süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e çevirir ve böylece NBT indirgenmesi azalarak mavi farmazon oluşmaz veya rengin şiddeti azalır. Eğer ortamda SOD az ise süperoksit tarafından NBT redüksiyonu ve dolayısıyla oluşan mavi renkli farmazonun 560nm'deki absorbansı fazla, eğer ortamda SOD fazla ise NBT redüksiyonu az olduğundan mavi farmazon oluşumu azalarak 560nm'deki absorbans az olur. Bu yöntem ile üretilen mavi renkli farmazonun 560nm'deki absorbansına dayanarak SOD aktivitesi hesaplandı. Kör olarak distile su kullanıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı (61).

3.4.4. KAT Aktivitesi Analizi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) UV spektrumunda absorbans veren bir maddedir ve maksimum absorbans verdiği dalga boyu 240 nm' dir. Deney ortamına eklenen hidrojen peroksitin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmasıyla 240 nm'de absorbans azalması gözlenir. Absorbansta gözlenen bu azalma kinetik okuma yapılarak 1 dk boyunca kaydedildi ve enzimin aktivitesi ölçüldü. Enzimin aktivitesi K/mg protein olarak değerlendirildi (62).

3.4.5. GSHPx Aktivitesi Analizi

GSH-Px redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksidin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonucunda redükte glutatyon okside forma dönüşür. Başka bir hidrojen peroksidin suya dönüşebilmesi için okside glutatyonun tekrar redükte forma dönüşmesi gerekir. Bunun için ortamda redükte NADP ve redükte glutatyon varlığında gerçekleşir. Bu durumda redükte NADP okside NADP'ye dönüşürken, okside glutatyon redükte glutatyon formuna dönüşür. Redükte NADP 340 nm'de maksimal absorbans verir. Glutatyon redüktaz katalizi devam ettikçe 340nm'de absorbans düşer. Çünkü redükte NADP okside forma dönüşmektedir. Absorbansdaki bu azalma 3 dk boyunca kaydedilerek GSH-Px aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar U/mg protein olarak değerlendirildi (63).

3.4.6. Protein Analizi

Dokuların protein içerikleri enzim aktivitelerinin hesaplanabilmesi için gereklidir. Dokulardaki protein varlığını belirlemek için Lowry yöntemine göre çalışıldı. Oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 660 nm'de ölçüldü ve dokulardaki protein miktarı tespit edildi (64).

3.4.7. TAS Analiz

Dokulardaki TAS tayini için, TAS Rel Assay brand kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey) kullanıldı. Ölçüm, antioksidan moleküllerin renksizleşmesine dayanılarak yapıldı. Kit talimatlarına göre sırayla adımlar uygulandı. Öncelikle ölçüm yapılacak cihaz 37°C, 7 saniye shake, 23 saniye delay ve 660 nm'de okuma yapacak şekilde ayarlandı. Numuneler 12 µl olacak şekilde kuyucuklara aktarıldı. Level 1, Level2, standart ise her birinden 3'er tane olacak şekilde kuyucuklara koyuldu. Bunların üzerine 200 µl reaktif 1 eklendi ve beklemeden 660nm'de 1. Okuma yapıldı. Daha sonra cihaz 37°C, 10 saniye shake, 4.30 dk delay ve 660 nm'de okuma yapacak şekilde ayarlandı her bir kuyucuğa 30 µl reaktif 2 eklenerek tekrar okuma yapıldı ve kit prosedüründe belirtildiği şekilde hesaplamalar yapıldı (65). Sonuçlar mmol Trolox Eqv/L olarak hesaplandı.

3.4.8. TOS Analizi

Dokuların TOS seviyesini belirlemek için TOS Rel Assay brand kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Turkey) kullanıldı. Numunedeki oksidanların ferrous iyon şelator komplekslerini ferrik iyonlara çevirmesiyle Ferrik iyonları, kromojenik çözelti ile renkli bir kompleks oluştururlar. Kite belirtildiği şekilde 25 °C ayarlanmış cihazda 530 nm'de renkli kompleksin absorbansı ölçülerek ve gerekli hesaplamalar yapılarak TOS seviyesini belirlendi. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv/L olarak ifade edildi (66).

3.4.9. OSI Analizi

Oksidatif yükün göstergesi olan oksidatif stres indeksi TOS değerlerinin TAS değerlerine bölünmesi ve 10 ile çarpılmasıyla elde edilmektedir. Sonuçlar Arbitrary Unit olarak ifade edildi.

3.5. Biyokimyasal Serum Analizleri

Serumların İnterlökin-6 ve TNF- α seviyesini belirlemek için Bioassay Technology Laboratory İnterlökin-6 ELISA Kit ve Bioassay Technology Laboratory Tumor necrosis factor α ELISA Kit kullanıldı. Her iki kit için de aynı işlemler uygulandı. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kit prosedüründe tarif edildiği gibi hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi ve testler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Her kuyucuğa numune ve ELISA reaktifi eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile mikropate yıkayıcıda beş kez yıkama yapıldı. Substrat solüsyonu A ve B'yi eklenerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra stop solüsyonu eklendi ve renk değişimi gözlemlendi. On dakika içerisinde okuma yapıldı. Sonuçlar her iki parametre için de ng/L olarak değerlendirildi(67).

3.6. Histolojik Analizler

Histopatolojik inceleme için karaciğer dokusu örnekleri %10'luk formaldehit içinde 48 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında karaciğer doku örnekleri artan derecelerdeki (%50, %70, %80 %96, Absolü) etanol serisinden geçirilerek dehidrate edildi. Ardından ksilen serisinden geçirilerek şeffaflandırma işlemi uygulandı ve karaciğer doku örnekleri infiltrasyon için 62 °C'de erimiş parafin serisinden geçirildikten sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 6 μ m kalınlığında kesitler hazırlanarak lamalar üzerine alındı. Alınan kesitlere hematoksilin–eozin (H-E) ve immunohistokimyasal (IHC) inceleme için anti caspase-3 (Cleaved-CASP3p17 (D175) Polyclonal Antibody) (Elabscience, Texas, USA) boyamaları uygulandı. Boyanan kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi3 mikroskop kamerası ve Nikon NIS-Elements Documentation 5.02 görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Hematoksilen–eozin ile boyanmış olan karaciğer kesitlerindeki histopatolojik değişiklikler (inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz, periportal ödem, vasküler konjesyon) 0 ile 3 arasında (0; yok, 1; hafif-nadir, 2; orta dercede-yer yer, 3; şiddetli-yaygın) maksimum toplam skor 12 olacak şekilde skorlandı.

3.6.1. İmmünohistokimya

Bölünmüş Kaspaz-3 ekspresyonu, karaciğer dokusunda apoptozun bir göstergesi olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyama için alınan kesitler polilizin kaplı lamlara yerleştirildi. Kesitler ilk önce deparafinizasyon işleminden geçirildi. Daha sonra antijen alımı için sitrat tamponu, pH 7.6, (Thermo Scientific, Fremont, CA) ile 15 dk boyunca retriğerda (Retriever 2100) (Aptum, Southampton, UK) ısıtılıp işlemeye tabi tutuldu. Çıkarılan kesitler 20 dakika boyunca oda sıcaklığında soğutulduktan sonra önce distile su ardından fosfat tamponlu salin (PBS) ile 1-2 dk yıkandı. Kesitler hidrofobik kalem ile çizilip platforma dizildi ve endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit ile muamele edildi, ardından PBS ile yıkandı. Kesitler, protein-V bloke edici reaktif (Thermo Scientific) ile 5 dakika inkübe edildi. Kesitler, 1:200 oranında seyreltilmiş birincil sıçan poliklonal Bölünmüş Kaspaz-3 antikoru (Cleaved-CASP3p17 (D175) Polyclonal Antibody) (Elabscience, Texas, USA) ile 1 saat süreyle inkübe edildi, ardından PBS içinde durulandı ve biyotinlenmiş keçi anti-polivalan sekonder antikoru ile 10 dakika inkübe edilip PBS içine alındı. Daha sonra streptavidin peroksidaz (HRP) ile 10 dakika süreyle inkübe edilip PBS içine alındı. Polivalent HRP kiti (Thermo Scientific) üreticinin talimatlarına göre kullanıldı. Son olarak, kesitler kromojen (AEC; Thermo Scientific) + substrat tamponu (AEC) (Thermo Scientific) ile maksimum 15 dakika muamele edildi. PBS ve distile su ile yıkama işleminden sonra Mayer hematoksilen ile 1 dakika boyunca zıt boyama yapıldı. Kesitler, önce musluk suyunda sonra damıtılmış suda durulandı ve su bazlı kapatıcı (Thermo Scientific, Cheshire, UK) yardımı ile lamelle kapatıldı.

İmmünohistokimyasal yöntemle anti caspae-3 boyaması uygulanan kesitlerde caspase-3 immunreaktivitesi H skoru ($H \text{ Skoru} = \sum_{i=1}^n P_i (i+1)$, P_i , her bir yoğunluk kategorisindeki (%0-100) boyanmış hücrelerin yüzdesidir ve i , zayıf ($i = 1$), orta ($i = 2$) veya güçlü boyama ($i=3$) (Budwit-Novotny ve diğerleri, 1986)) belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Ratların Ağırlık Değişimleri

Tablo 4.1. Ratların haftalara göre ağırlık değişimleri

Gruplar	1.Hafta	2. Hafta	3. Hafta
Kontrol	295.5 (280-307) ^a	315,5 (293-342) ^b	328.5 (302-352) ^c
Timokinon	274 (249-290) ^a	295 (267-315) ^b	303 (275-320) ^c
Tartrazin	250.5 (232-271) ^a	271 (243-282) ^b	281 (252-290) ^c
Timokinon +	268.5 (241-298) ^a	274(243-314) ^b	288 (246-319) ^c
Tartrazin			
p	<0.001	<0.001	<0.001

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ratların ağırlık değişimleri arasında, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir fakat haftalara göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde tüm gruplar için kilo artışı gözlemlenmiştir.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4.2. Oksidan – antioksidan parametreler

Gruplar	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)	SOD (Ü/mg protein)	KAT (K/mg Protein)	GSH-Px (Ü/mg protein)
Kontrol	116.9 (108.8-126.4) ^a	1089 (1008-1351) ^a	1.9 (1.2-3.1) ^a	48.7 (38.2-60.2) ^a	262 (246.307) ^a
Timokinon	102 (87.72-117.6) ^b	1349 (1062-1972) ^b	0.9 (0.4-2.2) ^b	65.4 (62.3-67.9) ^b	290 (262-325) ^b
Tartrazin	132 (121-138.8) ^c	885 (809-947) ^c	2.9 (2.3-4) ^c	30.3 (25.-38.9) ^c	230 (204-262) ^c
Timokinon + Tartrazin	112.2 (95.2-129.8) ^{a,b}	1086 (932-1198) ^a	1.5 (0.7-2.2) ^b	37.8 (34.5-47.2) ^d	242 (213-270) ^d
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.3. Oksidatif stres indeks parametreler

Gruplar	TOS ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ Eqv/l)	TAS (mmol Trolox Eqv/l)	OSI (AÜ)
Kontrol	17.8 (16.4-21.8) ^a	2.25 (2.1-2.27) ^a	81.3 (75-96.2) ^a
Timokinon	14.9 (13-19) ^b	4.07 (3.86-4.98) ^b	37.8 (26.7-39.2) ^b
Tartrazin	28.2 (25.9-29.4) ^c	1.99 (1.82-2.08) ^c	140 (124.9-162) ^c
Timokinon + Tartrazin	16.8 (15.1-21.2) ^a	2.13 (1.84-2.31) ^d	82.2 (74.6-95.4) ^a
p	<0.001	<0.001	<0.001

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

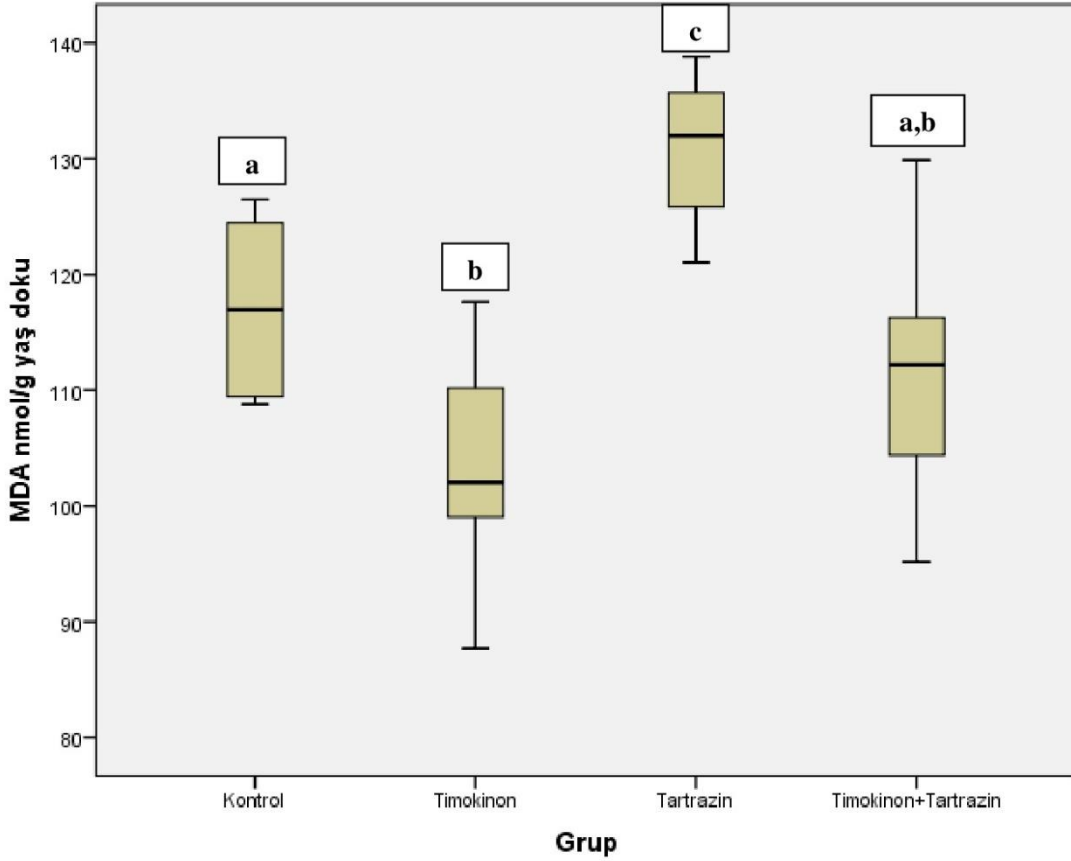
Tablo 4.4. İnflamasyon Parametreler

Gruplar	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
Kontrol	82.6 (69.4-112.5) ^a	63.9 (46.4-79.7) ^a
Timokinon	76.4 (74.1-96) ^b	57.3 (41.1-69.1) ^b
Tartrazin	104.5 (78.8-116) ^c	83.6 (67.8-89.9) ^c
Timokinon + Tartrazin	89 (73.1-110.5) ^d	73.5 (57.2-86) ^d
p	<0.001	<0.001

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.1. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyleri

Tartrazin uygulaması karaciğer dokusu MDA düzeyini kontrol ve timokinon gruplarına göre anlamlı derecede arttırırken, timokinon + tartrazin grubunda MDA düzeyinin tartrazin grubuna göre anlamlı derecede düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir ($p<0.001$).

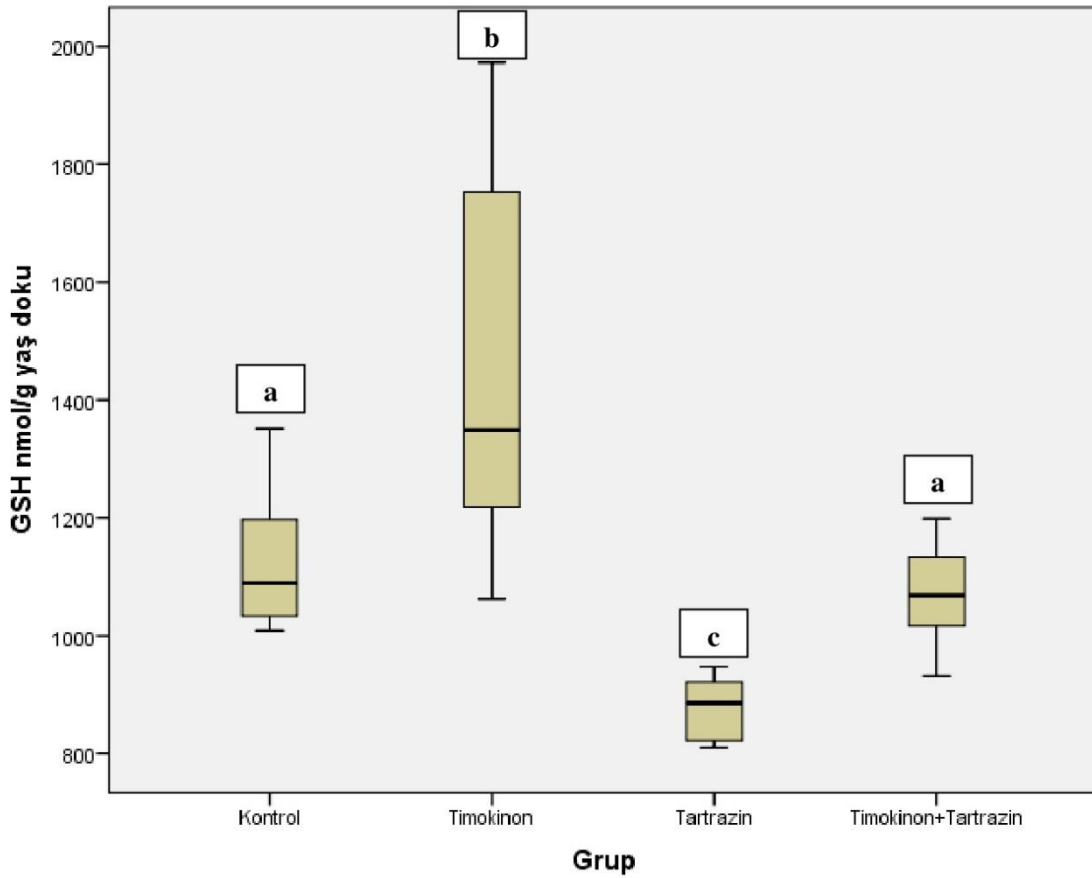


Şekil 4.1. Grupların karaciğer dokusu MDA düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.2. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyleri

Timokinon grubu GSH düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde yükselirken, tartrazin grubunun GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşüş göstermiştir. tartrazin+timokinon uygulanan grubun GSH düzeyi ise tartrazin grubuna göre anlamlı şekilde artış göstermiştir. Hatta GSH düzeyi kontrol grubu seviyelerine gelmiştir ($p<0.001$).

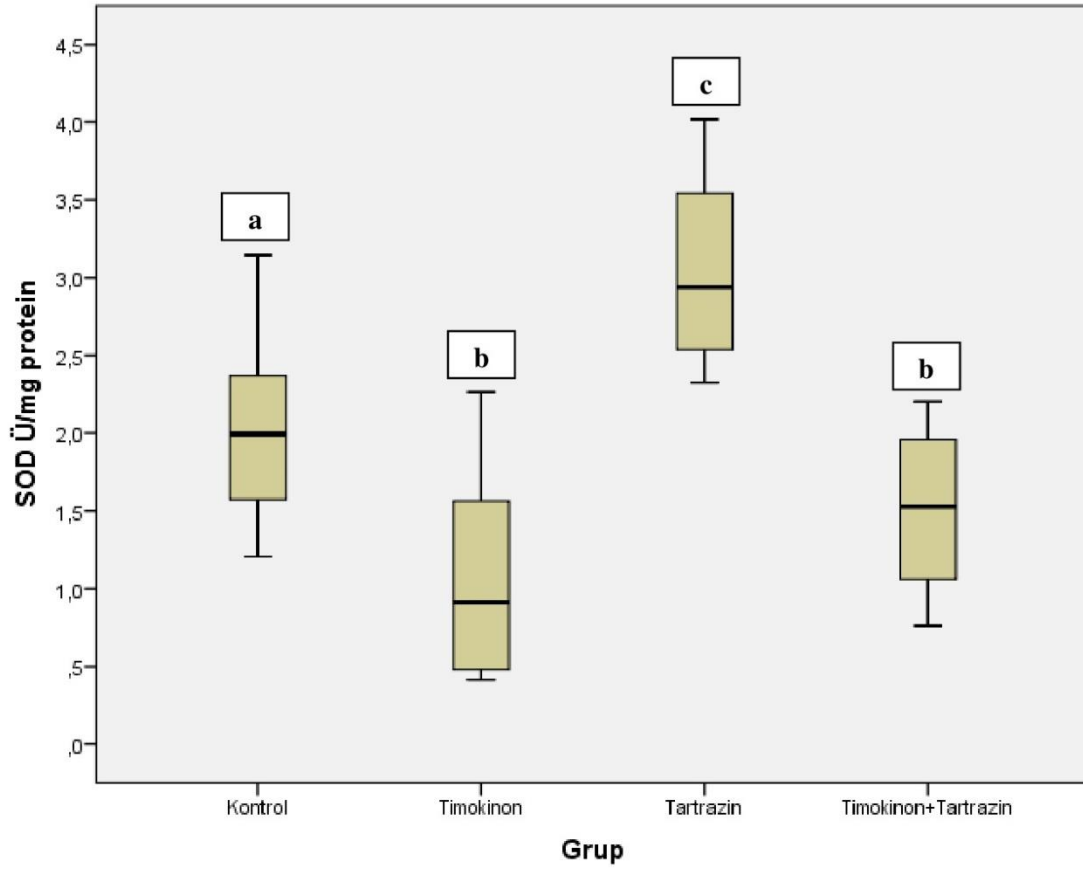


Şekil 4.2. Grupların karaciğer dokusu GSH düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.3. Karaciğer Dokusu SOD Aktivite Düzeyleri

Tartrazin uygulaması karaciğer SOD enzim aktivitesinde kontrol ve timokinon gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede artışa sebep olmuştur. Timokinon tedavisinden sonra tartrazin grubuna göre SOD enzim aktivitesinin istatistiksel açıdan önemli olacak şekilde düşmüş olduğu görülmektedir ($p<0.001$)..

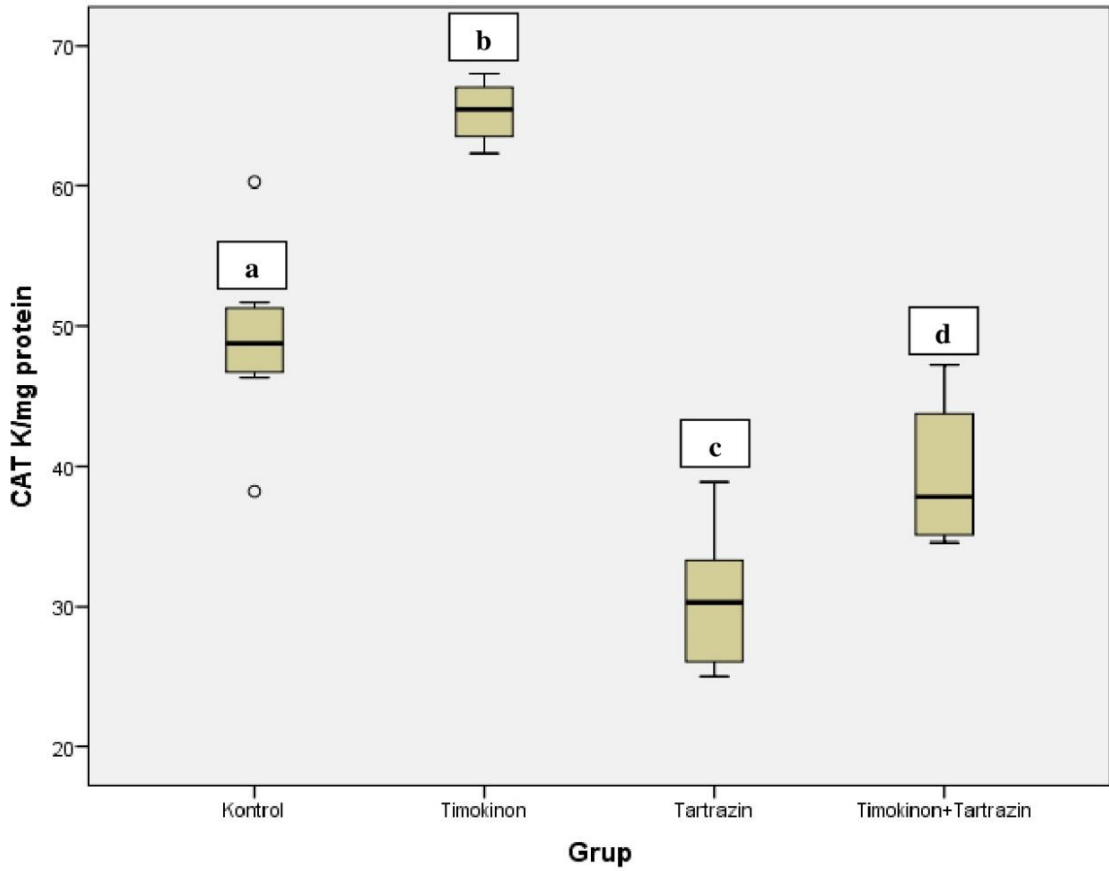


Şekil 4.3. Grupların karaciğer dokusu SOD enzim aktivite düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.4. Karaciğer Dokusu KAT Aktivite Düzeyleri

Tartrazin uygulamasının karaciğer KAT enzim aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü, buna karşın timokinon ile tedaviden sonra KAT enzim aktivitesinde tartrazin uygulanan gruba kıyasla artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$).

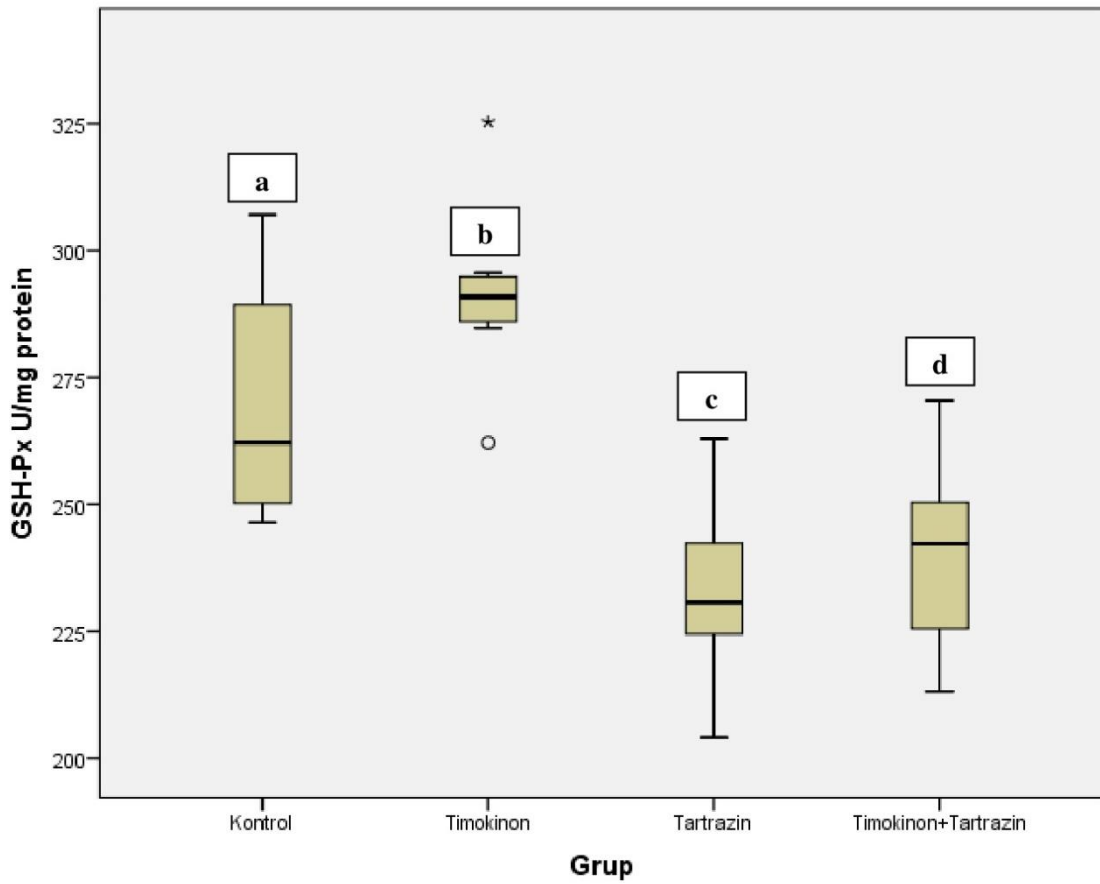


Şekil 4.4. Grupların karaciğer dokusu KAT enzim aktivite düzeyleri

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.5. Karaciğer Dokusu GSH-Px Aktivite Düzeyleri

Timokinon uygulaması kontrol grubuna göre GSH-Px düzeyinde anlamlı şekilde ($p<0.05$) artışa sebep olurken, tartrazin uygulaması ciddi oranda düşüşe sebep olmuştur. Timokinon tedavisi sonrasında GSH-Px düzeyinde anlamlı şekilde bir artış gözlenmiştir ($p<0.001$).

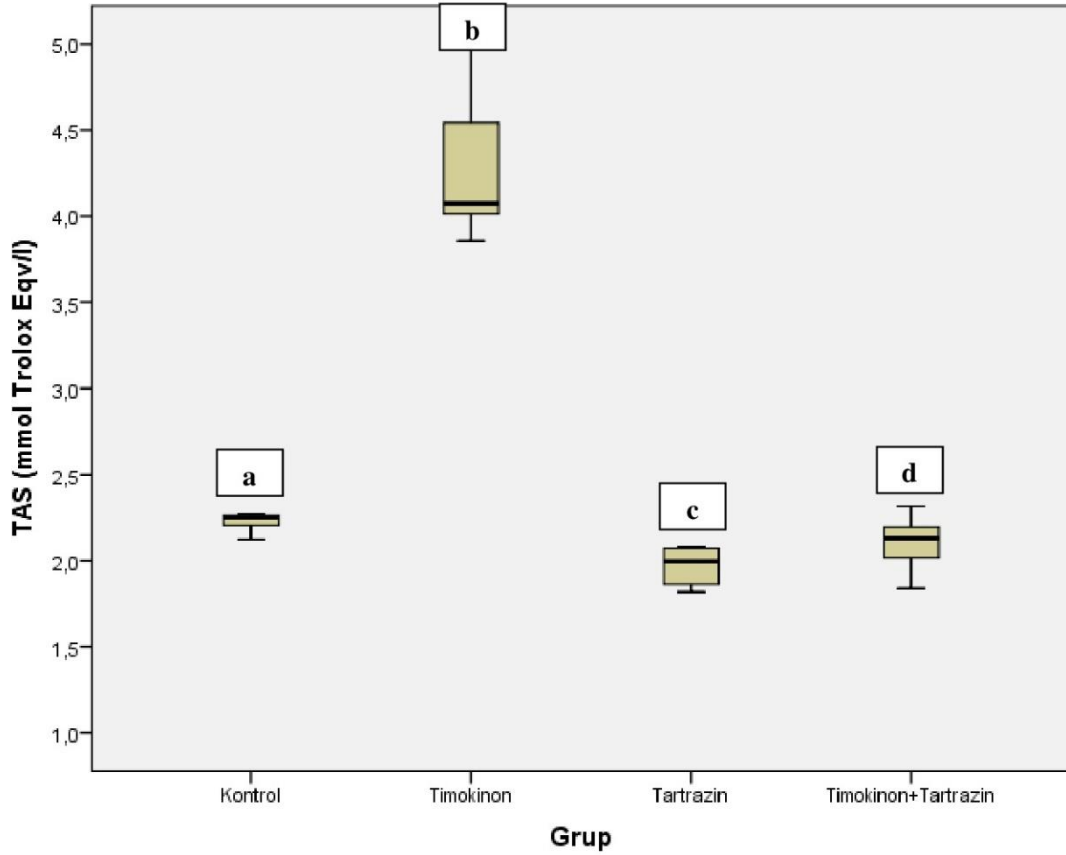


Şekil 4.5. Grupların Karaciğer Dokusu GSH-Px enzim aktivite düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.6. Karaciğer Dokusu TAS Düzeyleri

Tartrazin uygulaması karaciğer TAS düzeyini kontrol ve timokinon gruplarına göre anlamlı derecede düşürmüştür. Timokinon tedavisi sonrasında ise TAS düzeyinde tartrazin grubuna göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir ($p<0.001$).

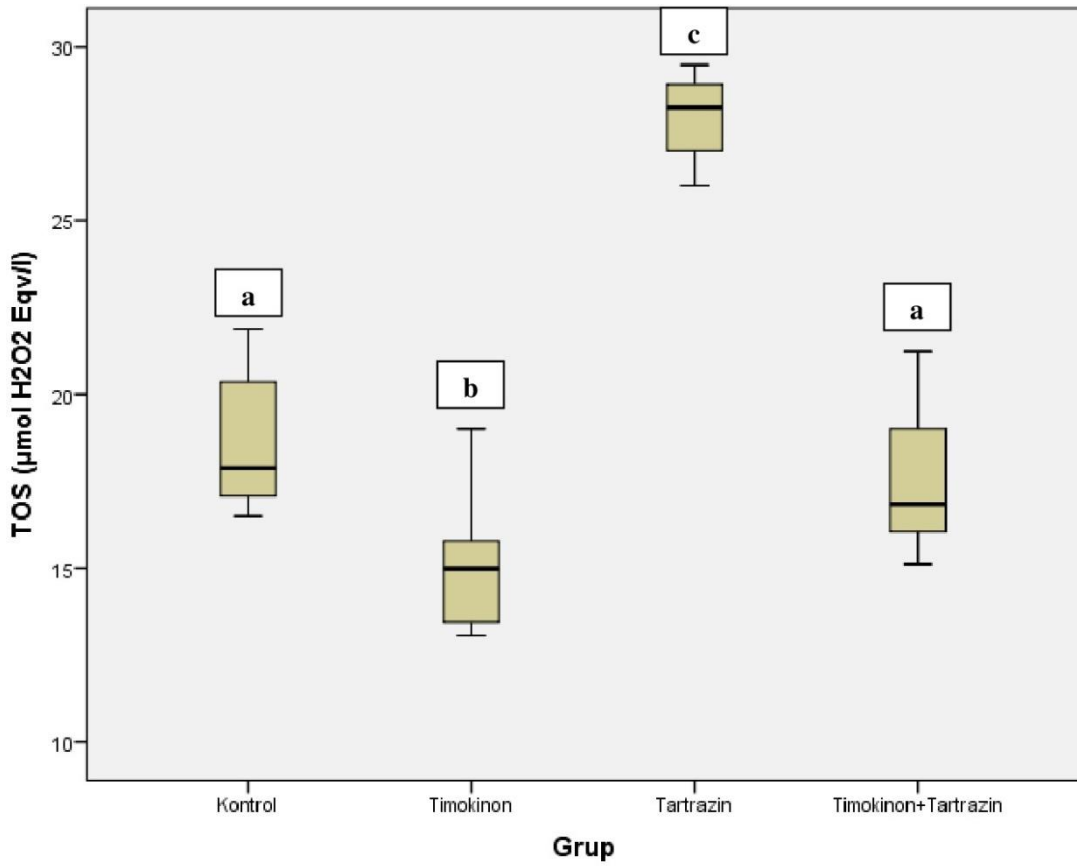


Şekil 4.6. Grupların karaciğer dokusu TAS düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.7. Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri

Timokinon uygulaması karaciğer TOS düzeyini diğer gruplara oranla önemli ölçüde azaltmıştır. Tartrazin uygulaması timokinon ve kontrol gruplarına göre TOS düzeyini anlamlı şekilde artırırken, timokinon ile tedavi sonucunda TOS düzeyinin kontrol grubu seviyesine getirdiği görülmektedir ($p < 0.001$).

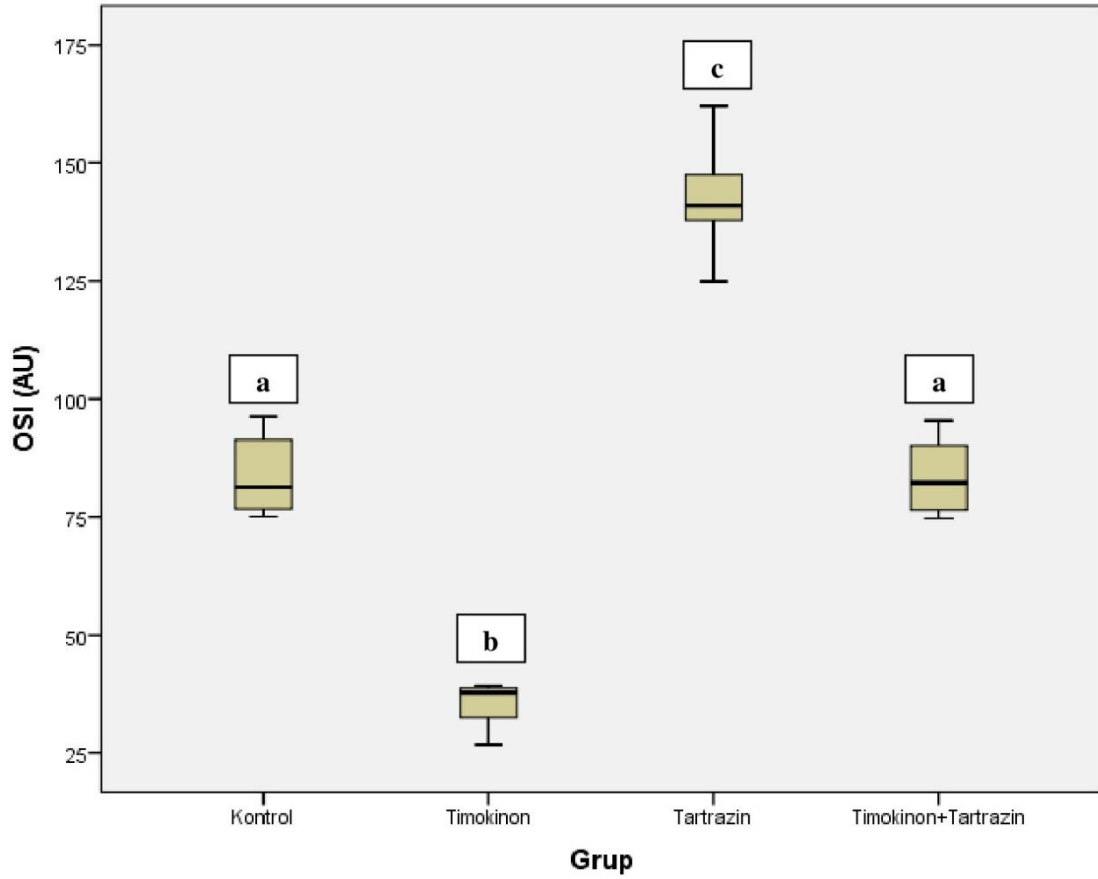


Şekil 4.7. Grupların Karaciğer Dokusu TOS Düzeyleri.

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.8. Karaciğer Dokusu Oksidatif Stres İndeksi

Timokinon uygulanan grup kontrol grubuna oranla oksidatif stres indeksini düşürürken, tartrazin uygulanan grup kontrol grubuna oranla oksidatif stres indeksini istatistiksel açıdan anlamlı şekilde arttırmıştır. Timokinon ile tedavi edilen grupta ise oksidatif stres indeksi kontrol grubu ile aynı seviyeye gelmiştir ($p<0.001$).

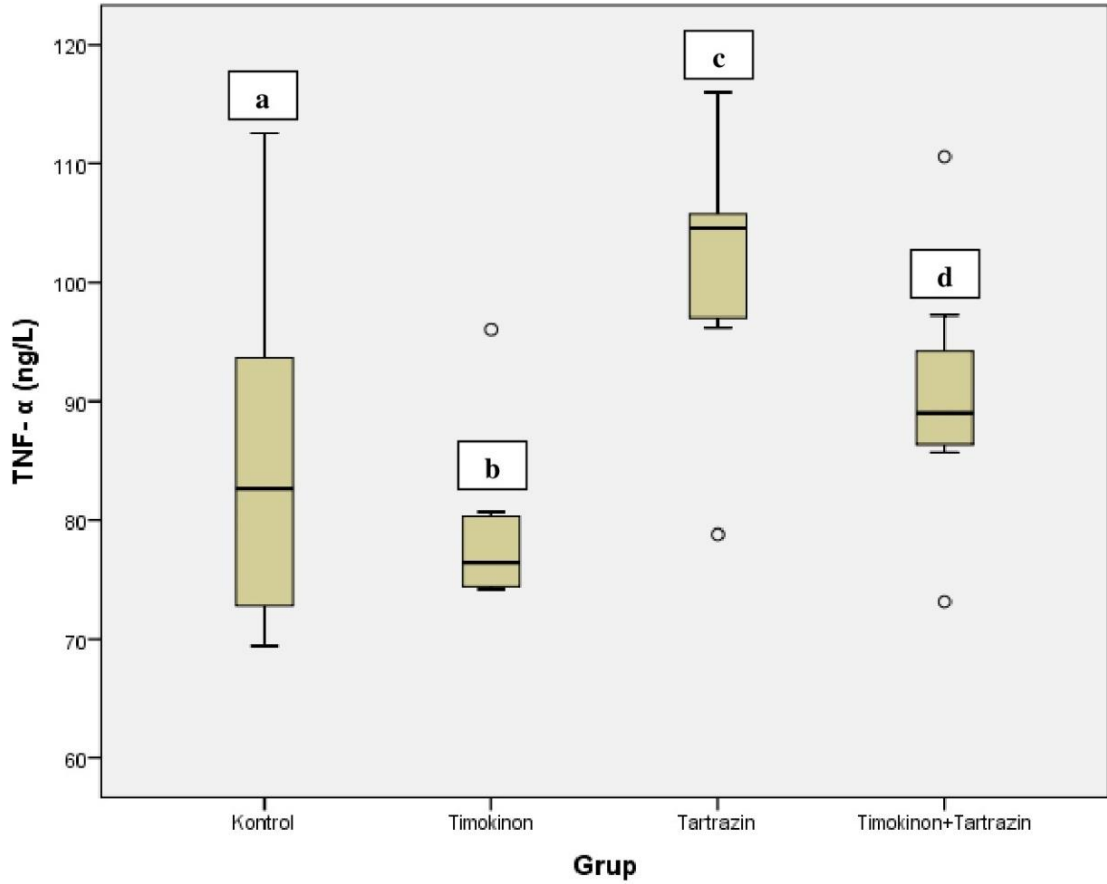


Şekil 4.8. Grupların Karaciğer Dokusu OSI Düzeyleri

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.9. Serum TNF- α Düzeyleri

Tartrazin uygulaması kontrol ve timokinon gruplarına göre TNF- α düzeyini artırırken, timokinon ile tedavi edilen grupta tartrazin grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde düşüş gözlenmiştir ($p < 0.001$).

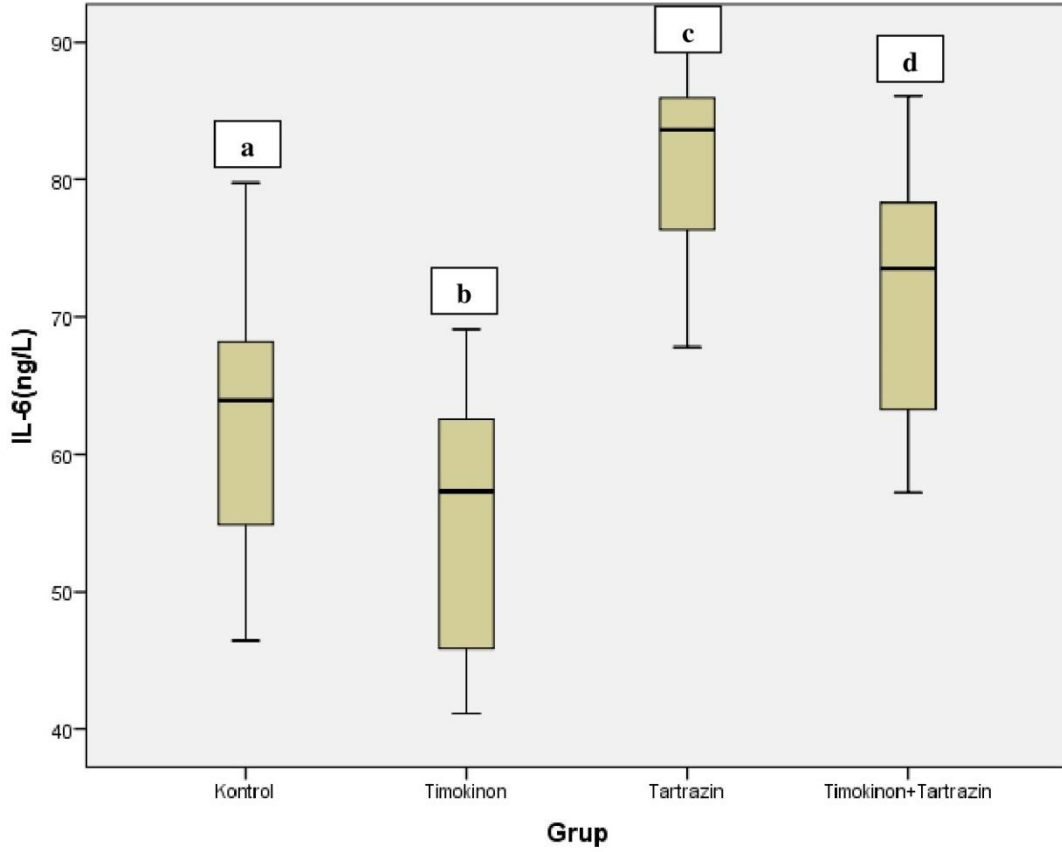


Şekil 4.9. Grupların Karaciğer Dokusu TNF- α Düzeyleri

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.10. Serum IL-6 Düzeyleri

IL-6 düzeylerinde tartrazin uygulanan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan önemli derecede artış olurken timokinon ile tedavi edildiğinde anlamlı düzeyde düşüş görülmüştür ($p < 0.001$).

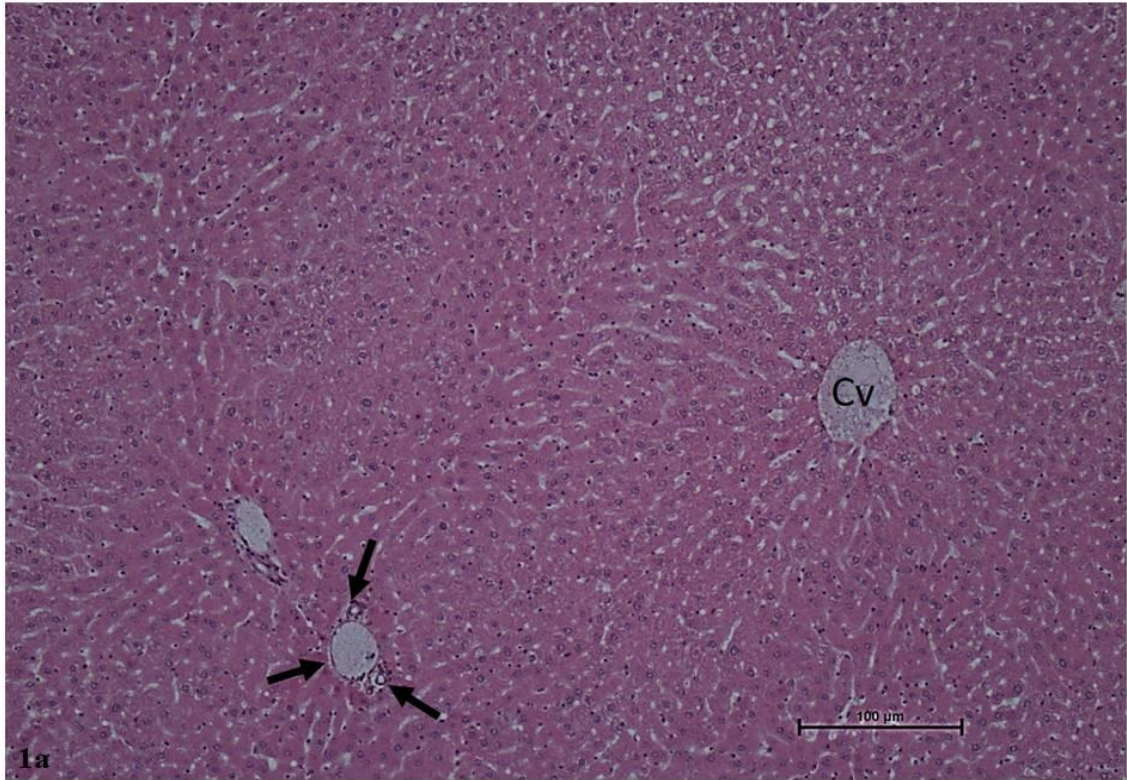


Şekil 4.10. Grupların Serumda IL-6 Düzeyleri

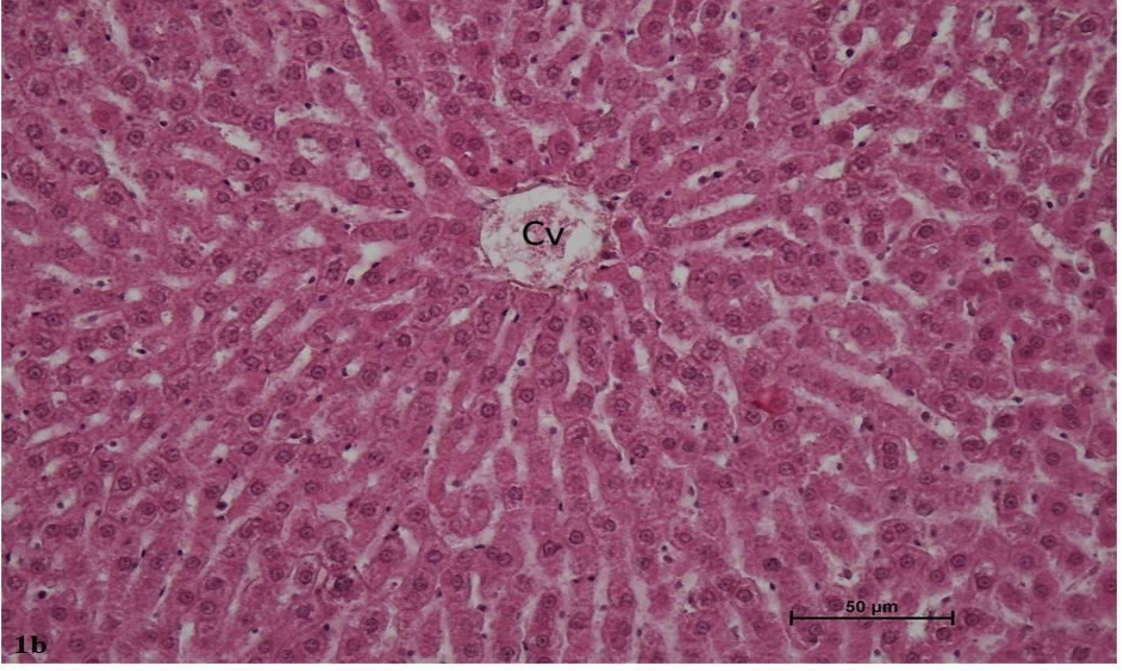
*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.3. Histolojik Bulgular

Kontrol ve timokinon gruplarına ait hematoxilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitlerinde karaciğer parankimini oluşturan hepatosit kordonları, sinüzoidler, santral ven ve portal alanlar normal histolojik yapıda değerlendirildi. Karaciğer lobülleri merkezi yerleşimli santral ven çevresinde ışınal düzenlenmiş hepatosit kordonları ve sinüzoidler içerecek şekilde olağan yapıda değerlendirildi. Portal triad bağ dokusu ve içerdiği vasküler yapılar ile safra kanalları açık olup normal histolojik yapıda izlendi.



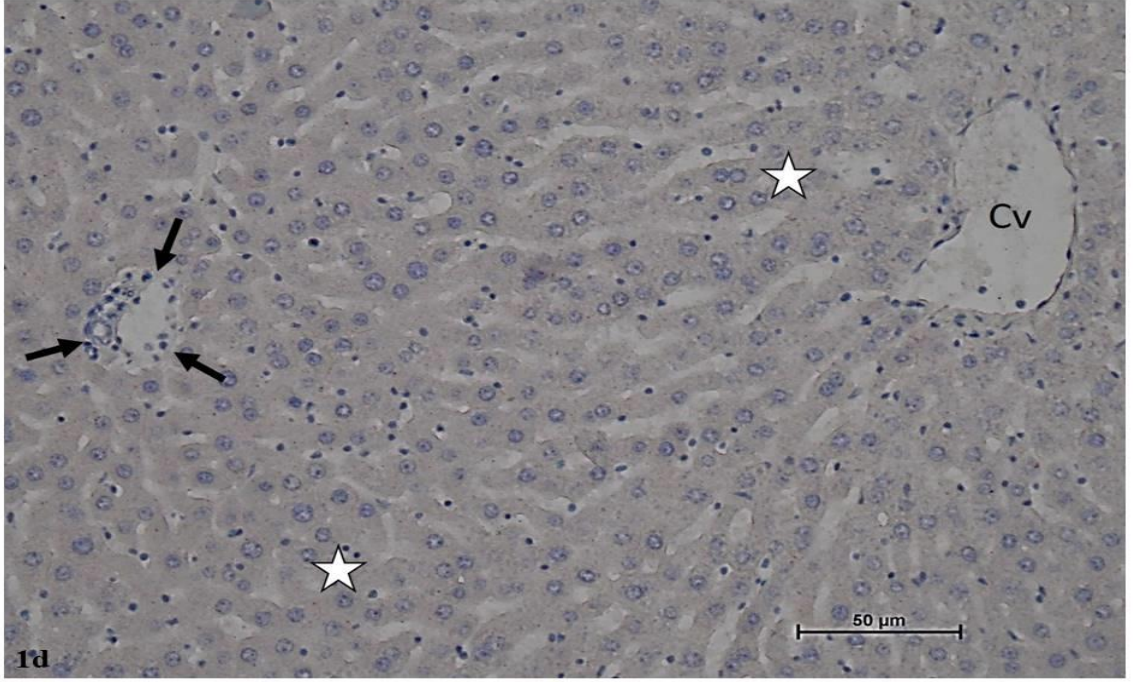
Şekil 4.11. (1a) Kontrol grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv), portal alan (oklar). H-E, x10.



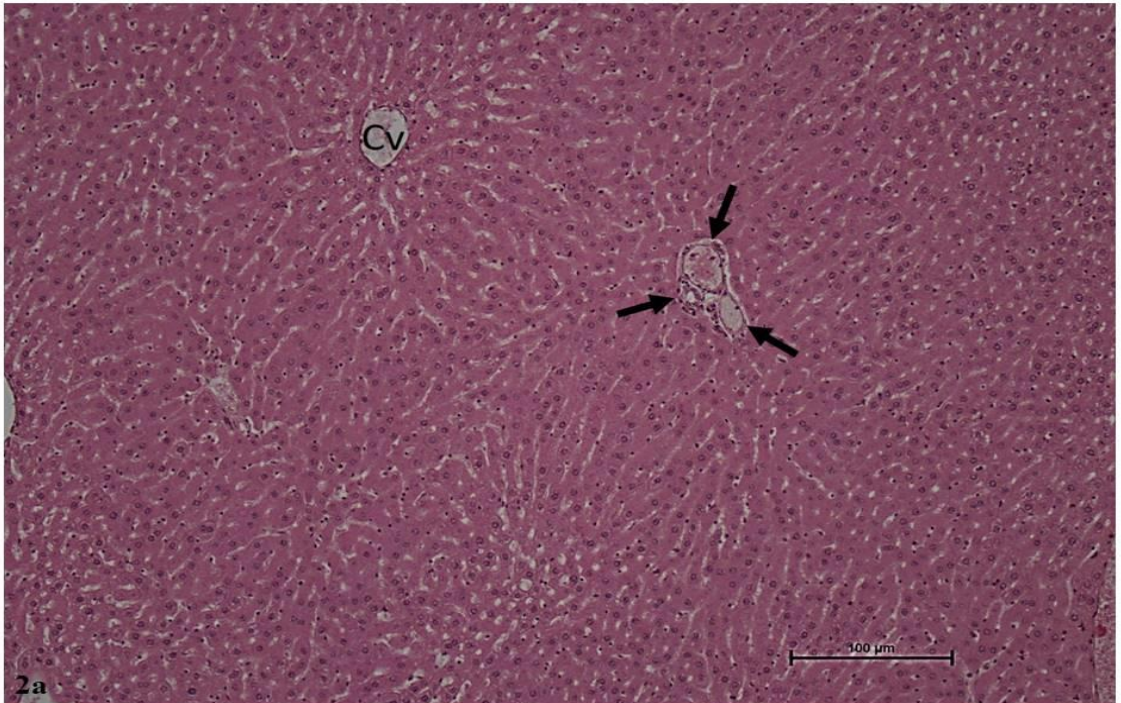
Şekil 4.12. (1b) Kontrol grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv). H-E, x40.



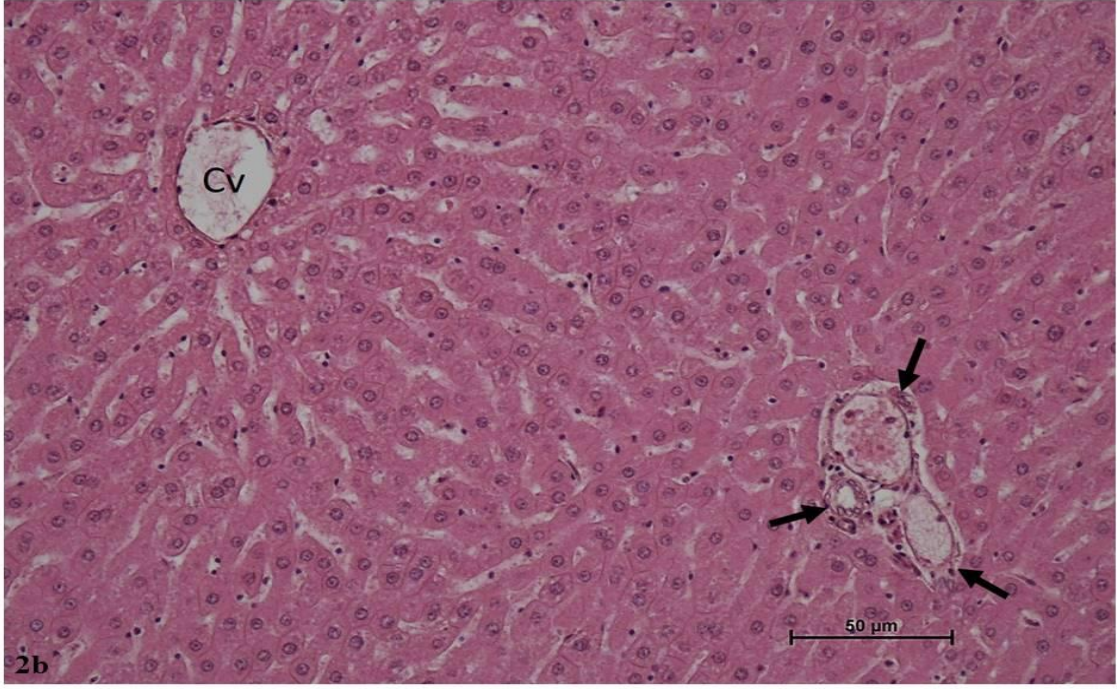
Şekil 4.13. (1c) Kontrol grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Mitoz figürü (beyaz ok), portal alan (siyah oklar). H-E, x40.



Şekil 4.14 (1d) Kontrol grubu. Karaciğer parankimi, caspase-3 immunreaktivitesi negatif (yıldız), santral ven (Cv), portal alan (oklar). IHC, x20.



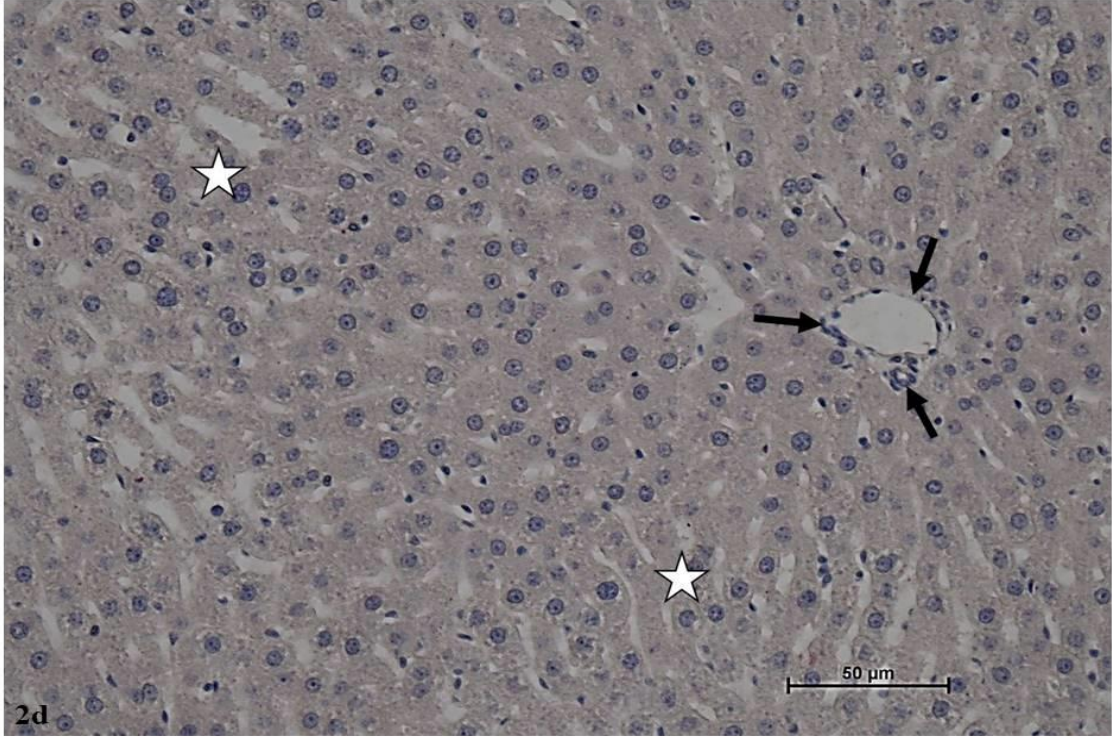
Şekil 4.15. (2a) Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv), portal alan (oklar). H-E, x10.



Şekil 4.16. (2b) Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv), portal alan (oklar). H-E, x20.

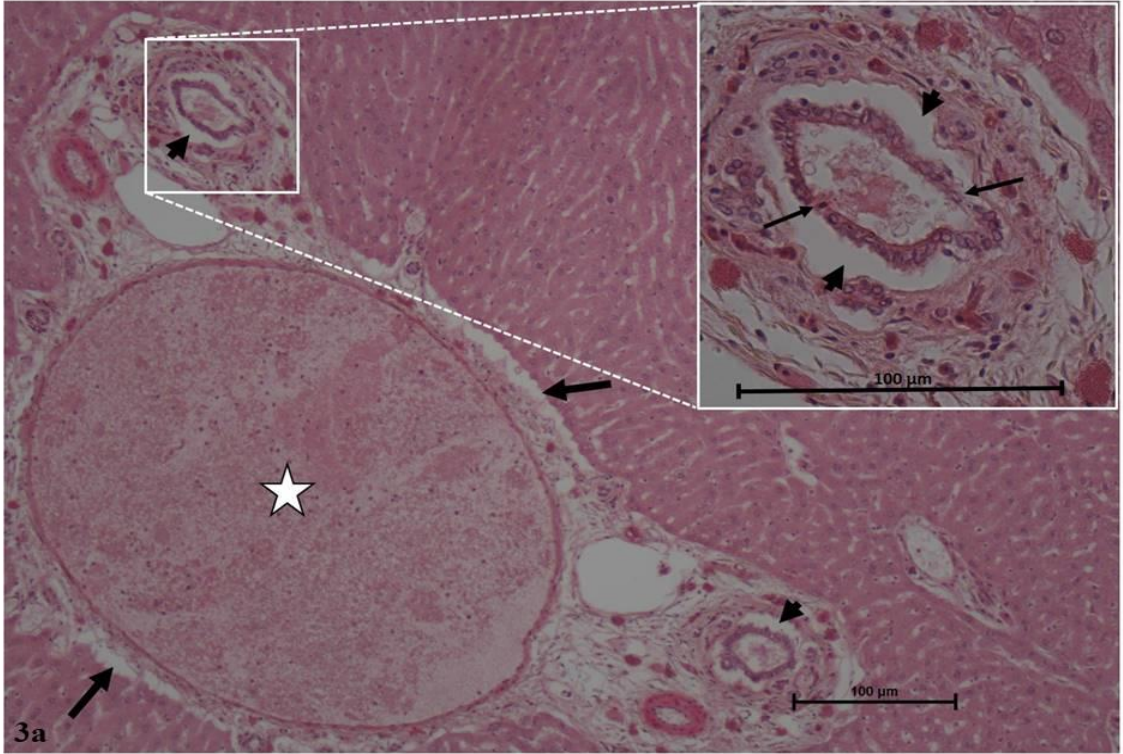


Şekil 4.17. (2c) Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv). H-E, x40.

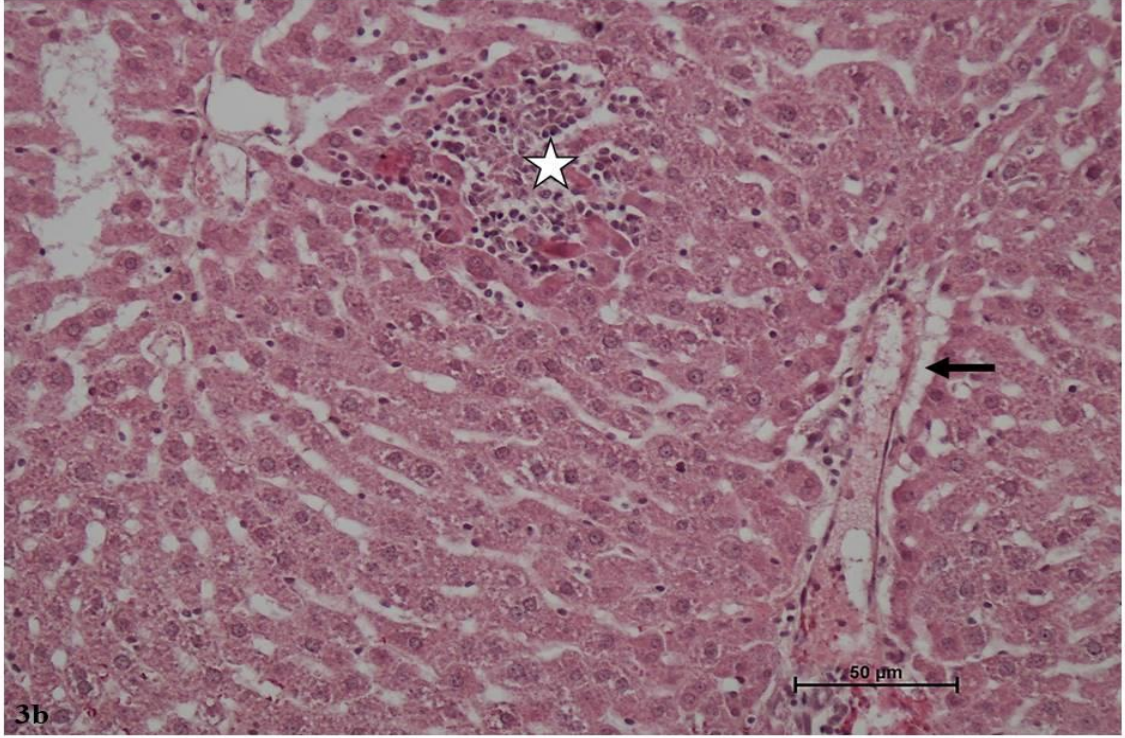


Şekil 4.18. (2d) Timokinon grubu. Karaciğer parankimi, caspase-3 immunreaktivitesi negatif (yıldız), portal alan (oklar). IHC, x20.

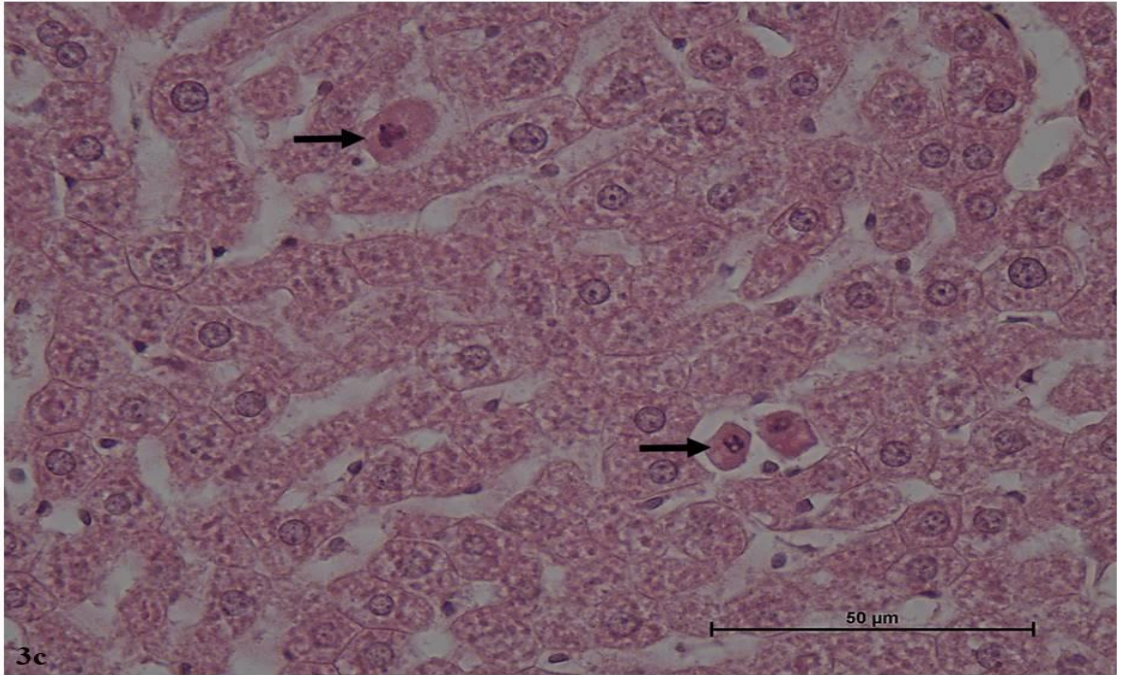
Tartrazin grubundaki hematoxilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitlerinde karaciğer parankiminde farklı genişlikte nekroz alanları saptandı. Parankimal nekroz alanları ile portal ve periportal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Parankim içinde koyu eozinofilik sitoplazmalı, heterokromatik piknotik nükleuslu apoptotik hepatositler saptandı. Portal alanlardaki vena porta dalları içinde konjesyon dikkati çekti. Portal alan bağ dokusu ile çevre hepatositler arasındaki mesafe (Mall mesafesi) periportal ödeme bağlı olarak belirgin şekilde genişlemiş olarak izlendi. Ayrıca portal alan içindeki safra duktusları çevresinde periduktal ödem de belirgin olarak izlendi. Safra duktuslarında hasarlı ve dejenere kolanjiyositler dikkati çekti.



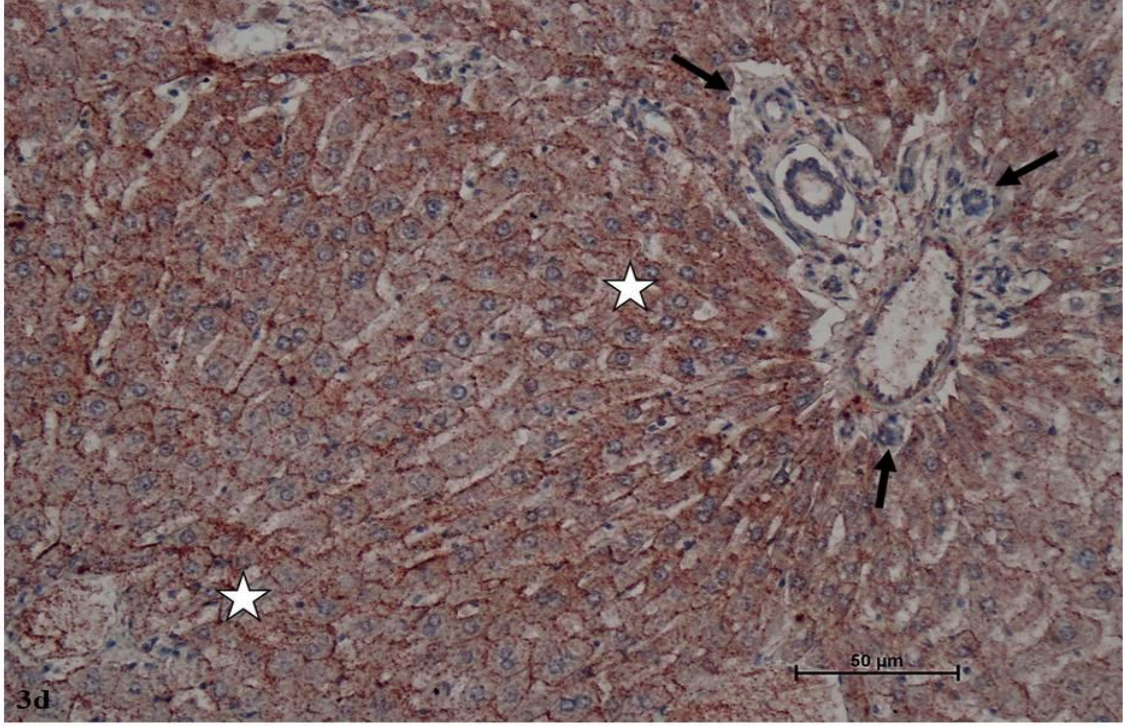
Şekil 4.19.(3a). Tartrazine grubu. Büyük resim. Portal ven lümeninde konjesyon (yıldız), periportal ödeme (kalın oklar), periduktal ödeme (ok başı). H-E, x10. Küçük resim. Periduktal ödeme (ok başları), kolanjiyosit hasarı ve dejenerasyonu (ince oklar). H-E, x40.



Şekil 4.20. (3b) Tartrazine grubu. Karaciğer parankiminde nekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız). Peripotal ödem (ok). H-E, x20.



Şekil 4.21. (3c) Tartrazine grubu. Karaciğer parankiminde apoptotik hepatositler (oklar). H-E, x40.

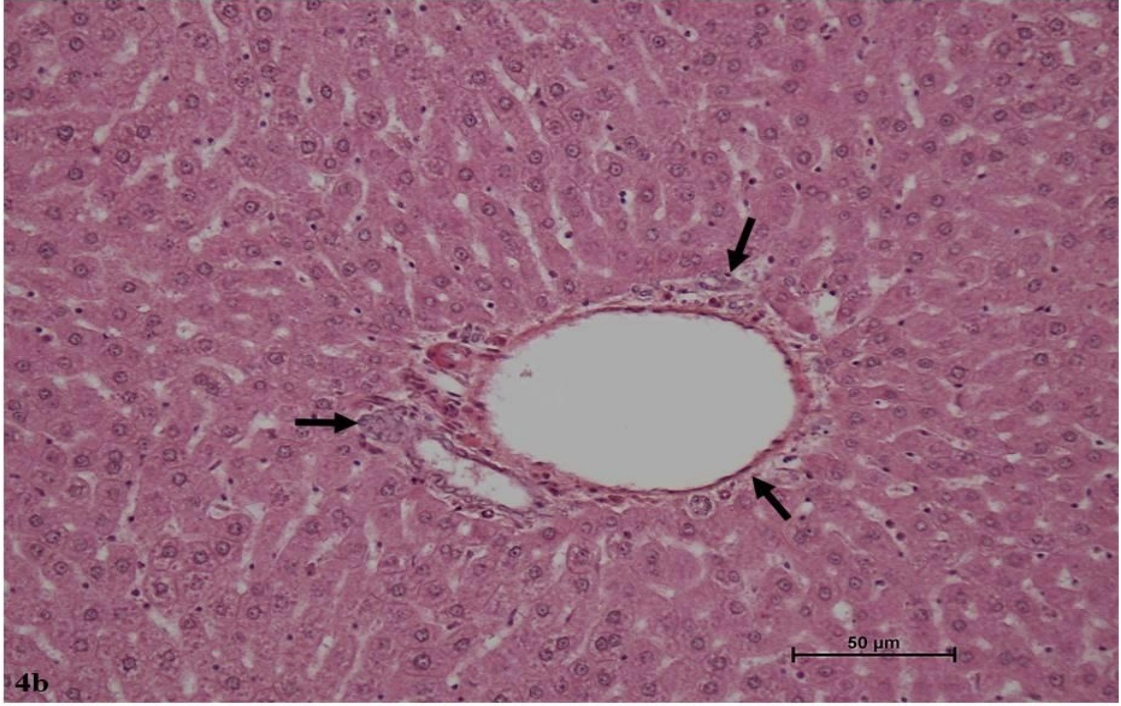


Şekil 4.22. (3d) Tartrazine grubu. Karaciğer parankimi, kuvvetli pozitif caspase-3 immunreaktivitesi (yıldız), portal alan (oklar). IHC, x20.

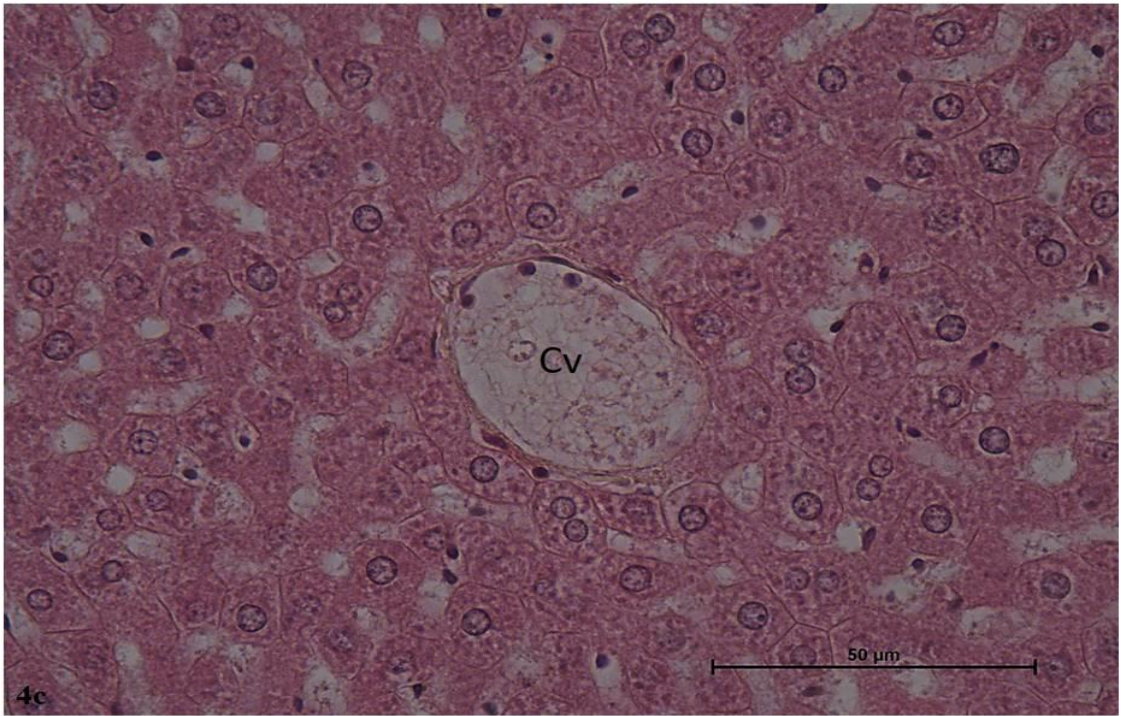
Tartrazin+timokinon grubundaki hematoksilen-eozin ile boyanan karaciğer kesitlerinde parankim içinde nadir olarak fokal nekroz alanları, minimal düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve peritortal ödem izleniyordu. Ancak bu hasar bulgularının yaygınlığı ve derecesi tartrazin grubundakine göre belirgin derecede gerilemişti.



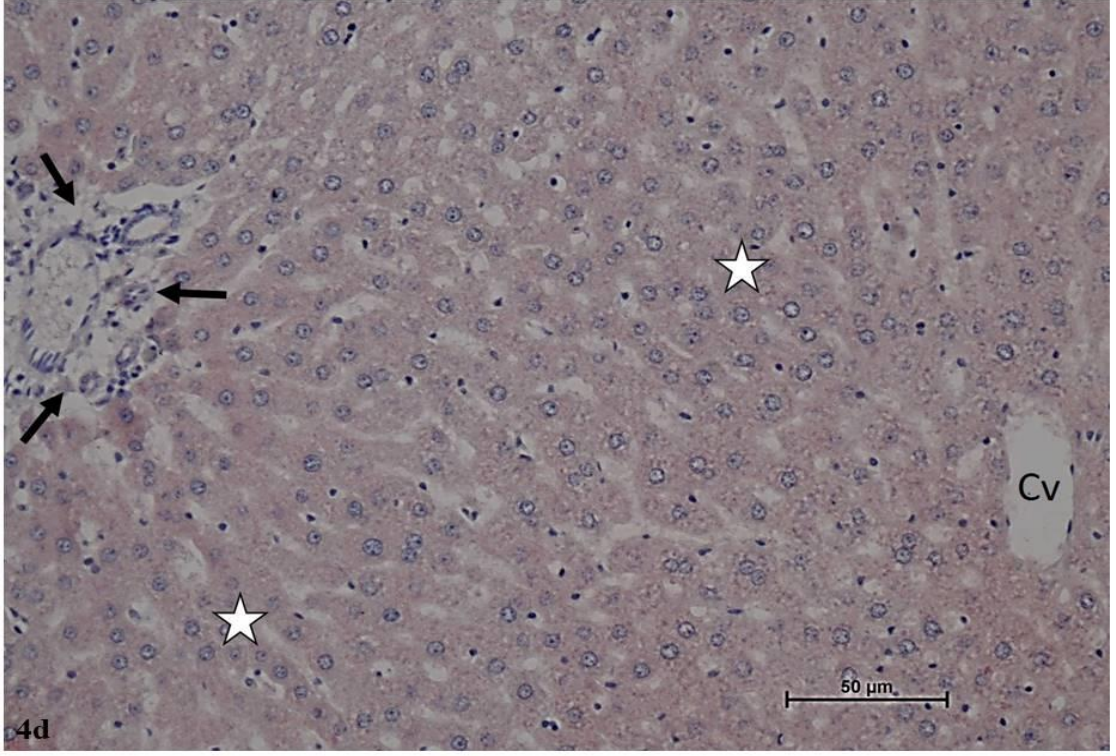
Şekil 4.23. (4a.) Tartrazine+Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv), portal alan (oklar). H-E, x10.



Şekil 4.24.(4b) Tartrazine+Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Portal alan (oklar). H-E, x20.



Şekil 4.25. (4c) Tartrazine+Timokinon grubu. Normal histolojik yapıda karaciğer parankimi. Santral ven (Cv). H-E, x40.



Şekil 4.26.(4d) Tartrazine+Timokinon grubu. Karaciğer parankimi, zayıf pozitif caspase-3 immunreaktivitesi (yıldız), portal alan (oklar). IHC, x20.

Tablo 4.5. Histolojik ve Caspase-3 Hata skorları

Gruplar	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Nekroz	Periportal ödem	Vasküler konjesyon	Total Hasar skoru	Caspase-3 Hasar Skoru
Kontrol	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0 ^a (0-0) ^a	0 ^a (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	1 (1-10) ^a
Timokinon	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	0 (0-0) ^a	1 (1-10) ^a
Tartrazin	1 (1-2) ^b	1 (1-2) ^b	1 (1-2) ^b	2 (1-2) ^b	5 (4-7) ^b	180 (160-240) ^b
Timokinon + Tartrazin	0 (0-1) ^c	0 (0-1) ^c	1.5 (0.7-2.2) ^c	0.5 (0-1) ^c	1 (1-3) ^c	60 (50-80) ^c
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

İmmunohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde kontrol ve timokinon gruplarında benzer şekilde caspase-3 immunreaktivitesi zayıf yoğunlukta ve minimum yaygınlıkta boyanma şeklinde görüldü. Bu gruplarda caspase-3 immunreaktivite H skoru 1 olarak tespit edildi. Tartrazine grubuna ait immunohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde caspase-3 immunreaktivitesi genel olarak kuvvetli yoğunlukta ve yaygınlıkta boyanma şeklinde izlendi. Tartrazin grubu caspase-3 immunreaktivite H skoru 180 olarak tespit edildi. Tartrazin+timokinon grubuna ait immunohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde caspase-3 immunreaktivitesi genel olarak zayıf yoğunlukta ve orta derece yaygınlıkta boyanma şeklinde belirlendi. Tartrazine grubu caspase-3 immunreaktivite H skoru 60 olarak tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Günümüzde gıdaları daha ilgi çekici ve estetik göstermek, pasta şekerleme gibi yiyeceklerin albenisini arttırmak amacıyla gıda boyaları sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda sektörünün gelişmesi ve insanların paketli gıda tüketimine yönelmesiyle gıda boyalarından kaçınmak neredeyse imkansız hale gelmiştir. Özellikle çocuklarda hiperaktivite, alerjik reaksiyon gibi olumsuz durumlara sebep olan bu maddelerin kullanımını engellemek oldukça zorlaşmıştır. Bu boyar maddelerden en sık kullanılanlar arasında yer alan tartrazin oksidatif strese yol açarak toksik etki gösterebilmekte buda nörotoksisite, nefrotoksisite ve hepatoksisiteye yol açabilmektedir (8, 56, 67).

Amany ve ark., otuz gün boyunca günlük 500mg/kg/ca tartrazin uyguladıkları bir çalışmada erkek ratların beyin dokusundaki nörotoksik etkilerini incelemişlerdir. Tartrazin uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla SOD, KAT, GSH seviyelerinde ciddi bir düşüş gözlenirken, MDA seviyesinde ise ciddi bir artış gözlenmiştir. Aynı zamanda histolojik bozukluklara yol açtığını bildirmişlerdir (68).

Amin ve ark., genç erkek sıçanlarda gıda azo boyaları tartrazin ve kormozinin böbrek karaciğer fonksiyonları ve oksidatif stres belirteçleri ile ilgili biyokimyasal parametreler üzerine etkisini incelediği bir çalışmada; ratlara otuz gün boyunca 500mg/kg/ca ve 100mg/kg/ca olmak üzere iki ayrı doz şeklinde oral yol ile tartrazin uygulamışlardır. Yüksek doz uygulanan grupta kontrol grubuna göre SOD, KAT, GSH seviyelerinde önemli miktarda düşüş meydana gelirken, MDA seviyesinin ise önemli oranda arttığını bildirmişlerdir (15).

Erkek ratlarda tartrazin sebep olduğu oksidatif stres ve hepatotoksisiteyi inceleyen bir çalışmada, ratlara 90 gün boyunca 7.5mg /kg tartrazin diyeti uygulanmıştır. 90 gün sonunda ratların karaciğer dokusunda yapılan analiz sonucu tartrazin uygulanan grubun MDA ve total protein seviyesi, normal diyet ile beslenen kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış göstermekle birlikte SOD, GSH-Px, GSH ve KAT seviyelerinde ise önemli ölçüde düşüş olduğu görülmüştür. Bununla birlikte karaciğer dokusunda histopatolojik değişikliğe sebep olurken kreatinin, üre ve ürik asit seviyelerinde ise anlamlı derecede artışa neden olduğu bildirilmiştir (69).

Balta ve ark., Wistar Albino ratlar üzerinde yaptığı çalışmada 75mg ve 100mg tartrazin 7 hafta boyunca uygulandı. Deneyin sonunda, böbrek ve karaciğer ağırlığına

ilişkin değerler belirgin bir şekilde artmıştır. Dalağın ağırlığı, kontrol grubunun ağırlığına göre hafifçe azalırken, kan örneklerinin hematolojik analizleri, sıçanların diyetine tartrazin eklenmesinin kanın tüm biyokimyasal ve hematolojik parametrelerinde önemli değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (57).

Sentetik gıda boyalarının erkek ratlar üzerindeki toksik etkisinin incelendiği bir çalışmada, 75mg/kg diyet şeklinde 42 gün boyunca uygulanan tartrazinin serumda total protein, albumin, kreatinin, üre, ALT, AST, ALP ve total bilirubin seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterdiği gözlenmiş olup, kan ve karaciğer dokusunda SOD ve GSH seviyelerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (70).

Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada; 90 gün boyunca oral yolla 75 mg/kg/ca tartrazin uygulanan ratlar, mRNA seviyelerinde ve kollajen 1-a, TGF β -1 ve caspas-3'ün immünohistokimyasal lokalizasyonunda önemli bir artış sergilemiştir. Ayrıca, AST, ALP, kreatinin ve üre seviyelerinde önemli bir artış gözlenmiş olup böbrek ve karaciğerde MDA seviyesinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış ve SOD, KAT ve GSH enzimlerinin seviyelerinde önemli düşüşler bulunmuştur. Histolojik incelemede, hepatositleri, apoptotik hepatositleri ve tübüler nekrozlu periportal fibrozisi ortaya çıkarttığı belirlenmiştir (71).

Velioğlu ve ark., yapmış olduğu çalışmada ratlara 21 gün boyunca 500 mg/kg/gün tartrazin oral olarak uygulanmıştır. Tartrazin uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında tartrazin uygulanan grubun karaciğer dokusunda SOD, MDA, TOS seviyelerinde anlamlı olarak artış görülürken, KAT, TAS ve GSH düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca plazmada AST, ALP ve ALT düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede artış gösterdiğini ve karaciğerde histopatolojik değişiklikler gözlemlendiğini bildirmişlerdir (72).

Başka bir çalışmada sekiz hafta boyunca 10mg/kg/ca tartrazin uygulanan rat grubu kontrol ile kıyaslandığında böbrek, karaciğer ve serumda MDA düzeyinin arttığı görülürken SOD, KAT, GSH'in azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca karaciğer, böbrek, testis ve mide dokularında patolojik değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (73).

El-Desoky ve ark., yaptığı çalışmada ratlara elli gün boyunca uygulanan 7,5mg/kg/ca tartrazinin, oksidatif stres biyobelirteçleri olan lipid peroksit (LPO) ve malonaldehit (MDA) değerlerini önemli ölçüde artırırken, GSH düzeylerini ve toplam

antioksidan kapasiteyi azalttı. Benzer şekilde, GSH-Px, SOD ve katalaz KAT seviyelerinin, tartrazin alımına yanıt olarak önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca sonuçlar, kontrole kıyasla tartrazin uygulanan sıçanlarda p53, CASP-3 ve CASP-9 dahil olmak üzere incelenen üç gen için ekspresyon seviyesinde dikkate değer bir yukarı regülasyon ortaya çıkardığını ve kuyruklu yıldız tahlili sonucu tartrazinin kemik iliğinde DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir (74).

Timokinon, *Nigella sativa* bitkisinin tohumunun yağında bulunan fenolik bir bileşik olup yüksek antioksidan özelliği sayesinde birçok hastalıkta geleneksel olarak yaygın kullanılmaktadır. Yapılan *İn vivo* ve *invitro* çalışmalar timokinonun antiinflamatuvar, antioksidan antimikrobiyal ve antikanserojenik gibi birçok faydalı etkileri olduğunu öne sürmektedir (75).

Tiyoasetamid (TAA) ile indüklenen bir hepatik ensefalopati (HE) modelinde, timokinonun davranışsal eksiklikler ve olası mekanizma(lar) üzerindeki terapötik etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada erkek Wistar sıçanlarında 14 gün boyunca her 48 saatte bir TAA (200 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu ile Hepatik ensefalopati, (HE) indüklenmiştir. HE indüksiyonundan sonra i.p. timokinon (5, 10 ve 20 mg/kg) uygulanmıştır. Veriler, timokinon ile tedavi edilen HE sıçanlarının kaygı ve depresyon benzeri davranışları iyileştirdiğini gösterirken timokinon uygulamasının, oksidatif stresi de azalttığı görülmüştür. Hipokampusta glutatyon-peroksidaz (GPx), katalaz (KAT) ve toplam tiyol içeriği seviyelerini arttırdığı gözlenmiştir. Bu bulguların, timokinon'nun oksidatif stresin modülasyonu yoluyla akut karaciğer yetmezliği ve HE komplikasyonlarına karşı timokinonun kayda değer etkileri olduğunu belirtilmiştir (76).

Bouhrel ve ark., timokinonun parsiyel hepatektomi (PH) sonrası sıçan karaciğeri üzerindeki etkisinin araştırdığı bir çalışmada; timokinonun ALT aktivitesini ve histolojik bulguları azalttığı gözlenmiştir. Paralel olarak, timokinon hepatik antioksidan kapasitelerini arttırmıştır. Ayrıca, timokinonun mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği, endoplazmik retikulum stres parametrelerini zayıflattığı ve apoptotik efektörlerin ifadesini bastırdığı bildirilmiştir (77).

Başka bir çalışmada, ratlarda fipronil (FPN) kaynaklı toksisiteye karşı dialil sülfür ve timokinonun'nun potansiyel iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Otuz iki erkek Wistar sıçanı (150-180 g), dört tedavi grubuna randomize edilerek, 28 gün boyunca günde bir kez uygulama yapılmıştır. FPN ile tedavi edilen sıçanların serum ürik asit,

üre, kreatinin, kolesterol, aspartat transferaz, alanin transferaz, alkalın fosfataz, laktat dehidrojenaz ve γ -glutamil transferaz düzeylerinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Ayrıca, FPN toplam protein, albümin ve trigliseritlerin serum seviyelerini önemli ölçüde azaltırken, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, FPN ile tedavi edilen sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokularında önemli ölçüde yüksek malondialdehit ve nitrik oksit seviyeleri ve ayrıca glutatyon konsantrasyonu, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktiviteleri önemli ölçüde azalmıştır. timokinon ile tedavi sonrasında, daha önce bahsedilen tüm parametrelerde FPN'nin neden olduğu değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirdiği açıklanmıştır (78).

Erdemli ve ark., 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) kaynaklı hepatotoksisiteye karşı timokinon uygulamasının karaciğer dokularındaki değişiklikleri incelemek için yaptığı çalışmada; elli rat beş gruba ayrılarak otuz gün boyunca gruplara sırasıyla kontrol, mısır yağı, TCDD, timokinon ve TCDD + timokinon uygulaması yapılmıştır. Ratların karaciğer dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldığında TCDD uygulamasının karaciğerde Glisson kapsülünün kalınlaşması, hepatositlerde intrasitoplazmik vakuolizasyon, sinüzoidal genişleme, vasküler ve sinüzoidal tıkanıklık ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğunu bulunmuştur. Timokinon ile tedavi edilen grupta GSH, SOD, KAT ve TAS seviyeleri diğer tüm gruplara göre artarken MDA, TOS, ALT, AST, ALP seviyelerinin diğer tüm gruplara göre azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak TCDD'nin sebep olduğu oksidatif ve histolojik etkileri timokinonun ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (79).

Ratlarda arsenik kaynaklı hepatotoksisiteye karşı ayrı ayrı timokinon veya ebselenin koruyucu etkinliği araştıran bir çalışmada 28 günlük bir çalışmada, arsenik maruziyeti sonucunda meydana gelen süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon (GSH) belirgin düşüşler ve kanıtlanan hepatik hasara karşı timokinon ve arsenik uygulanan grupta bu parametrelerde anlamlı şekilde düzelmeler olduğu bildirilmiştir (80).

Asgharzadeh ve ark., erkek sıçanlarda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen inflamasyonda timokinon'nun karaciğer fibrozu üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladıkları çalışmalarında üç hafta boyunca 2 mg/kg/gün, 5 mg/kg/gün, 10 mg/kg/gün olmak üzere farklı dozlarda timokinonu 1 mg/kg/gün lipopolisakkarit ile

kombine şekilde intraperitonel olarak uygulamışlardır. Timokinon ile kombine şekilde lipopolisakkarit uygulanan gruplar yalnızca lipopolisakkarit uygulanan grup ile kıyaslandığında timokinon ile tedavinin, karaciğer fibrozunu düzelttiği, karaciğer fonksiyon testlerini iyileştirdiği ve anti-oksidatif enzimlerin (SOD ve katalaz) düzeylerini artırırken, MDA konsantrasyonunu düşürdüğü açıklanmıştır. Bu iyileşmelerin timokinon dozu ile doğru orantılı şekilde arttığı bildirilmiştir (81).

Histolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerle sıçan karaciğerinde deneysel bir modelde olanzapinin (OLZ) yan etkilerine karşı timokinonun olası koruyucu özelliklerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada 35 adet dişi Sprague Dawley faresi; kontrol, OLZ, OLZ+TQ-1, OLZ+TQ-2, OLZ+TQ-3 olmak üzere rastgele beş gruba ayrılmıştır. 2 haftalık bir OLZ uygulamasının (4 mg/kg, ilk hafta için günde bir kez, ikinci hafta için günde bir kez 8 mg/kg,) ve timokinon ile tedavinin (25, 50 , 100 mg/kg, günde bir kez,) OLZ'nin neden olduğu kilo alımını önemli ölçüde azalttığını ve timokinonun toplam antioksidan durumu (TAS), yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (HDL), insülin seviyelerini arttırdığını ayrıca serum oksidatif stres indeksi (OSI), toplam oksidan durumu (TOS), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama-glutamil transpeptidaz (GGT), düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL), glukoz, trigliseritler (TG) ve toplam kolesterol (CH) seviyeleri önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (82).

Kronik siklosporin A (CsA) tedavisinin ve akut renal iskemi/reperfüzyonun (I/R) timokinon ile tedavi edilen sıçanlarda böbrek ve karaciğer üzerindeki etkilerini değerlendirmek için tasarlanan çalışmada yetişkin erkek sıçanlar kontrol, CsA(25 mg/kg/gün), timokinon (10 mg/kg/gün) ve CsA+Timokinon gruplarına ayrılmış ve uygulama 28 gün sürmüştür. CsA tedavisi ve renal I/R, histopatolojik değişiklikler ve biyokimyasal parametrelerle değerlendirildiğinde böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olmuştur. Timokinon tedavisi, yükselmiş serum endekslerini kontrol seviyelerine geri indirmiş ve CsA'nın neden olduğu böbrek ve karaciğer histopatolojik değişikliklerini iyileştirmiştir. Böbrek ve karaciğer dokularında, CsA ve renal I/R, azalmış glutatyon seviyelerinde ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde önemli düşüşlerle birlikte malondialdehit seviyelerinde önemli artışlara neden olmuştur. Oksidatif stres belirteçlerindeki bu tür değişiklikleri, timokinonun önlediği bildirilmiştir (83).

Mabrouk ve ark., yapmış olduğu çalışmada, timokinonun kurşunun (Pb) neden olduğu karaciğer hasarına karşı potansiyel koruyucu etkisi araştırılmıştır. Yetişkin erkek sıçanlar Pb grubu (2000 ppm Pb asetat içme suyunda), Pb-Timokinon grubu (Pb + TQ 5 mg/kg/gün) ve Timokinon grubu sadece Timokinon ile birlikte 5 hafta boyunca tedavi edilmişlerdir. Sonuçlar, Pb maruziyetinin hepatik Pb içeriğini, hasarlı hepatik histolojik yapıyı (nekrotik odaklar, hepatik iplikler düzensizliği, hipertrofik hepatositler, sitoplazmik vakuolizasyon, sitoplazmik kayıp, kromatin yoğunlaşması, mononükleer hücre infiltrasyonu, tıkanıklık, santrilobüler şişme) arttırdığını ve karaciğer fonksiyonunu bozduğunu göstermiştir. Pb tedavisi ayrıca karaciğerde toplam antioksidan durum seviyesini azaltmış ve lipid peroksidasyonunu arttırmıştır. Timokinon ile takviye, Pb'nin neden olduğu olumsuz etkileri önemli ölçüde iyileştirmiştir. Sonuçlar olarak timokinonun nun Pb kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu bir etkisi olduğunu göstermiştir (84).

Sıçanlarda metotreksat ile indüklenen toksisitede timokinon hepatorenal koruma mekanizmalarının incelenmiş olduğu çalışmada; 10 gün boyunca oral yoldan TQ (10 mg/kg) uygulandı. Metotreksat ile timokinon+metotreksat uygulanan grup kıyaslandığında, karaciğer ve böbrek dokularında metotreksatın sebep olduğu GSH ve KAT seviyelerindeki azalmayı timokinon uygulamasının kontrol grubuna yaklaştırdığı ve artmış olan MDA ve TNF- α seviyelerini ise düşürdüğü gözlenmiştir (85).

Çalışmamızda gıda boya maddesi tartrazinin karaciğer dokusunda meydana getirdiği toksik etkilerine karşı timokinonun etkinliğini histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler ile araştırmayı amaçladık. Biyokimyasal olarak incelemiş olduğumuz parametrelerden biri olan MDA seviyesinin tartrazin grubunda kontrole oranla ciddi seviyede artış gösterdiğini bulduk. MDA seviyesindeki artış hücrelerde lipid peroksidasyonunun artmış olduğunu gösteren bir belirteçdir. Lipid peroksidasyonundaki artış hücrelerin membran potansiyelinin ve akışkanlığının azalması ve hücre bütünlüğünün bozulmasına sebep olarak organizmada ciddi hasarlar oluşmasına sebep olur. Tartrazin ve timokinon uygulamış olduğumuz grupta timokinonun tartrazinin etkisini azaltarak MDA seviyesini kontrol grubuna yaklaştırmış olduğunu gördük. Bu durum timokinonun lipid peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin giderilmesinde olumlu bir etkisi olduğunu ve antioksidan özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ratların karaciğer dokularındaki TAS düzeyleri incelendiğinde timokinon uygulanan grubun TAS düzeyinin diğer gruplara oranla

anlamli şekilde ($P<0.001$) arttiğı görülürken tartrazin uygulanan grubun TAS seviyesinin diğer tüm gruplardan daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca tartrazin uygulanan grubun TOS seviyelerinde ciddi artış gözlenirken timokinon ile tedavi edilen grubun TOS seviyelerinin kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür. Timokinon OSI'ni ciddi şekilde düşürerek tartrazinin olumsuz etkisini azaltmıştır. Tartrazin, TOS seviyelerini ciddi Şekilde artırmış ve antioksidan savunma sisteminin oksidatif stresi önlemede yetersiz kalmasına sebep olarak hücrelerin ve dokuların hasarına yol açmıştır.

Yine oksidatif stres belirteci olan KAT, GSH-Px enzimlerinin seviyeleri tartrazin uygulanan grupta kontrol grubuna oranla önemli ölçüde düşüş gösterirken timokinon ile tedavi edilen grupta bu enzimlerin seviyelerinin kontrol grubuna yaklaştığını gözlemledik. KAT ve GSH-Px enzimleri H_2O_2 molekülünün dönüşümünü sağlayarak hücreye zarar vermesini önler. Çalışmamızda, tartrazinin bu enzimlerin seviyesini azaltarak hücrelerin oksidatif stres yükünü artırdığını ve timokinonun ise tam tersi etki ile bu enzim seviyelerini yükseltip hücrenin oksidatif stres yükünü azalttığını gözlemledik. Çalışma sonuçlarımız literatürle benzerlik göstermekte olup timokinonun oksidatif stresi azalttığını göstermektedir.

Bir başka oksidatif stres parametresi olan SOD enzim aktivitesini incelediğimizde tartrazinin süperoksit (O_2^-) radikalini detoksifiye eden SOD enzimi aktivitesini yükselterek süperoksit radikalinin H_2O_2 ve suya dönüşümünü artırmış fakat aynı zamanda CAT ve GSH-Px aktivitesini azalttığından dolayı oluşan H_2O_2 detoksifiye edilememiştir. Bu durumda hücreler yüksek oksidatif strese maruz kalmışlardır. Timokinon ile tedavi edilen ratlarda ise SOD aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Çalışmada non enzimatik bir oksidatif stres belirteci olan GSH düzeyi de incelenmiştir. Hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkilerinden koruyan GSH önemli bir antioksidandır. Bununla birlikte toksik elektrofilik metabolitlerin detoksifikasyonunda görev alan GSH-Px ve GST için substrat olarak işlev görür (86). Tripeptid yapısındadır ve oksidatif stresi önlediği için hücre bütünlüğünü koruyan önemli bir moleküldür. Analizlerimiz sonucunda tartrazinin GSH seviyesini önemli ölçüde azalttığı gözlenirken timokinonun bu olumsuz etkiyi azaltarak GSH seviyesini normal düzeylere çıkardığı görülmüştür.

Histolojik incelemeler sonuçlarımızda biyokimyasal analizler ile uyumlu olarak tartrazin uygulamasının portal ven lümeninde konjesyon, periportal ödem, periduktal

ödem, Periduktal ödem, kolanjiyosit hasarı ve dejenerasyonuna sebep olduğu (Şekil 23. 3a) ve karaciğer parankiminde farklı genişlikte nekroz alanlarına ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu sebep olduğu görülmüştür (Şekil 24. 3b.). Bununla birlikte karaciğer parankiminde apoptotik hepatositler gözlenmiştir (Şekil 25.3c.). Timokinon tedavisinden sonra bu histopatolojik değişimlerin ortadan kalktığı ve karaciğer dokusunun kontrol grubuna benzer özellikler gösterdiği görülmüştür.

İmmünohistokimyasal incelemeler sonucunda; İmmünohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde kontrol ve timokinon gruplarında caspase-3 immunreaktivitesi zayıf yoğunlukta ve minimum yaygınlıkta boyanma şeklinde görülürken, tartrazine grubuna ait immünohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde caspase-3 immunreaktivitesi genel olarak kuvvetli yoğunlukta ve yaygınlıkta boyanma şeklinde izlendi. Timokinon ile tedavi edilen grupta ise immünohistokimyasal anti caspase-3 boyaması uygulanan kesitlerde caspase-3 immunreaktivitesi genel olarak zayıf yoğunlukta ve orta derece yaygınlıkta boyanma şeklinde belirlendi. Bu durum tartrazinin sebep olduğu apoptozun timokinon tarafından tedavi edildiğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tartrazin uygulanan ratların karaciğer dokusunda oksidatif stres parameterlerinden; MDA, SOD seviyelerinin artışına ve GSH, GSH-Px ve KAT seviyelerinin azalmasına neden olmuştur.

2. Tartrazin uygulanan ratların karaciğer dokusunda OSI belirteçlerinden; TOS seviyelerinde artışlara ve TAS seviyelerinde azalmalara neden olmuştur.

3. Tartrazin uygulanan ratların serumlarında inflamasyon fakatörlerinden Tnf- α ve IL-6 seviyelerinde artışa neden olmuştur.

4. Tartrazin uygulanan ratların karaciğer dokularında nekrozlara, ödemlere, hücre infiltrasyon ve dejenerasyonlara sebep olmuştur.

5. Tartrazin uygulanan ratların karaciğer dokularında Caspase 3-immünoreaktivitesinde artışlara sebep olmuştur.

6. Timokinon uygulanan ratların karaciğer dokularında KAT, GSH, GSH-Px seviyelerinde artış, MDA, SOD seviyelerinde azalmalara neden olmuştur.

7. Timokinon uygulanan ratların karaciğer dokularında TAS seviyelerinde artışlara, TOS seviyelerinde ise azalmalara neden olmuştur.

8. Timokinon uygulanan ratların serumlarında Tnf- α ve IL-6 seviyelerinde azalmalara neden olmuştur.

9. Timokinon uygulanan ratların karaciğer dokusu histolojinde ve caspase 3-immünoreaktivesinde herhangi bir anormal durum gözlemlenmedi.

10. Tartrazin ve Timokinon uygulanan ratların karaciğer dokusunda gerek biyokimyasal parametreler gerekse de histolojik parametreler açısından tartrazin uygulanmış gruba kıyasla iyileşmeler tespit edildi.

Tüm bu sonuçlar açısından tartrazin oksidatif stres ve inflamasyona neden olarak hepatoksisiteye neden olmuş, timokinon ise güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek tartrazin hepatoksisitesini minimize edebilmiştir.

Hazır gıdaların her geçen gün daha yaygın kullanılır hale gelmesi ile gıdalardaki gıda boyar katkı maddelerine maruziyet artış göstermektedir. Bu durum ise tartrazin gibi yaygın kullanım alanı bulan maddelerden kaçınılamadığını kanıtlar niteliktedir. Tartrazinin toksik etkilerini bertaraf edebilmek yada en azından bu hepatoksik etkileri minimize edebilmek için Çörek otu ve onun aktif bileşini olan timokinonun mümkünse günlük yeterince tüketilmesini tavsiye ediyoruz.



KAYNAKLAR

1. Güneş B. Tartrazinin insan periferal lenfositlerindeki in vitro sitotoksosite ve genotoksitesisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ordu: Ordu Üniversitesi; 2016.
2. Yırtıcı Ü. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemi ile araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2007.
3. Karaali A, Özçelik B. Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar. *Gıda* 1993,18 :389–96.
4. Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, Christodoulou P, Kareli D, Poliliou S, Mourelatos C , Lambropoulou V, Lialiaris T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem Toxicol* 2010, 48: 2934–44.
5. Mahfouz H, Al-Shamrani S. Protective action of vitamin C against mutagenic effects of synthetic food color tartrazine. *Afr J Pharm Pharmacol* 2013, 7: 2474–83.
6. Jones R, Ryan AJ, Wright SE. The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man *Food Chem Toxicol* 1964, 2: 447–52.
7. Elhkim MO, Héraud F, Bemrah N, Gauchard F, Lorino T, Lambré C, Fre'my JM, Poul JM. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine. An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007, 47: 308–16.
8. Hımrı I, Bellahcen S, Souna F, Belmekkı F, Azız M, Bnouham M, Zoheir J, Berkia Z, Mekhfi H, Saalaoui E . A 90-Day Oral Toxicity Study of Tartrazine, A Synthetic Food Dye, In Wistar Rats. *Int J Clin Pharm* 2011, 3: 159-69.
9. Bezerra MDS, Malaquias GDS, Marcelo J, Sousa DCE, Peron AP. Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. *Food Sci Technol* 2015, 36: 49-55.

10. Demirkol O, Zhang X, Ercal N. Oxidative effects of Tartrazine (CAS No. 1934-21-0) and New Coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. *J Verbrauch Lebensm* 2012,7: 229–36.
11. Soares BM, Araújo TMT, Ramos JAB, Pinto LC, Khayat BM, Bahia MO, Montenegro RC, Burbano RMR, Khayat AS. Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Res* 2015, 35 :1465–74.
12. Poul M, Jarry G, Elhkim MO, Poul JM. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth , sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chem Toxicol* 2009, 47: 443–8.
13. D.A. Monoret, Vautrin MD. Food antigens and additives. *Jacobs J Allergy Immunol* 1986,78: 1039-46.
14. Kamel MM, El-lethey HS. The Potential Health Hazard of Tartrazine and Levels of Hyperactivity, Anxiety-Like Symptoms, Depression and Anti-social behaviour in Rats. *J Am Sci* 2011,7: 1211–8.
15. Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol* 2010, 48: 2994–9.
16. Francis H, ChafeeMD, Guy A, SettipaneMD. Asthma caused by FD&C approved dyes. *Journal of Allergy* 1967, 40: 65–72.
17. Sarıkaya R, Çakır Ş. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the Drosophila wing spot test. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005, 20: 424–30.
18. Sarıkaya R, Selvi M, Erkoç F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere* 2012, 88: 974–9.
19. Hassan GM. Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab Journal Biotech* 2010, 13: 13-24.

20. Kashanian S, Zeidali SH. DNA binding studies of tartrazine food additive. *DNA Cell Biol* 2011, 30: 499–505.
21. Öncül Ö. Bazı Gıda Boyalarının Mutajenik Potansiyellerinin Ames/Mikrozom Testi İle Araştırılması Ve β -Galaktozidaz Üzerine Etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2009.
22. Kar Y, Şen N, Tekeli Y. Samsun Yöresinde Ve Mısır Ülkesinde Yetiştirilen Çörekotu (*Nigella Sativa* L.) Tohumlarının Antioksidan Aktivite Yönünden İncelenmesi. *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi* 2007, 2: 197–203.
23. Bacak Güllü E, Avcı G. Thymoquinone: the Bioactive Component of *Nigella Sativa*. *Kocatepe Vet Journal*. 2013,6: 51–61.
24. Kaya Ş. Sıçanlarda Bleomisin İle Oluşturulan Akciğer Fibrozisi Modelinde *Nigella Sativa* Yağının İnflamasyon, Fibrozis ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2011.
25. Dauksas E, Venskutonis PR, Sivik B. Comparison of oil from *Nigella damascena* seed recovered by pressing, conventional solvent extraction and carbon dioxide extraction. *J Food Sci* 2002, 67: 1021–4.
26. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharm Biomed Anal* 1999, 19: 757–62.
27. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009, 85: 830–4.
28. Yiğitcan B. Wistar Albino Sıçanlarda 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo P- Dioxin (Tcdd)'nin Testiküler Toksisitesi Üzerine Thymoquinone'un Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2019.

29. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003, 22: 107–13.
30. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol* 2003, 22: 857–66.
31. Taylor P, Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* 2007, 6: 160-9.
32. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou PQ, G. Reddy. Androgen Receptor – and E2F-1 – Targeted Thymoquinone Therapy for Hormone-Refractory Prostate Cancer Androgen Receptor – and E2F-1 – Targeted Thymoquinone Therapy for Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res* 2007, 67: 7782–8.
33. Pagola S, Benavente A, Raschi A, Romano E, Molina MAA, Stephens PW. Crystal structure determination of thymoquinone by high-resolution x-ray powder diffraction. *AAPS PharmSciTech* 2004, 5: 24-31.
34. Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials., *Pharm Res* 2015, 96: 138–58.
35. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone , the major constituent of *Nigella sativa* seeds , in mice. *Phytomed* 2004, 11: 56–64.
36. Alkharfy KM, Ahmad A, Khan RMA, Al-Shagha WM. Pharmacokinetic plasma behaviors of intravenous and oral bioavailability of thymoquinone in a rabbit model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2015, 40: 319-23.
37. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 2005, 5: 1749–70.

38. Hangargekar CB, Quazi RS, Khan MSA, Joshi AA, Hangargekar PB. a Review on Kalonji (*Nigella Sativa*): a Seed of Blessing. *Int J of Res and Analytical Reviews* 2020, 7: 590–6.
39. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003, 26: 87–98.
40. El-Dakhakhny M, Mady NI, Halim MA. *Nigella sativa* L. oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Arzneimittelforschung* 2000, 50: 832–6.
41. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res* 2000, 14: 323–8.
42. Ali BH. The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Chin Med.* 2004;32(1):49–55.
43. El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Int J of Cardiol* 2004, 93: 19–23.
44. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *S Afr J Bot* 2010, 76: 210–6.
45. Akgül B. Prilokain Toksisitesinde Timokinonun Koruyucu Etkinliği. Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2019.
46. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiya H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol Lett.* 2006, 106: 72–81.
47. Hayat K, Asim MR, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. *Curr Eye Res* 2011, 36: 591–8.
48. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, Takewaki T. Thymoquinone suppresses expression of inducible

nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2002, 2: 1603–11

49. Nagi MN, Alam K, Badary OA, A-shabanah OA, A-sawaf HA, A-bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 1999, 47: 153–9.
50. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1998, 95: 23–9.
51. Hosseini SM, Taghiabadi E, Abnous K, Timcheh Hariri AR, Pourbakhsh H, Hosseinzadeh H. Protective effect of thymoquinone, the active constituent of nigella sativa fixed oil, against ethanol toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2017, 20: 927–39.
52. Zafeer MF, Waseem M, Chaudhary S, Parvez S. Cadmium-induced hepatotoxicity and its abrogation by thymoquinone. *J Biochem Mol Toxicol* 2012, 26: 199–205.
53. Aycan İÖ, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoğlu O, Firat U, Kavak GÖ, Turgut H, Yüksel MU. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Surg.* 2014, 12: 213–8.
54. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs.* 2004, 15: 389–99.
55. Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice. *Food Chem Toxicol* 2007, 45: 88–92.
56. Hassan SA, Ahmed WA, Galeb FM, El-Taweel MA, Abu-Bedair FA. In vitro challenge using thymoquinone on hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Iran J Pharm Res* 2008, 7: 283–90.
57. Balta I, Sevastre B, Mireşan V, Taulescu M, Raducu C, Longodor AL, Marchiş Z, Mariş CS, Coroian A. Protective effect of blackthorn fruits (*Prunus spinosa*)

- against tartrazine toxicity development in albino Wistar rats. *BMC Chem* 2019, 13: 1–11.
58. Kong LY, Li GP, Yang P, Xi Z. Protective effect of thymoquinone on cholestatic rats with liver injury. *Genet Mol Res* 2015, 14: 12247–53.
59. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979, 95: 351–8.
60. Ellman GL. Tissue Sulphydryl Groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82: 70–7.
61. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497–500.
62. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105: 121–6.
63. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70:158–69.
64. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265–75.
65. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004, 37: 277–85.
66. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005, 38: 1103–11.
67. Choi NH, Tobe T, Hara K, Yoshida H, Tomita M. Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40, 40 in seminal plasma and serum. *J Immunol Methods* 1990, 131: 159–63.
68. Mohamed AAR, Galal AAA, Elewa YHA. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. *Acta Histochem [Internet].* 2015;117(7):649–58. Available at:
69. El-Desoky GE, Abdel-Ghaffar A, Al-Othman ZA, Habila MA, Al-Sheikh YA, Ghneim HK, JP Gies, MAM Aboul-Soud. Curcumin protects against tartrazine-

- mediated oxidative stress and hepatotoxicity in male rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017, 21: 635–45.
70. El-Wahab HMFA, Moram GSED. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicol Ind Health* 2013, 29: 224–32.
71. Abd-Elhakim YM, Moustafa GG, Hashem MM, Ali HA, Abo-EL-Sooud K, El-Metwally AE. Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes. *Environ Sci Pollut Res* 2019, 26: 12368–78.
72. Velioglu C, Erdemli ME, Mehmet Gul , Zeynep Erdemli, Zayman E, Bag HG, Altinoz E. Protective effect of crocin on food azo dye tartrazine-induced hepatic damage by improving biochemical parameters and oxidative stress biomarkers in rats. *Gen Physiol Biophys* . 2019, 38: 73–82.
73. Al-Seeni MN, El Rabey HA, Al-Hamed AM, Zamazami MA. Nigella sativa oil protects against tartrazine toxicity in male rats. *Toxicol Rep* 2018, 5: 146–55.
74. El-desoky GE, Wabaidur SM, Alothman ZA, Habila MA. Regulatory Role of Nano-Curcumin against Tartrazine-Induced Oxidative Stress, Apoptosis-Related Genes Expression, and Genotoxicity in Rats. *Molecules* 2020, 25: 5801.
75. Masood Sadiq Butt, Muhammad Imran AI. Therapeutic perspective of thymoquinone: A mechanistic treatise. *Food Sci.* 2020;9:1792–809.
76. Hajipour S, Farbood Y, Dianat M, Rashno M, Khorsandi LS, Sarkaki A. Thymoquinone improves behavioral and biochemical deficits in hepatic encephalopathy induced by thioacetamide in rats. *Neurosci Lett* 2021, 745: 135617.
77. Bouhlel A, Bejaoui M, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, Hentati H, Corlu A, Abdennebi HB. Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018, 45: 943–51.

78. Abdel-Daim MM, Shaheen HM, Abushouk AI, Toraih EA, Fawzy MS, Alansari WS, Aleya L, Bungau S. Thymoquinone and diallyl sulfide protect against fipronil-induced oxidative injury in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018, 25: 23909–16.
79. Erdemli ME, Yigitcan B, Gul M, Bag HG, Gul S, Aksungur Z. Thymoquinone is protective against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced hepatotoxicity. *Biotech Histochem* 2018, 93: 453–62.
80. Al About D, Baty RS, Alsharif KF, Hassan KE, Zhery AS, Habotta OA, Elmahallawy EK, Amin HK, Moneim AE, Kassab RB. Protective efficacy of thymoquinone or ebselen separately against arsenic-induced hepatotoxicity in rat. *Environ Sci Pollut Res* 2021, 28: 6195–206.
81. Asgharzadeh F, Bargi R, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats. *Avicenna J Phytomed* 2017, 7: 502–10.
82. Bilgic S , Tastemir Korkmaz D , Azirak S , Guvenc AN , Kocaman N, Ozer MK. The protective effect of thymoquinone over olanzapine- induced side effects in liver, and metabolic side effects. *Bratisl Lek Listy* 2017, 118: 618–25.
83. Farag MM, Ahmed GO, Shehata RR, Kazem AH. Thymoquinone improves the kidney and liver changes induced by chronic cyclosporine A treatment and acute renal ischaemia/reperfusion in rats. *J Pharm Pharmacol* 2015, 67: 731–9.
84. Mabrouk A, Bel Hadj Salah I, Chaieb W, Ben Cheikh H. Protective effect of thymoquinone against lead-induced hepatic toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res* 2016, 23: 12206–15.
85. El-Sheikh AAK, Morsy MA, Abdalla AM, Hamouda AH, Alhaider IA. Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. *Mediators of Inflamm* 2015, 2015: 12.
86. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, 45: 51–88.