Araştırma Makalesi/Original Article
Makale Dili "Türkçe"/Article Language "Turkish"

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Glukokortikoid ile oluşturulan insülin direncinde timokinonun karaciğer DNA hasarının tamiri ve moleküler yolaklar üzerindeki etkileri

Investigation of the effect of thymoquinone on liver tissue DNA damage and molecular pathways in glucocorticoid-induced insulin resistance

Semiha DEDE[1] (ID), Ayşe USTA[2] (ID), Veysel YÜKSEK[3] (ID)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, insülin direncine bağlı olarak meydana gelen doku hasarının önlenmesinde veya tamir edilmesinde çok sayıda etken maddenin rolü moleküler düzeyde incelemektedir. Bu çalışma, *Nigella sativa*'nın başlıca etken maddesi olan ve pek çok yararlı etkisi bilinen timokinonun (TK) deneysel insülin direncinde karaciğer dokusundaki DNA hasarının tamiri ve bazı moleküler yolaklar üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, glukokortikoid ile indüklenen insülin direnci modeli oluşturulmuştur. Kontrol (K) 7 adet, İnsülin Direnci (İD) 7 adet, Timokinon (TK) 7 adet, timokinon ile korunma (TKI) 7 adet ve tedavi (ITK) 7 adet, tedavi kontrol için insülin direnci+metformin (İM) 5 adet olmak üzere toplam 40 adet rat kullanılmıştır. Çalışma sonucunda karaciğer dokusunda metabolik genlerin (antioksidan: Gpx, Sod, nekrotik: Rip1, Rip3, otofajik: Atg3 Atg5, apoptotik: Kaspaz 3 Kaspaz 8 Kaspaz 9, DNA hasarını onaran: KU70, KU80, TP53) ekspresyon seviyeleri, Real-time qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılık kontrol grubunun ekspresyonun

ABSTRACT

Objective: This study investigates the role of various compounds in the prevention or repair of tissue damage associated with insulin resistance at the molecular level. It aims to evaluate the effects of thymoquinone (TK), the principal active compound of *Nigella sativa* known for its numerous beneficial effects, on DNA damage and some molecular pathways in experimental insulin resistance.

Methods: The insulin resistance model was induced using glucocotiocoids. A total of 40 Wistar-Albino rats were utilized, comprising 7 in the control (C) group, 7 in the insulin resistance (IR) group, 7 receiving TK, 7 protection with TK (TKIR), and undergoing treatment with TK (IRTK) and 5 for tretament control with insulin resistance plus metformin (IM) groups. Expression levels of metabolic genes (antioxidant: Gpx, Sod; necrotic: Rip1, Rip3; autophagic: Atg3, Atg5; apoptotic: Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9; DNA repair: KU70, KU80, TP53) in liver tissue were determined using Real-time qPCR. Differences between groups were assessed by comparing fold changes in expression against the

[1]Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD., Van, Türkiye
[2]Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Van, Türkiye
[3]Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, Türkiye

İletişim / Corresponding Author : Semiha DEDE
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya AD., Van - Türkiye
E-posta / E-mail : sdede@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.08.2024
Kabul Tarihi / Accepted : 30.12.2024

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.80270

Dede S, Usta A, Yüksek V. Glukokortikoid ile oluşturulan insülin direncinde timokinonun karaciğer DNA hasarının tamiri ve moleküler yolaklar üzerindeki etkileri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(4): 531 - 542

artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: DNA hasarını onaran KU70 ve KU80 gen ekspresyonları, TK verilen gruplarda artış göstermiştir. TP53 geni I grubunda belirgin bir artış gösterirken, tedavi için TK verilen grupta azalmıştır.Apoptotik Kaspaz8 geni ekpresyonu ID grubunda artmış, TK verilen gruplarda azalmış, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 gen ekspresyonlarında ise önemli bir farklılık saptanmamıştır. Antioksidan (Gpx1,Sod1) gen ekspresyonu bakımından, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. OtofajikAtg5, nekrotikRip1 ve Rip3 genlerinin ekspresyonu I grubunda artarken, TK verilen gruplarda azalmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak TK'nun, insülin direncini azaltma, glukoz toleransını iyileştirme ve pankreatik ß-hücre fonksiyonlarını destekleme gibi etkilerinin; antioksidan özelliklerinin yanı sıra, KU70 ve KU80 genleri aracılığı ile DNA onarımını attırması, antiapoptotik genleri upregüle etmesi ve otofajik ve nekrotik yolakları inhibe etmesi gibi mekanizmalardan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Bu bulguların, insülin direncine bağlı komplikasyonların tedavisi ve önlenmesinde TK'nun karaciğer koruyucu etkisinin biyokimyasal temellerini anlamada yararlı bilgiler sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnsülin direnci, timokinon, karaciğer, DNA hasarı, DNA tamiri, moleküler yolaklar

control group. Statistical analysis was performed using SPSS.

Results: The expression levels of DNA repair and damage genes KU70 and KU80 increased in the groups receiving TK. The TP53 gene exhibited a significant increase in the IR group but decreased in the TK treatment group. Apoptotic Caspase 8 gene expression was elevated in the IR group and reduced in the TK groups, while no significant differences were observed for Caspase 3 and Caspase 9 expression. No significant differences were noted in antioxidant gene expression (Gpx1, Sod1) among the groups. Autophagic Atg5, and necrotic Rip1 and Rip3 gene expressions increased in the IR group but decreased in the TK groups.

Conclusion: The results suggest that TK may reduce insulin resistance, improve glucose tolerance, and support pancreatic ß-cell functions through mechanism including enhancing DNA repair via KU70 and KU80, upregulating antiapoptotic genes, and inhibiting autophagic and necrotic pathways. These results could provide valuable insights into the biochemical basis for the hepatoprotective effects of TK in the treatment and prevention of insulin resistance-related complications.

Key Words: Insulin resistance, thymoquinone, liver, DNA damage, DNA repair, molecular pathways

GİRİŞ

İnsülin direnci (İD), hücrelerin insüline normalden daha az duyarlı olması nedeniyle kan glukozunun yükselmesi ve pankreasın fazla miktarda insülin üretmesine rağmen hücrelerin bu insüline yeterli yanıt vermemesi durumunu ifade etmektedir. İnsülin direnci, metabolik sendrom olarak bilinen çeşitli metabolik, hücresel ve klinik sorunlara (hipertansiyon, yüksek plazma trigliserid, düşük HDL, hiperinsülinemi, Tip 2 diyabet, koroner kalp hastalığı ve damar anormallikleri vs) neden olur. Hücrelere zarar veren reaktif oksijen türlerinin fazlalığı, insülin direncinin patogenezinde önemli bir etiyolojik faktör olup, kas, karaciğer ve yağ dokusunda insülin direncinin gelişmesini kolaylaştıran maddelerinin birikimiyle oluşan bir tür hücresel strese yol açar (1-4).

TK, çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunda bulunan ve geleneksel tıbbi değere sahip aktif bir ana bileşiktir. İyi bilinen antioksidan, antiinflamautuvar,

antiobezite, antihipertansif, antihiperlipidemik ve antidiyabetik otofajik özelliklerinin yanında, diyabette hiperglisemi, hiperinsülinemi, hiperlipidemi, insülin direncini önemli ölçüde önlemesi sayesinde insülin direncinin yönetiminde alternatif bir doğal ilaç olarak kullanılabileceğine dair görüşler vardır (5-9).

TK'un antidiyabetik etkilerini, pankreatik adacıkların bütünlüğünün korunması, glukoz-insülin homeostazisi, lipid metabolizması, hepato-renal fonksiyonları ve histomorfolojisini iyileştirerek gösterirken (10), hepatoprotektif etkilerinin, güçlü antioksidan, antiinflamatuar, antifibrotik, antiapoptotik/proapoptotik ve antikanserojenik özelliklerinden kaynaklandığı (11) düşünülmektedir.

Bu çalışma; deneysel insülin direncinde karaciğer dokularındaki DNA hasarının tamiri ve moleküler yolaklar (apoptotik, otofajik, nekrotik, oksidatif yolak) üzerine, tedavi ve korunma için TK uygulanmasının, etkisinin araştırılması amacıyla planlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, "Glukokortikoid ile indüklenen insülin direncinde timokinonun vitamin D metabolizması üzerine etkisi" isimli yüksek lisans tezinden sağlanan karaciğer dokuları kullanıldı. İnsülin direnci tanısı konulmasında da bu tezden alınan değerler kullanıldı (12).

Deney hayvanları

Çalışma için, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden ağırlıkları 150 ile 200 gr arasında değişen 40 adet Wistar-Albino erkek sıçan sağlandı. Ratlar deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlık, sıcaklığı 22 ± 2 °C olarak ayarlanmış odalarda sürekli olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı.

Deneme gruplarının hazırlanması(12)

1. Grup (Kontrol-K): Rastgele seçilen yedi adet rat kontrol grubu olarak ayrıldı. Bu grubun ilk kan glukoz düzeyi kuyruktan alınan kanda tespit edildi. İntraperitoneal (i.p) yoldan 7 gün boyunca serum fizyolojik enjekte edilip son 7 gün gavaj ile ayçiçek yağı verildi.

2. Grup (İnsülin Direnci-İ): Yedi adet rata 7 gün boyunca deksametazon 1mg/kg/gün (i.p.)uygulandı.

3. Grup (Timokinon-TK): Yedi adet rattan oluşan gruba 7 gün boyunca ağız gavajı ile TK 10mg/kg/gün olarak uygulandı.

4. Grup (Timokinon+ İnsülin direnci-TKİ): Yedi adet rata 7 gün süresince ağız gavajı ile TK10 mg/kg/gün (i.p.) uygulandı. Daha sonra 7 gün boyunca intraperitoneal olarak enjeksiyonla deksametazon 1mg / kg / gün uygulandı.

5. Grup (İnsülin direnci+ Timokinon-İTK): Yedi adet rattan oluşan gruba 7 gün süresince deksametazon 1mg/kg/gün (i.p.) uygulandı. Daha sonra 7 gün boyunca ağız gavajı ile TK 10mg/kg/gün verildi.

6. Grup (İnsülin direnci+metformin-İM): Beş adet rattan oluşan gruba 7 gün boyunca deksametazon 1mg/kg/gün (i.p.) uygulandı. Toz haldeki metformin (40 mg/kg/gün) şeklinde suda eritilerek, ağız gavajı ile 6 gün verildi ve deneme 10. güne tamamlandı.

Bütün gruplarda, son uygulamanın yapılmasından 2 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz düzeyleri saptandı (Biyosensor glukoz ölçüm cihazı ve stripleri, Lifechek, Türkiye).

Karaciğer dokularının toplanması

Steril ortamda, sakrifiye edilen ratlardan steril bisturi ve pens yardımıyla alınan yaklaşık 200 mg karaciğer dokusu 2 ml steril RNAaz free tüplere konulduktan sonra, üzerini kaplayacak kadar RNA stabilizatör konuldu.

Doku homojenatının hazırlanması

Dokulardan 80 mg kadarı steril tüplere alındı. Dokuların üzerine 0,2 ml steril fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 1500 rpm'de 4 °C derecede sıcaklıkta santrifüj edildi. Tüpün üstünde kalan sıvı kısım atıldı ve hemen total RNA izolasyon aşamasına geçildi.

İnsülin direncinin hesaplanması (13)

Kan şekeri (FUJI DRI-CHEM NX500, Japonya), serum insülin düzeyleri (Rat INS ELISA Kiti- USBN Kod No: CEA448Ra) ölçülerek elde edilen sonuçlara göre insülin direnci hesaplandı.İnsülin direncinin hesaplanması, aşağıdaki formüle göre yapıldı.

HOMA IR= Plazma glukoz (mg/dL) × açlık plazma insülin (mu/L)/405.

RNA eldesi ve cDNA izolasyonu

Karaciğer örneklerinden total RNA izolasyon protokolüne göre (geneAll, Güney Kore) RNA eldesi yapıldı. Uygun ölçüm sonucunda Total mRNA'dan High-Capacity cDNA ReverseTranscription izolasyon kiti (WizScriptTM cDNA Synthesis) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

WizScriptTM cDNA Synthesis Kit protokolüne göre, cDNA karışımı 200 µl'lik PCR tüpünde hazırlandı (Her bir tüpte 10 µl olacak şekilde karışım hazırlandı). gDNA eliminasyonu yapılmış RNA'lar 10'ar µl alınarak diğer tüplere eklendi. Qiagen Rotor-Gene Q Software-Run cihazı ile reverse transkripsiyon aşağıdaki programa göre gerçekleştirildi.

cDNA sentezinde kullanılan uygulamanın sıcaklıkları ve süreleri; 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk, 25°C'de 1 dk, olarak ayarlandı.

RT-PCR analizleri

Tüm gruplarda rat karaciğer dokusundan elde edilen RNA izolasyon ürünlerinde genlerin ekspresyonu real time-PCR ile belirlendi. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak tablo 3'de primer sekans dizilimleri verilen hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeyleri belirlendi. Her bir gene ait primerlerin uygun optimizasyon şartları belirlendi. RT-qPCR reaksiyonu ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) cihazında gerçekleştirildi. Nekrotik hücre ölümüyle bağlantılı olan Rip1 ve Rip3 geni; otofajik hücre ölümüyle bağlantılı olan Atg3 ve Atg5 genleri; apoptotik hücre ölümüyle bağlantılı olan Kaspaz -8, Kaspaz -9, Kaspaz -3 genleri ve DNA hasarını onaran KU70, KU80 ile tümör önleyici TP3 genlerinin transkripsiyon düzeyleri belirlendi. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak Aktin Beta (ACTB) kullanıldı. Çalışmada amplikasyon tespiti için SYBR Green master mix (WizpureTM qPCR Master) kullanıldı. Her bir örnek 3 bağımsız tekrar ile tekrarlandı, bir ct (cycletreshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibariyle belirlendi. Ekspresyon analizlerinde genlerin ürünleri 2-ΔΔCt değerleri ile belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık kontrol grubunun ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

Qiagen Rotor Gen model gerçek zamanlı-qPCR cihazı kullanılarak çoğaltıldı. WizpureTM qPCR Master (SYBR) protokolüne göre, her birörnek için aşağıdaki karışım hazırlandı. Real-time PCR'da kullanılan karışımın bileşenleri ve miktarları; Mastermix 10µl, Forward Primer 2µl, Reverse Primer 2µl, Su (Nükleaz-Free) 5µl, cDNA 1µl olarak yapıldı.

Aşağıda RT-PCR analizinde kullanılan hedef genlerin forward ve reverse primerlerine ait baz dizilimleri verildi (Tablo 1).

Hazırlanan 200 µl PCR tüpleri Real-time PCR cihazında (Qiagen, Rotorgene, USA) ilgili cDNA'lar çoğaltıldı.

İstatistik Analiz

Elde edilen veriler; Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler için grupları karşılaştırmada Tek Yönlü Varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede, Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Bu özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemede, genel ve gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Pearson korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (ver: 22) istatistik paket programı kullanılmıştır.

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:25.04.2024, Karar no: 2024/04-07).

Tablo 1. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler ve dizilimleri

Genler	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Kaspaz P3	CGAAACTCTTCATCATTCAGG	GAGCATTGACACAATACACGG
Kaspaz P8	GATGTCCTGGTGCTATTTCAGAG	CCTCCTTGTCCATGTCTTCTG
Kaspaz P9	TCTCACACCAGAAACACCCA	GTCGTTCTTCACCTCCACCA
ATG3	GGGAAGAATTGAAAGTGAAGG	TGAACTGAACACATAGGAGG
Atg5	CTATTTGACGCTGGTAACTGAC	CTGATGTGAAGGAAGTTGTCTGG
Rip1	CTTCAGCACCTAGCTCCGTC	TGTCCAGGTCTTTCCTCTCCA
Rip3	CCATCCAGACCCAACAAGAG	GACGAAGATTCACCATAGCC
Gpx1	TCCACCGGTATGCCTTCTC	TCTCTTCATTCTTGCCATTCTCC
Sod1	GCTTCTGTCGTCTCCTTGCT	CATGCTCGCCTTCAGTTAATCC
TP53	CTGGACGACAGGCAGACTTT	GTCCCGTCCCAGAAGATTCC
KU70	GCCCACCCTCTTCTGTCC	GGGCTCTGCTCCTCCTCT
KU80	ACAGAAGACCACGACTCCAG	AGTTGCTGAAGACTCTCGCT
GAPDH	AACCCATCACCATCTTCCAG	GCCATCCACAGTCTTCTGAG

BULGULAR

Çalışma sonunda belirlenen HOMA-IR verileri aşağıdaki tabloda verildi (Tablo 2).

Çalışma sonucunda elde edilen veriler aşağıda verilmiştir.İnsülin direnci değerleri de Göktuğ (2022)'un yüksek lisans tezinden alınmıştır (Tablo 5). HOMA-IR düzeyleri I grubunda en yüksek ve kontrole göre önemli ($p \leq 0.05$) bulunurken, diğer gruplar arasında birbirileri ve kontrole göre önemli bir fark bulunmadı (13).

KU70 gen ekspresyonu korunma için TK(TKI) verilen grupta 5.9 kat, tedavide (ITK) ise 23 kat up regule olurken, TK ve ID gruplarında ise önemli oranda down regule oldu. Tedavi kontrol (IM) grubunda ise kontrolden farklı değildi.KU80 gen ekspresyonu, tedavi için TK verilen grupta (ITK) 5 kata yakın up regüle olurken, TK ve ID grubunda kontrole göre down regule oldu. Tedavi kontrol (IM) grubunda ise kontrolden farklı değildi.TP53; ID grubunda 6 kat up regüle oldu. Tedavi için TK (ITK) verilen grupta metformin verilen gruba yakındı. TK ve TKI grupları kontrole yakın bulundu (Tablo 3).

Tablo 2. Çalışma gruplarından elde edilen HOMA-IR sonuçları (13).

	K	TK	I	TKI	ITK	IM
HOMA-IR	544±61.4b	420±122.6b	1080±293.8a	682±125.6ab	443±90.75b	787±120.09ab

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

Tablo 3. Çalışma gruplarından elde edilen DNA hasarını tamir genleri ekspresyon sonuçları

	K	TK	I	TKI	ITK	IM
KU70	1	$0,24 \pm 0,02^{a}$	$0,42 \pm 0,11^{a}$	$5,90 \pm 0,56^{b}$	$23,03 \pm 0,81^{c}$	$1,74 \pm 0,07^{a}$
KU80	1	$0,05 \pm 0,01^{a}$	$0,59 \pm 0,02^{ab}$	$1,26 \pm 0,09^{bc}$	$4,99 \pm 0,40^{d}$	$1,80 \pm 0,44^{c}$
TP53	1	$1,05 \pm 0,01^{a}$	$6,7 \pm 0,15^{c}$	$0,89 \pm 0,001^{a}$	$2,15 \pm 0,09^{b}$	$2,73 \pm 0,43^{b}$

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin ekspresyonu bakımından gruplar arasında ortalama farklar açısından önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Ama Kaspaz 3 geninin bütün çalışma gruplarında kontrole göre 2 kattan fazla up regule olduğu görüldü. Kaspaz 8; ID grubunda 2,9 kat up regüle olurken, TK ve metformin verilince yarıya yakın down regule olduğu belirlendi (Tablo 4).

Gpx geni; bütün çalışma grupları arasında ortalama değerlerde anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, tümünün kontrole göre 1.5 kattan fazla up regule olduğu görüldü. Sod geni;bütün çalışma gruplar arasında ortalama değerlerde anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte gen ekspresyonu, kontrole göre 2 kat civarında up regule olduğu saptandı (Tablo 5).

Atg3 gen ekspresyonu bakımından, bütün çalışma grupları ve kontrol grubu arasındaki ortalamaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.Atg5 geni; ID grubunda kontrole göre 6 kat up regüle olurken, korunma ve tedavi için TK verilen (TKI ve ITK) gruplarda kontrole göre ve tedavi kontrole göre (IM) azaldı (Tablo 6).

Rip1 gen ekspresyonu; ID grubunda kontrol grubuna göre 2.4 kat arttı, tedavi kontrol (IM) ve korunma ve tedavi için TK verilen (TKI ve ITK) gruplarında yarı yarıya azaldı. Aynı şekilde Rip3 geni de ID de 7,5 kat artarken, tedavi kontrol (IM) ve korunma için TK verilen (TKI ve ITK) gruplarında çok azaldı. Ancak tedavi için TK verilen (ITK) grupta da azalmakla birlikte, yine de kontrolden 5 kata yakın daha fazla up regüle olduğu görüldü (Tablo 7).

Tablo 4. Çalışma gruplarından elde edilen apoptozis genleri ekspresyon sonuçları

Gruplar	K	TK	I	TKI	ITK	IM
Kaspaz 3	1	2,56 ± 0,43	2,56 ± 0,43	2,66 ± 0,46	2,76 ± 0,48	2,87 ± 0,51
Kaspaz 8	1	1,48 ± 0,03[b]	2,99 ± 0,01[a]	0,52 ± 0,03[d]	0,59 ± 0,09[cd]	0,72 ± 0,02[c]
Kaspaz 9	1	0,22 ± 0,02	1,10 ± 0,28	1,04 ± 0,15	0,44 ± 0,11	1,00 ± 0,47

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

Tablo 5. Çalışma gruplarından elde edilen antioksidan enzim genleri ekspresyon sonuçları

Gruplar	K	TK	I	TKI	ITK	IM
Gpx	1	1,52 ± 0,07	1,52 ± 0,07	1,54 ± 0,07	1,57 ± 0,08	1,60 ± 0,09
Sod	1	1,87 ± 0,02	1,87 ± 0,02	1,92 ± 0,02	1,98 ± 0,03	2,03 ± 0,03

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

Tablo 6. Çalışma gruplarından elde edilen otofajik genleri ekspresyon sonuçları

	K	TK	I	TKI	ITK	IM
Atg3	1	1,31 ± 0,02	1,31 ± 0,02	1,33 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,36 ± 0,02
Atg5	1	2,04± 0,03[ab]	6,20 ± 0,93[c]	0,67 ± 0,07[a]	0,54 ± 0,02[a]	3,73 ± 0,20[b]

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

Tablo 7. Çalışma gruplarından elde edilen nekrotik genleri ekspresyon sonuçları

	K	TK	I	TKI	ITK	IM
Rip1	1	0,05 ± 0,01[a]	2,39 ± 0,02[c]	0,56 ± 0,04[b]	0,40± 0,03[ab]	0,76 ± 0,22[b]
Rip3	1	0,05 ± 0,01[a]	7,45 ± 0,49[c]	0,62 ± 0,12[a]	4,99 ± 0,04[b]	0,39 ± 0,05[a]

a, b, c...: Farklı küçük harfi alan gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır.

TARTIŞMA

Geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan *Nigella sativa* (NS; Ranunculaceae), diyabetes mellitusta (DM) glukoz toleransını iyileştirerek (arttırarak), hepatik, hepatik glukoneogenezi azaltarak, kan glukozunu ve lipit dengesizliğini normalleştirerek ve pankreastan insülin salgılanmasını uyararak DM tedavisinde adjuvan tedavi olarak önemli etkinlik göstermiştir. NS, insülin direncini azaltır, insülin sinyalini artırır (13). TK, çoğunlukla antioksidan etkisinin yanı sıra pankreatik ß-katenin ekspresyonunun yukarı regülasyonu yoluyla vücuttaki insülin seviyelerinin dengede tutulmasını sağlar (14). Biyokimyasal ve ultrastrüktürel bulgular, *N. sativa* ekstraktının ve timokinonun terapötik olduğunu ve oksidatif stresi azaltarak STZ diyabetine karşı koruduğunu, dolayısıyla pankreatik ß hücre bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir (15).

TK'un apoptozisi önleme ve çeşitli bağışıklık ve hücresel sinyal yollarını düzenleme, interferonlar, interlökinler, TNF-α gibi bağışıklık faktörlerini, oksidatif stres seviyelerini, düzenleyici T hücrelerini ve NF-κß, JAK-STAT, MAPK gibi hücresel sinyal yollarını etkileyerek moleküler düzeyde işlev gösterdiği bilinmektedir (16-19).

TK, antioksidan enzimlerin (Gpx, Sod, GR, CAT) ve indirgenmiş glutatyonun (GSH) üzerindeki olumlu etkileri ile oksidatif stresin olumsuz etkilerini iyileştirir. Antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi azaltır, hepatik fonksiyon bozukluklarına karşı koruma sağlar, hepatik steatozu ve oksidatif stresi iyileştirir. TK ve nanopartikül formu da, antioksidan özellikleri sayesinde apoptotik belirteçlerin ve inflamatuar sitokinlerin aşağı regülasyonu ile karaciğer hasarını azaltır (20,21). TK, bozulmuş glukoz toleransını ve insülin direncini önler, HFD (high-fructose diet) kaynaklı hepatik TBARS artışını ve Sod, katalaz ve GSH tükenmesini iyileştirir (22). Gpx ve Sod gen ekspresyonlarındaki artışlar, oksidatif stresin yönetiminde olumlu bir etki olduğunu gösterir. Ancak bu çalışmada, tedavi grupları arasında karaciğer dokusundaki gen ekspresyonunu düzeylerinde belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu durum,TK'un antioksidan enzimlerin aktivitesini etkilemektense, ilişkili sinyal yollarını düzenleyerek etkili olabileceğini düşündürmektedir.Ayrıca, insülin direncine bağlı etkilerin yalnızca oksidatif stresle değil, inflamasyon, hücresel stres ve metabolik yolların bozulması ile ilişkili olabileceği ya da antioksidan enzimlerin aktivitesinin gen ekspresyonundan sonra post-translasyonel modifikasyonları ile düzenlenebileceği olasılıkları da göz önünde bulundurulmalıdır.

TK, oksidatif stres ve DNA hasarını azaltarak, karaciğer hasarını önlemeye yardımcı olur. Aynı zamanda, DNA onarım süreçlerini destekleyici etkiler gösterir (23-26). Böylece DNA hasarını ve apoptozisi azaltarak karaciğer hasarını da engeller (21,22). Bu çalışmada da TK'un DNA onarımında olumlu etkiler sağladığı görülmektedir. TK, hem korunma hem de tedavi amaçlı uygulamalarda KU70 ve KU80 gen ekspresyonunu artırmış ve bu genlerdeki artışlar, özellikle tedavi grubunda belirgin olup, DNA hasarını önlemede önemli bir rol oynar. TK'un DNA onarım mekanizmalarını düzenlemesi, DNA hasarını azaltarak hem hücre koruma hem de tedavi amaçlı kullanımlarda etkili bir DNA koruyucu olarak işlev görmesini sağlar.

TK, oksidatif stres ve DNA hasarını azaltarak,

karaciğer hasarını önlemeye yardımcı olur. Aynı zamanda, DNA onarım süreçlerini destekleyici etkiler gösterir. TK, hem korunma hem de tedavi amaçlı kullanıldığında KU70 ve KU80 gen ekspresyonunu artırarak DNA onarımını teşvik eder. Özellikle tedavi grubunda KU70 ve KU80 genlerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, TK'un DNA onarım genlerini düzenleyerek hasarları azalttığını ve hem korunma hem de tedavi süreçlerinde fayda sağladığını göstermektedir.Aynı şekilde, TK'un TP53 gen ekspresyonunu azaltıcı etkisi, DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde olumlu bir katkıda bulunarak, insülin direncinin (IR) neden olduğu aşırı TP53 aktivitesini dengeleyebileceğini göstermektedir. Tedavi gruplarında TP53 ekspresyon seviyeleri kontrol gruplarına yakın olup, metformin verilen gruba benzer etki gösterdiği ve bu gen için potansiyel koruyucu etkisinin bir kanıtı olabilir.

TK'un apoptotik sürece katkıları; insülin üreten β hücrelerinin apoptozisini baskılayarak (10), apoptotik hücre ölümünü sağlayarak, NF-κB ve MEK sinyalini inhibe ederek (27), hücre döngüsünü durdurarak (22), p53 aracılı apoptozis ve kaspaz aktivasyonunu etkileyerek (23, 28) gerçekleşmektedir.Apoptozis, fazla veya anormal hücreleri ortadan kaldırarak doku dengesini korumada önemli bir işlevi olan düzenlenmiş bir hücresel kendini yok etme mekanizmasıdır (19).TK'un yüksek glukoz verilen PC12 hücre hattında oksidatif DNA hasarı ve bazı apoptotik parametreleri üzerinde yararlı etkileri ortaya konulmuştur (29-31). Bu çalışmada Kaspaz 3, Kaspaz 9'da gruplar arasında fark olmamakla birlikte Kaspaz 8'de bütün gruplarda kontrole göre 2 kattan fazla artış gözlenmiştir. İnsülin direnci (İR) grubunda Kaspaz 8 gen ekspresyonundaki bu artış, hücre ölümüne katkıda bulunabilirken, TK ve metformin ile tedavinin ekspresyonu belirgin bir şekilde azaltması,apoptozis sürecini sınırlamış olabilir. Bu sonuçlar, TK'un apoptozis mekanizmasını düzenleyici etkisini ve DNA hasarına yanıt olarak apoptozis azaltabileceğini göstermektedir. TK'un, apoptotik yanıtı hafifleterek hücresel hasarın kontrol altına alınmasına katkı sağladığı söylenebilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, TK'un otofaji, nekrozis ve PI3K/Akt/mTOR gibi kritik hücresel yollar üzerinde önemli düzenleyici etkileri olduğunu göstermiştir. Nekroz ve otofaji ile ilgili etkiler dolaylı olarak, oksidatif stres, apoptozis ve DNA hasarı gibi konularla ilişkilendirilebilir (16,32,33).Böylece TK'un özellikle metabolik hastalıklar, kanser ve diğer kronik hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesi olanaklarını düşündürmektedir.

Otofaji, hücresel atıkların temizlenmesi ve hücresel homeostazın korunması için kritik bir süreçtir. Otofaji süreçlerindeki düzensizliklerin diyabet, obezite ve diğer kronik hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceğini vurgulamışlardır. TK'un otofaji süreçleri üzerindeki yararlı etkilerine dair bilgiler, metabolik bozuklukların tedavisinde bir seçenek olarak kullanılabileceğini göstermektedir (9,32).Bu çalışmada karaciğer dokusunda Atg3 gen ekspresyonundaki anlamlı değişikliklerin olmaması, TK'un bu gen üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu gösterebilir. Ancak, Atg5 genindeki belirgin değişiklikler, TK'un otofaji sürecini etkileyebileceğini ve özellikle ID durumunda otofajik yanıtı modüle edebileceğini ortaya koyabilir.

Nekrozis, patolojik hücre ölümünün bir formu olarak, genellikle inflamatuar yanıtlarla ilişkilidir ve bu durum, çeşitli hastalıkların ilerlemesinde rol oynayabilir. TK'un nekrozis üzerindeki yararlı etkileri, onun potansiyel terapötik kullanımını desteklemektedir (33,34).Bu çalışmada her iki nekrozis genindeki artış, IR'nin hücresel nekrozisi artırdığını ve tedavi seçeneklerinin bu süreci etkileyebileceğini gösterir. Metformin ve TK'un Rip1 ve Rip3 gen ekspresyonlarını azaltma etkisi, bu tedavilerin nekrozisi sınırlama potansiyelini ortaya koyabilir. TK'nun nekrozis süreçlerini azaltarak modüle etme yeteneğine sahip olduğuna işaret sayılabilir.

TK'un oksidatif stresi ve DNA hasarını azaltma etkileri, nekrozu dolaylı yoldan etkileyebilir,

çünkü oksidatif stres genellikle hücresel nekroza yol açabilir (35,36). TK'un hücre koruyucu etkileri nedeniyle otofaji ve nekrozis süreçlerini düzenleme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. TK'nun nekrozisi engelleyici etkisi, Rip-1, ve Rip-3 gibi nekrozis belirteçlerinin azaltılmasıyla gösterilmiştir. Otofaji, DNA hasarının onarımında rol oynayabilir ve DNA onarımdan sorumlu mekanizmaların etkilenmesi otofajiyi etkileyebilir.

Sonuç olarak elde edilen bulgular, TK'un antioksidan özellikleriyle oksidatif stresi azaltarak ve DNA onarım süreçlerini destekleyerek insülin direncine karşı korunma ve tedavide yararlı olabileceğini, ayrıca, apoptozis, otofaji ve nekrozis süreçlerini modüle ederek hücresel hasarı yönetebilme potansiyeline sahip olduğunu, dolayısı ile insülin direncine bağlı komplikasyonlarından olan karaciğer hasarının tedavisinde hepatoprotektif bir mekanizma sunabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen gen ekspresyon sonuçlarını doğrulamak amacıyla daha ileri protein düzeyinde analizlerin (Western blot, ELISA gibi) yapılması ve TK'nun uzun vadeli etkilerinin incelenmesinin, TK'un insülin direncinde metabolik yolaklar üzerindeki yararlı etkilerinin mekanizmalarını daha kapsamlı şekilde aydınlatılmasını sağlayabileceği düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:25.04.2024, Karar no: 2024/04-07).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Özer EM. İnsülin direnci. Maltepe Tıp Derg, 2015;7(2):1-5.
2. Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. Biochem J, 2017;474(8):1321-32.
3. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. Biomed J, 2017;40(5):257-62.
4. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. Physiol Rev, 2018;98(4):2133-223.
5. Faisal Lutfi M, Abdel-Moneim AH, Alsharidah AS, Mobark MA, Abdellatif AAH, Saleem IY, et al. Thymoquinone lowers blood glucose and reduces oxidative stress in a rat model of diabetes. Molecules, 2021;26(8):2348.
6. Ibrahim KG, Hudu SA, Jega AY, Taha A, Yusuf AP, Usman D, et al. Thymoquinone: A comprehensive review of its potential role as a monotherapy for metabolic syndrome. Iran J Basic Med Sci, 2024;27(10):1214-27.
7. Mahomoodally MF, Aumeeruddy MZ, Legoabe LJ, Montesano D, Zengin G. Nigella sativa L. and its active compound thymoquinone in the clinical management of diabetes: a systematic review. Int J Mol Sci, 2022;23(20):12111.
8. Balbaa M, El-Zeftawy M, Abdulmalek SA. Therapeutic screening of herbal remedies for the management of diabetes. Molecules, 2021;26(22):6836.
9. Saha P, Kumar S, Datta K, Tyagi RK. Upsurge in autophagy, associated with mifepristone treated polycystic ovarian condition, is reversed upon thymoquinone treatment. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021;208:105823.
10. El-Shemi AG, Kensara OA, Alsaegh A, Mukhtar MH. Pharmacotherapy with thymoquinone improved pancreatic ß-cell integrity and functional activity, enhanced islets revascularization, and alleviated metabolic and hepato-renal disturbances in streptozotocin-induced diabetes in rats. Pharmacology, 2018;101(1-2):9-21.
11. Tekbas A, Huebner J, Settmacher U, Dahmen U. Plants and surgery: the protective effects of thymoquinone on hepatic injury-a systematic review of in vivo studies. Int J Mol Sci, 2018;19(4):1085.
12. Göktuğ H. B. Glukokortikoid ile İndüklenen İnsülin Direncinde Timokinonun Vitamin D Metabolizması Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2022.
13. Shaukat A, Zaidi A, Anwar H, Kizilbash N. Mechanism of the antidiabetic action of Nigella sativa and tymoquinone: a review. Front Nutr, 2023;10:1126272.
14. Faddladdeen K, Ali SS, Bahshwan S, Ayuob N. Thymoquinone preserves pancreatic islets structure through upregulation of pancreatic ß-catenin in hypothyroid rats. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021;14:2913-24.
15. Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic ß-cells of streptozotocin-induced diabetic rats. J Diabetes, 2010;2(4):256-66.

16. Ali MY, Akter Z, Mei Z, Zheng M, Tania M, Khan MA. Thymoquinone in autoimmune diseases: Therapeutic potential and molecular mechanisms. Biomed Pharmacother, 2021;134:111157.

17. Ceylan T, Akin AT, Karabulut D, Tan FC, Taşkiran M, Yakan B. Therapeutic effect of thymoquinone on brain damage caused by nonylphenol exposure in rats. J Biochem Mol Toxicol, 2023;37(11):e23471.

18. Munef A, Lafi Z, Shalan N. Investigating anti-cancer activity of dual-loaded liposomes with thymoquinone and vitamin C. Ther Deliv, 2024;15(4):267-78.

19. Karaman RS, Dede S, Yüksek V. The effect of thymoquinone on expression levels of apoptotic, oxidative and antioxidant genes in NRK-52E cells. J Cell Neurosci Oxidative Stress, 2023;15(1), 1113-21.

20. Awad AS, Abd Al Haleem EN, El-Bakly WM, Sherief MA. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, apoptosis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016;389(4):381-91.

21. Nassar WM, El-Kholy WM, El-Sawi MR, El-Shafai NM, Alotaibi BS, Ghamry HI, et al. Ameliorative effect of thymoquinone and thymoquinone nanoparticles against diazinon-induced hepatic injury in rats: a possible protection mechanism. Toxics, 2023;11(9):783.

22. Prabhakar P, Reeta KH, Maulik SK, Dinda AK, Gupta YK. Protective effect of thymoquinone agains thigh-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. Eur J Nutr, 2015;54(7):1117-27.

23. Bozali K, Metin Guler E, Kocyigit A. A Study on thymoquinone: antioxidant Capacity and anticancer activities in lovo colorectal cancer cells. Chem Biodivers, 2024;21(2):e202301886.

24. Usta A, Dede S. The effect of thymoquinone on nuclear factor kappa B levels and oxidative DNA damage on experimental diabetic rats. Pharmacogn Mag, 2017;13(Suppl 3):S458-S461.

25. Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JF, Shenoy K, Mohamed Ali S et al. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in Human glioblastoma cells. PLoSOne, 2010;5(8):e12124.

26. Karimian A, Majidinia M, Moliani A, Alemi F, Asemi Z, Yousefi B et al. The modulatory effects of two bioflavonoids, quercetin and thymoquinone on the expression levels of DNA damage and repair genes in human breast, lung, and prostate cancer cell lines. Patholog Res Pract, 2022;240:154143.

27. Ballout F, Monzer A, Fatfat M, Ouweini HE, Jaffa MA, Abdel-Samad R et al. Thymoquinone induces apoptosis and DNA damage in 5-Fluorouracil-resistant colorectal cancer stem/progenitor cells. Oncotarget, 2020;11(31):2959-72.

28. Ichwan SJ, Al-Ani IM, Bilal HG, Suriyah WH, Taher M, Ikeda MA. Apoptotic activities of thymoquinone, an active ingredient of black seed (Nigella sativa), in cervical cancer cell lines. Chin J Physiol, 2014;57(5):249-55.

29. Gümüş AF, S Dede, V Yuksek, S Çetin, M Taşpınar. In vitro evaluation of thymoquinone on apoptosis and oxidative DNA damage in high glucose condition. Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand, France), 2018;64(14):79-83.

30. Dede S, Yur F, Taşpinar M, Çetin S, Usta A, Yüksek V. In vitro evaluation of thymoquinone and lycopene supplementation on oxidative DNA damage and oxidant status in high glucose conditions. Latin Am J Pharm, 2019; 38 (1), 209-12.

31. Usta A, Dede S, Yüksek V, Öner AC. Determination of the effect of thymoquinone on DNA damage in kidney cells applied to high glucose depending on time and dosage bycomet assay. Turk J Agriculture-Food Sci Tech, 2024; 12 (8):1359-65.

32. Deng S, Shanmugam MK, Kumar AP, Yap CT, Sethi G, Bishayee A. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. Cancer, 2019;125(8):1228-46.

33. Shojaedini M, Hemadi M, Saki G, Fakhredini F, Khodayar MJ, Khorsandi L. Thymoquinone effects on autophagy, apoptosis, and oxidative stress in cisplatin-induced testicular damage in mice. J Assist Reprod Genet, 2024;41(7):1881-91.

34. Usta A, Yüksek V, Dede S. The effect of thymoquinone at proliferative and toxic doses on Ripk1 gene expression in kidney cells. 2022, 2. International Congress on Biological and Health Sciences (2.ICBH-2022), Afyonkarahisar, Türkiye, 24 - 27 Şubat 2022, pp 97-127.

35. Dera AA, Fayi MA, Otifi H, Alshyarba M, Alfhili MA, Rajagopalan P. Thymoquinone (TQ) protects against necroptosis induced by autophagy/mitophagy-dependent oxidative stress in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract (CSE). J Food Biochem, 2020; 44(9): e13366.

36. Almalki NAR, Sabir JSM, Ibrahim A, Alhosin M, Asseri AH, Albiheyri RS et al. UHRF1 poly-auto-ubiquitination induced by the anti-cancer drug, thymoquinone, is involved in the DNA repair machinery recruitment. Int J Biochem Cell Biol, 2024;171:106582.