



**DİETİLNİTROZAMİNLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA EMBELİN'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aydın AKCILAR

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hikmet KELEŞ

Tez No: 2024 – 044

2024 – Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

PATOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİETİLNİTROZAMİNLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA EMBELİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Aydın AKCILAR

Danışman

Prof. Dr. Hikmet KELEŞ

Tez No: 2024 – 044

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: “23.SAĞ.BİL.15”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Aydın AKCILAR	
	Numarası	223319001	
	Anabilim Dalı	Patoloji	
	Program	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora	
Tezin Başlığı		Dietilnitrozaminle Karaciğer Hasarı Oluşturulan Ratlarda Embelin'in Etkilerinin Araştırılması	
Tez Savunma Sınav Tarihi		12.12.2024	
Tez Savunma Sınav Saati		10:00	
Yukarıda bilgileri verilen tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.			
Başkan	Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE		İmza
Üye	Prof. Dr. Hikmet KELEŞ		İmza
Üye	Doç. Dr. Mehmet Fatih BOZKURT		İmza
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır. Prof. Dr. Esmâ KOZAN Enstitü Müdürü			

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

İmza

Aydın AKCILAR

ÖZET

DİETİLNİTROZAMİNLE KARACİĞER HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA EMBELİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dietilnitrozamin (DEN), güçlü teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkilere sahiptir. Embelin, *Embelia ribes* (Vidanga-sahte karabiber) bitkilerinin kurutulmuş meyvelerinden izole edilen bileşendir. Bu çalışmada, DEN verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda embelinin (E) biyokimyasal ve histopatolojik parametreler ile gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki olası etkileri araştırıldı. Üç aylık 28 adet Wistar albino erkek rat; sham, E, DEN ve DEN + E grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. DEN gruplarına tek doz 200 mg/kg DEN, E ve DEN + E gruplarına 14 gün boyunca 1,2 mg/kg embelin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Serum örneklerinden karaciğer enzimleri ve lipid profili ile total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS) düzeylerine bakıldı. Karaciğer dokusunda ise RT-PCR yöntemi kullanılarak sonic hedgehog (*Shh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*), inflamatuvar (*Tnfa*, *Il6*, *Il1b*) ve apoptotik (*TP53*, *Casp3*, *Bcl2*, *Bax*), genlerin analizi yapıldı. Hematoksilen eosin ile boyanan karaciğer doku örnekleri ışık mikroskopunda incelendi. Ratlara DEN verilmesi, serum karaciğer enzim, lipid ve oksidan kapasite düzeyleri ile inflamatuvar, apoptotik ve Shh sinyal yolağındaki genlerin ekspresyonunun artmasına neden oldu. Ayrıca DEN grubunda konjesyon, dejenerasyon, fibrozis, inflamasyon, apoptozis, kupffer hücre sayısı ve safra pigment birikiminde artış gözlemlendi ve bu histopatolojik değişiklikler embelin ile tedavide anlamlı olarak azaldı. Embelin, karaciğer enzim ve lipid düzeylerini azalttı, antioksidan kapasite olan TAS'ın aktivitesini arttırdı, proinflamatuvar sitokinler *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen ekspresyon seviyelerini ile Shh sinyal yolunun aktivasyonunu azalttı. Ayrıca *Bcl2* ekspresyonunu artırıp, *TP53*, *Casp3* ve *Bax* gen ekspresyon seviyelerini azaltarak karaciğer apoptozunu inhibe etti. Sonuç olarak, embelinin oksidatif stresi, inflamatuvar ve apoptoz yanıtı, Shh yolunun düzenlenmesini inhibe ederek, karaciğer fonksiyonlarını düzenleyerek ve karaciğerde dejeneratif bozuklukları önleyerek DEN'in neden olduğu karaciğer hasarında tedavi edici etkisi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Dietilnitrozamin, Embelin, Karaciğer hasarı, Shh sinyal yolağı, Gen ekspresyonu

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF EMBELIN IN RATS WITH LIVER DAMAGE CAUSED BY DIETHYLNITROSAMINE

Diethylnitrosamine (DEN) has strong teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects. Embelin is the compound isolated from the dried fruits of *Embelia ribes* (Vidanga-false black pepper) plants. In this study, the possible effects of embelin (E) on biochemical and histopathological parameters and gene expression levels in rats with liver damage induced by DEN were investigated. Twenty-eight three-month-old Wistar albino male rats were divided into four groups as sham, E, DEN and DEN + E groups. A single dose of 200 mg/kg DEN was injected intraperitoneally into the DEN groups, and 1.2 mg/kg embelin was injected intraperitoneally into the E and DEN + E groups for 14 days. Liver enzymes and lipid profiles, total antioxidant capacity (TAS) and total oxidant capacity (TOS) levels were measured from serum samples. Sonic hedgehog (*Shh*, *Ptch*, *Smo*, *Gli1*), inflammatory (*Tnfa*, *Il6*, *Il1b*) and apoptotic (*Tp53*, *casp3*, *Bcl2*, *Bax*) genes were analyzed in liver tissue using RT-PCR method. Liver tissue samples stained with hematoxylin and eosin were examined under light microscope. Administration of DEN to rats increased serum liver enzyme, lipid and oxidant capacity levels and expression of genes in the inflammatory, apoptotic and Shh signaling pathways. Additionally, an increase in congestion, degeneration, fibrosis, inflammation, apoptosis, Kupffer cell count and bile pigment accumulation was observed in the DEN group, and these histopathological changes were significantly reduced by treatment with embelin. Embelin decreased liver enzyme and lipid levels, increased the activity of TAS, which is an antioxidant capacity, decreased the gene expression levels of proinflammatory cytokines *Tnfa*, *Il6* and *Il1b*, and the activation of the Shh signaling pathway. It also increased the expression of *Bcl2* and decreased the gene expression levels of *Tp53*, *Casp3* and *Bax*, and inhibited liver apoptosis. In conclusion, embelin may have a therapeutic effect on DEN-induced liver damage by inhibiting oxidative stress, inflammatory and apoptosis response, regulation of the Shh pathway, regulating liver functions and preventing degenerative disorders in the liver.

Keywords: Diethylnitrosamine, Embelin, Liver damage, Shh signaling pathway, Gene expression

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın planlanmasından tamamlanmasına kadar her aşamasında bana destek olan, fikir ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hikmet KELEŞ'e, Yüksek Lisans eğitimim süresince desteklerini, bilgi ve deneyimlerini bana aktaran değerli hocalarıma, bu çalışmanın gerçekleşmesindeki katkı ve yardımlarından dolayı Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Raziye AKCILAR'a, çalışmamın histopatolojik analizlerinde yardımcı olan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Mehmet Fatih BOZKURT'a ve doktora öğrencisi Mudassar ZAFAR'a, biyokimyasal analizlerin yapılmasında destek olan Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalından Prof. Dr. Fatma Emel KOÇAK'a, çalışmamın deney aşamasında bana yardımcı olan Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Araştırma ve Uygulama Biriminden Veteriner Sağlık Teknisyeni Arif SOYLU'ya ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAPK) saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her aşamasında olduğu gibi, yine bu tez süresince de beni her zaman destekleyen sevgili eşim Raziye AKCILAR'a, yaşamımın bana verdiği en değerli hediye olan canım oğlum Ege AKCILAR'a, bu günlere gelmemde desteklerini benden esirgemeyen annem Fatma AKCILAR'a ve babam Mehmet AKCILAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dietilnitrozaminin karaciğer hasarı üzerine embelinin etkilerinin araştırıldığı bu çalışma, bilimsel araştırmalar için önemli bir literatür desteği sunduğunu ve gelecekte yeni çalışmalar için yeni bulgular vereceğini düşünmekteyim.

Saygılarımla

Aydın AKCILAR

Afyonkarahisar

2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nitrozaminler.....	2
1.1.1. Tarihçesi.....	2
1.1.2. Nitrozaminlerin Özellikleri.....	2
1.1.3. Nitrozaminlerin Sınıflandırılması.....	3
1.1.4. Nitrozaminlerin Oluşumu.....	5
1.1.5. Endojen ve Ekzojen Nitrat-Nitrit-Nitrozaminlerin Metabolizması..	6
1.1.6. Gıdalarda Kontaminant Olarak Nitrozaminler.....	8
1.1.7. İçme Sularında Kontaminant Olarak Nitrozaminler.....	10
1.1.8. Nitrozaminlerin Etki Mekanizması.....	12
1.1.9. Dietilnitrozamin (DEN).....	13
1.2. Embelin.....	15
1.2.1. <i>Embelia Ribes</i> 'in Biyolojik Özellikleri.....	15
1.2.2. Embelinin Kimyası.....	16
1.2.3. Embelinin Etki Mekanizması.....	17
1.2.3.1. Embelinin Antitümöral Aktivitesi.....	18
1.2.3.2. Embelinin Antimalaryal Aktivitesi.....	20
1.2.3.3. Embelinin Antiviral Aktivitesi.....	21
1.2.3.4. Embelinin Anti-diyabetik ve Anti-obezite Aktiviteleri.....	21
1.2.3.5. Embelinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	22
1.2.3.6. Embelinin Anti-inflamatuar Aktivitesi.....	23

1.2.3.7. Embelinin Antioksidan Aktivitesi.....	25
1.2.3.8. Embelinin Nörolojik Bozukluklar Üzerine Etkisi.....	26
1.2.3.9. Embelinin Kardiyovasküler Etkileri.....	27
1.2.3.10. Embelinin Fertilite Üzerine Etkisi.....	27
1.2.4. Embelinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri.....	28
1.2.5. Embelin Toksisitesi.....	29
2. MATERYAL ve METOT.....	30
2.1. Deney Hayvanları.....	30
2.2. Deney Grupları.....	30
2.3. Ratlarda Hepatotoksisite Oluşturulması.....	31
2.4. Embelin Uygulaması.....	31
2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması.....	31
2.6. Karaciğer İndeksinin Hesaplanması.....	31
2.7. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması.....	32
2.7. 1. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Analizleri.....	32
2.7. 2. Total Oksidan ve Total Antioksidan Kapasitenin Ölçümü.....	32
2.8. Gen Ekspresyon Analizleri.....	33
2.8.1. Total RNA İzolasyonu.....	33
2.8.2. cDNA Sentezi.....	34
2.8.3. Real-Time Polimeraz zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	35
2.9. Histopatolojik İncelemeler.....	36
2.10. İstatistiksel Analizler.....	36
3. BULGULAR.....	37
3.1. Embelinin Vücut ve Karaciğer Ağırlığı Üzerine Etkileri.....	37
3.2. Embelinin Karaciğer Fonksiyon Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	38
3.3. Embelinin Lipid Profili Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	39
3.4. Embelinin Oksidatif Parametre Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	40
3.5. Embelinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	42
3.5.1. <i>Shh</i> , <i>Ptch1</i> , <i>Smo</i> ve <i>Gli1</i> mRNA Gen Ekspresyonları.....	42
3.5.2. <i>Tp53</i> , <i>Casp3</i> , <i>Bax</i> ve <i>Bcl2</i> mRNA Gen Ekspresyonları.....	43
3.5.3. <i>Tnfa</i> , <i>Il6</i> ve <i>Il1b</i> mRNA Gen Ekspresyonları.....	45
3.6. Embelinin Histopatolojik Parametre Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	46

4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
6. KAYNAKLAR.....	61
7. EKLER.....	80
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.....	80
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFP	Alfa-fetoprotein
Akt	Protein Kinaz B
ALP	Alkalın fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
anti-HBV	Anti-hepatit B virusu
AST	Aspartat aminotransferaz
Bax	Bcl-2 benzeri X protein
Bcl2	B-Hücreli Lenfoma 2
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BUN	Kan üre azotu
Casp3	Caspase3
Casp9	Caspase9
CAT	Katalaz
CCl ₄	Karbon tetraklorür
CDK1	Siklin bağımlı kinaz 1
CDK2	Siklin bağımlı kinaz 2
CO ₂	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz-2
Ct	Döngü eşiği
cTnI	Troponin I
DEN	Dietilnitrozamin
DSS	Dekstran sülfat sodyum
GGT	Gama-glutamil transferaz
Gli1	Glioma ile ilişkili onkogen 1
GLUT4	Glukoz taşıyıcı protein 4
GSH	Redükte glutatyon
HCT-116	İnsan kolon karsinoma hücre dizisi
HDL	Yüksek dansiteli kolesterol
HE	Hematoksilen-Eozin
HepG2	Karaciğer karsinomu hücreleri
HO-1	Hem oksijenaz-1
HSV-1	Herpes simpleks virus tip 1
IAP3	Apoptoz inhibitör protein 3
IL-1 β /Il1b	İnterlökin-1 beta
IL-6/Il6	İnterlökin-6
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK/STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
LD ₅₀	Öldürücü doz-50
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük dansiteli kolesterol
LPO	Lipid peroksidasyonu
MCF-7	Meme karsinoma hücre dizisi
MIAPaCa-2	Pankreas karsinoma hücre dizisi
MPO	Miyeloperoksidaz
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
N ₂	Nitrojen

NDMA	N-nitrozodimetilamin
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NO	Nitrik oksit
NO ₂	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
Nrf-2	Nükleer faktör eritroid türevi-2
O ₂	Oksijen
8-OHdG	8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
p38 MAPK	p38 mitojenle aktive olan protein kinaz
p53/Tp53	Tümör baskılayıcı protein 53
PC-3	Prostat karsinoma hücre dizisi
PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PKC	Protein kinaz C
Ptch1	Patched transmembran proteini-1
ROS	Reaktif oksijen türleri
Shh	Sonic hedgehog protein
Smo	Smoothened protein
SOD	Süperoksit dismutaz
TAA	Tiyoasetamid
TAS	Total antioksidan kapasite
TBARS	Tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri
TBİL	Total bilirubin
TC	Total kolesterol
TG	Trigliserit
TNF-α/Tnfa	Tümör nekroz faktörü-alfa
TOS	Total oksidan kapasite
XIAP	X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. IARC'den N-Nitrozo bileşiklerinin sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2. Nitrozamin oluşumu.....	5
Şekil 1.3. Vücuttaki nitrit, nitrik oksit metabolizması.....	8
Şekil 1.4. N-nitrozo bileşiklerinin neden olduğu farklı tümör türleri.....	12
Şekil 1.5. Nitrozaminlerinden tümör oluşum mekanizması.....	13
Şekil 1.6. DEN'e bağlı oluşan karaciğer hasarı.....	14
Şekil 1.7. <i>Embelia ribes</i>	16
Şekil 1.8. <i>Embelia ribes</i> ve embelinin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.9. Embelinin etki mekanizması.....	18
Şekil 3.1. Embelinin oksidatif parametre düzeyleri üzerine etkileri.....	41
Şekil 3.2. <i>Shh</i> , <i>Ptch1</i> , <i>Smo</i> ve <i>Gli1</i> gen mRNA ekspresyon düzeyleri.....	42
Şekil 3.3. <i>Tp53</i> , <i>Casp3</i> , <i>Bax</i> ve <i>Bcl2</i> gen mRNA ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 3.4. <i>Tnfa</i> , <i>Il6</i> ve <i>Il1b</i> gen mRNA ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 3.5. Gruplarındaki hayvanların karaciğerlerinin histopatolojik görünümü....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Nitrozamin tipleri.....	3
Çizelge 1.2. Nitrozaminlerin bulunduğu alandaki yarılanma ömürleri.....	4
Çizelge 2.1. Total oksidan kapasite (TOS) ölçümü.....	32
Çizelge 2.2. Total antioksidan kapasite (TAS) ölçümü.....	33
Çizelge 2.3. Genlerin primer dizilimleri (5' - 3').....	35
Çizelge 3.1. Embelinin vücut ve karaciğer ağırlığı üzerine etkisi.....	37
Çizelge 3.2. Embelinin karaciğer fonksiyon düzeyleri üzerine etkileri.....	38
Çizelge 3.3. Embelinin lipid profili düzeyleri üzerine etkileri.....	39
Çizelge 3.4. Deney gruplarında embelinin histopatolojik bulgular üzerine etkisi..	46

1. GİRİŞ

Nitrozaminler, nitritin birincil, ikincil veya üçüncül amin öncüleri ile yüksek sıcaklık veya asidik ortam gibi dış çevresel koşullar yoluyla reaksiyonundan oluşan büyük bir kimyasal bileşik grubudur. Uzun yıllardır bu kimyasal bileşiklerin potansiyel olarak karsinojen olduğu bilinmektedir (Uemura vd., 1980). DNA yapısında değişikliklere ve karaciğer hasarının başlamasına ve ilerlemesine neden olurlar (Mansour vd., 2019). Dietilnitrozamin (DEN), insanlarda olduğu kadar deney hayvanlarında da iyi bilinen hepatokarsinojenik ve hepatotoksik nitrozamin grubuna ait bir ajandır (Arboatti vd., 2018). Kozmetiklerde, farmasötik maddelerde, suda, tütün dumanında, zirai kimyasallarda ve tütsülenmiş ve kızartılmış yemeklerde bulunmaktadır (Dar vd., 2019). DEN, karaciğer, deri, mide, akciğer ve kan gibi çok sayıda organ ve doku üzerine karsinojen aktivite sergileyen kimyasal bir bileşiktir. DEN, deney hayvanlarında deneysel tümör uyarmak için karsinojen bir ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. DEN, esas olarak kemirgen hepatokarsinogenezinin başlangıç maddesi (inisiyatör) olarak kullanılır (You vd., 2021). Bu kimyasalın DNA onarımını gerçekleştiren enzimlere zarar verdiği ve dolayısıyla bu enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir. Mutajenik DNA oluşumuna yol açan reaktif metabolitlerin ve reaktif oksijen türlerin (ROS) üretilmesine neden olarak hücrenin mitokondriyal metabolizmasını etkiler (Gupta vd. 2010). Oksidatif strese neden olabilen bu ajan deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılmaktadırlar (Fuentes-Hernández vd., 2019). Bilindiği üzere oksidatif stres ve inflamasyon karsinogenezin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Ahmed, 2016).

Embelin (2,5-dihidroksi-3-undesil-1,4-benzokinon), *Embelia ribes* (yalancı karabiber) bitkisinin kurutulmuş meyvelerinden doğal olarak oluşan ve buradan izole edilebilen bir para- benzokinondur (Poojari, 2014; Radhakrishnan ve Gnanamani, 2014). Embelin antioksidan, antitümöral, antiinflamatuvar, analjezik, antelmantik ve antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra infertilite dahil geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir (Lu vd., 2016; Chen vd., 2020; Sheng vd., 2020).

Bu çalışmanın amacı, DEN verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda embelin uygulamasının biyokimyasal ve histopatolojik parametreler ile sonic hedgehog sinyal

yolağının karaciğer dokusundaki gen ekspresyon düzeylerinin inflamatuvar ve apoptotik süreçler üzerindeki olası etkilerinin aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır.

1.1. Nitrozaminler

Nitrozaminler, gıda, içme suyu, kozmetik ve tütün dumanında yaygın olarak bulunan insanlarda ve hayvanlarda güçlü mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkilere sahip N-nitrozo bileşikleridir (Cooney vd., 1987; Morselli, 1995).

1.1.1. Tarihçesi

Nitröz asidin birincil aromatik aminlerle kimyasal etkileşimi ilk olarak 1864 yılında tanımlanmıştır (Griess, 1864). Nitrozamin terimi ilk olarak 1878 yılında kullanılmıştır (Witt, 1878). N-nitrozodimetilamin'e maruz kalan hayvanlarda malign primer hepatik tümör gelişimi 1956'da gözlemlenmiş olup (Magee ve Barnes, 1956), bu gözlem, N-nitrozaminlerin karsinojenitesi ve toksisitesi hakkında geniş bir literatürün gelişmesini sağlamıştır. İlk olarak 1970 yılında nitrozaminlerin çevresel karsinojenler olarak rolleri belirlenmiş (Lijinsky ve Epstein, 1970) ve çeşitli su kaynakları ve kanalizasyon gibi çevresel ortamlarda N-nitrozamin oluşumuna ilişkin araştırmalar artmıştır (Schreiber ve Mitch, 2006; Zeng ve Mitch 2015; Gushgari vd., 2017). Günümüzde N-nitrozaminler üzerine yapılan çalışmalar, temel olarak, farklı kaynaklardaki N-nitrozamin miktarının belirlenmesi, hayvan modellerinde karsinojenik etkisinin değerlendirilmesi ve spesifik olarak "N-nitrozamin-hücre etkileşimi" üzerinden neoplastik potansiyelinin belirlenmesi ile ilgili araştırmaları içermektedir (Maduagwu ve Bassir, 1980; Stoner ve Shimkin, 1982; Tricker ve Presussmann, 1991; Jain vd., 2020).

1.1.2. Nitrozaminlerin Özellikleri

Nitrozaminlerin, absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonları hakkında bilgiler sınırlıdır. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda mide-bağırsak kanalından kolaylıkla emildikleri ve biyolojik yarılanma ömürlerinin 24 saatten az olduğu görülmüştür. Nitrozaminlerin küçük bir kısmı metabolize olmadan atılır (Cooney vd.,

1987; Morselli, 1995). Nitrozaminler genellikle suda çözünen polar bileşiklerdir. Oktanol (yağ) ve su arasındaki dağılımını düşüktür ve bu nedenle bileşiklerin organik çözücülerle özütlenmesi zordur. Bileşikler ayrıca polar olmayan yüzeylerde önemli ölçüde adsorbe edilmezler. Henry sabitleri küçüktür, bu da nitrozaminlerin havalandırma ile sudan ayrıştırılamayacağı anlamına gelir. Nitrozaminlerin yüksek hidrofilikliği, düşük adsorbe edilebilirliği ve dayanıklılık özellikleri, yeraltı suyu kirlenmesi için büyük bir sebeptir (Nawrocki ve Andrzejewski, 2011).

1.1.3. Nitrozaminlerin Sınıflandırılması

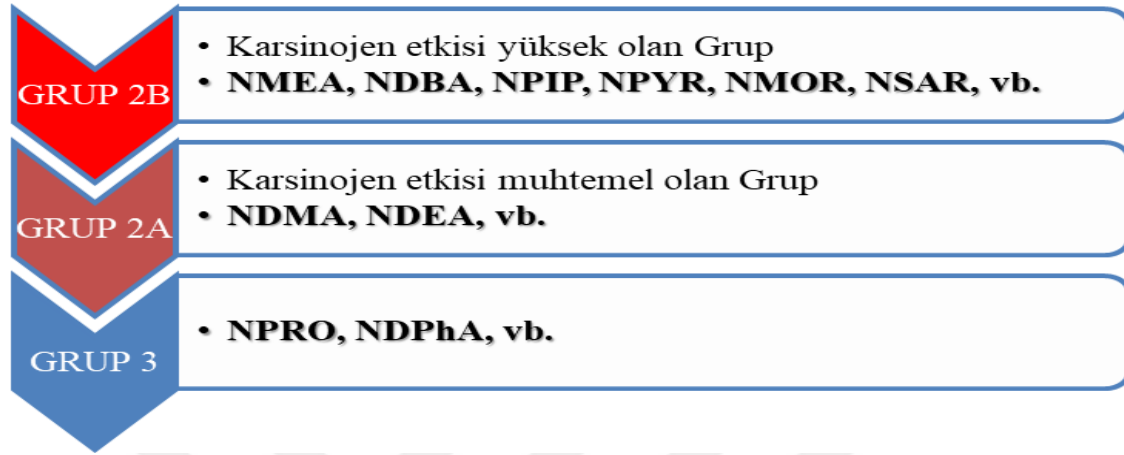
N-nitrozo bileşenleri, nitrozaminler ve nitrozamid tip bileşenler olarak temelde iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu iki grup bileşen, kimyasal oluşumları ve biyolojik etkinlikleri açısından farklılıklar göstermektedir. Nitrozaminlerin aksine, nitrozamidler metabolik aktivasyon gerektirmez, ancak sulu ortamda kendiliğinden ayrışır, diazonyum iyonları ve son olarak alkilliyici türler olarak karbenyum iyonları oluşturur. Nitrozamidler arasında en uygun sınıf, temel araştırmalarda kullanılan yüksek mutajenik bileşiklerin yanı sıra antitömöral tedavide kullanılan çoklu bileşikler içeren N-nitrozoüredir (Fahrer ve Christmann, 2023).

Çeşitli bileşenlerde yaklaşık 300 nitrozamin türü olduğu bilindiğinden bu N-nitrozo bileşikler nitrozaminler olarak da adlandırılır (Tricker ve Presussmann, 1991; Frabouleta vd., 2016) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1: Nitrozamin tipleri (Frabouleta vd., 2016)

Nitrozaminler	Formül	Moleküler ağırlık (g/mol)
N-nitrozodimetilamin (NDMA)	$C_2H_6N_2O$	74.082
N-nitrozometiletilamin (NMEA)	$C_3H_8N_2O$	88.108
N-nitrozodietilamin (NDEA)	$C_4H_{10}N_2O$	102.135
N-nitrozo-di-n-propilamin (NDPA)	$C_6H_{14}N_2O$	130.188
N-nitrozo-di-n-bütilamin (NDBA)	$C_8H_{18}N_2O$	158.241
N-nitrozo-di-fenilamin (NDPhA)	$C_{12}H_{10}N_2O$	198.221
N-nitrozopirrolidin (NPYR)	$C_4H_8N_2O$	100.1
N-nitrozopiperidin (NPIP)	$C_5H_{10}N_2O$	114.15
N-nitrozomorfolin (NMOR)	$C_4H_8N_2O_2$	116.12

Nitrozaminlerin 20'den fazlası Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insanlarda kanserojen etkilerine göre Grup 2A ve Grup 2B nitrozaminler olarak değerlendirilmiştir (IARC 2007) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: IARC'den N-Nitrozo bileşiklerinin sınıflandırılması (IARC 2007'den uyarlanmıştır).

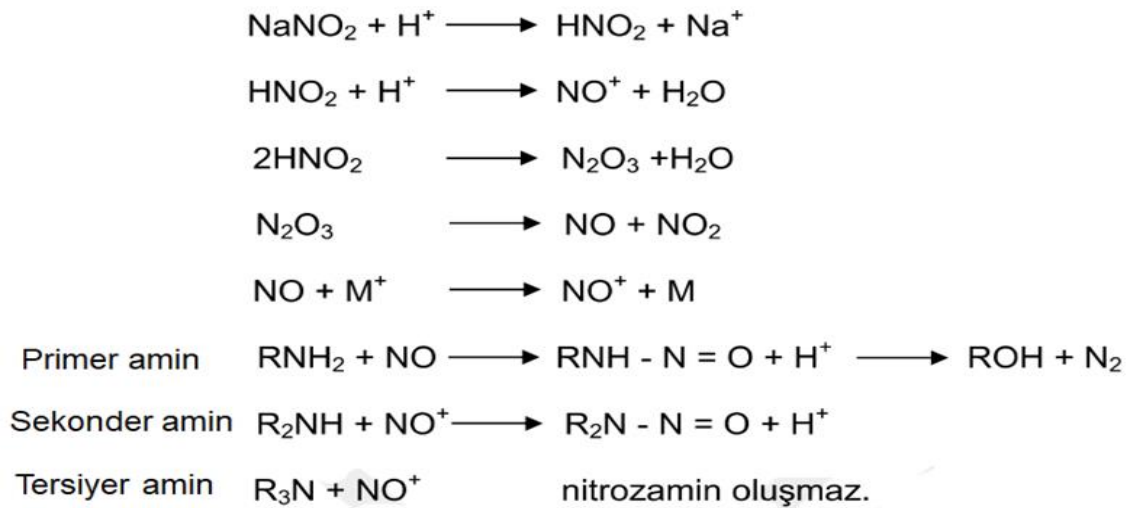
Nitrozaminler çevrede yaygındır, su, hava ve gıda dahil olmak üzere çok sayıda kaynaktan bulunur. Örneğin tütün dumanında ve endüstriyel işlemler sırasında ortaya çıkar. Gıda ürünleri (salam, sosis, kürlenmiş et ürünleri, tavuk, balık ve balık ürünleri, peynir, bira, bitkisel yağlar, margarin), kozmetik ürünleri, ilaç hammaddeleri (antihistaminikler, tetrasiklin, oksitetrasiklin, aminopirin, vb), toprak, yer altı suları ve pestisitlerde, nitrozaminler yaygın olarak bulunur (Lijinsky vd., 1972; Tricker ve Preussmann, 1991; Yılmaz vd., 2008; Belitz vd., 2009). Nitrozaminlerin bulunduğu ortama göre değişen ve uzun olan yarılanma ömürleri tehlikeyi artırmaktadır (EPA 2016) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2: Nitrozaminlerin bulunduğu alandaki yarılanma ömürleri (EPA 2016)

Nitrozaminler	Suda	Toprakta	Havada	Sedimentte
N-nitrozo-di-n-bütilamin (NDBA)	15 gün	30 gün	0,58 gün	140 gün
N-nitrozodietilamin (NDEA)	38 gün	75 gün	0,92 gün	340 gün
N-nitrozodimetilamin (NDMA)	38 gün	75 gün	6,2 gün	340 gün
N-nitrozo-di-n-propilamin (NDPA)	38 gün	75 gün	0,67 gün	340 gün
N-nitrozometilamin (NMEA)	38 gün	75 gün	1,6 gün	340 gün
N-nitrozopirrolidin (NPYR)	38 gün	75 gün	1 gün	340 gün

1.1.4. Nitrozaminlerin Oluşumu

Nitrozaminler, $R_1R_2N-N=O$ (R = aril veya alkil grubu) kimyasal yapısına sahip bileşiklerdir. Alkilleyici ajanlar oluşturmak için metabolik aktivasyon gerektiren, hayvanlarda ve büyük olasılıkla insanlarda karsinojenik etkiye sahip maddelerdir. Çevrede bulunan çoğu alkilleyici ajan nitrozamin sınıfına aittir. Nitrozaminler, nitritin bir asit ortamında birincil, ikincil veya üçüncül aminlerle reaksiyonundan oluşur. Endojen olarak ortaya çıkabildikleri gibi mide ve bağırsaktaki bakterilerin, yutulan gıdalardan türetilen çeşitli ikincil aminlerin nitrozasyonunu katalizasyonu sonucunda da nitrozaminlerin oluştuğu bilinmektedir (Rostkowska vd., 1998; Turp ve Sucu, 2016; Fahrer ve Christmann, 2023) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Nitrozamin oluşumu (Rostkowska vd., 1998; Turp ve Sucu, 2016).

Organik moleküllere, özellikle tiyollere (S-NO) veya aminlere (N-NO) bir nitrosonyum iyonu (NO) eklenerek oluşan nitrozasyon işlemi, organik kimyasalların N-veya S-nitroso türevlerine, yani R-NO grubunu içeren bileşiklere dönüştürülmesini içerir. Nitrit ve birincil aminler ($R-NH^{+2}$) etkileşime girdiğinde, son derece kararsız olan N-nitrozaminler üretilir. N-nitrozamin üretimi nötr veya bazik pH'ta bile meydana gelebilirken, asidik pH'ta hem N-nitrozasyon hem de S-nitrozasyon işlemleri meydana gelebilir (Bryan vd., 2012). Nitrik oksit sentazlar tarafından üretilen endojen nitrik oksidin reaksiyon ürünleri, endojen nitrozamin üretimini sağlar (Lundberg vd., 2013).

1.1.5. Endojen ve Ekzojen Nitrat-Nitrit-Nitrozaminlerin Metabolizması

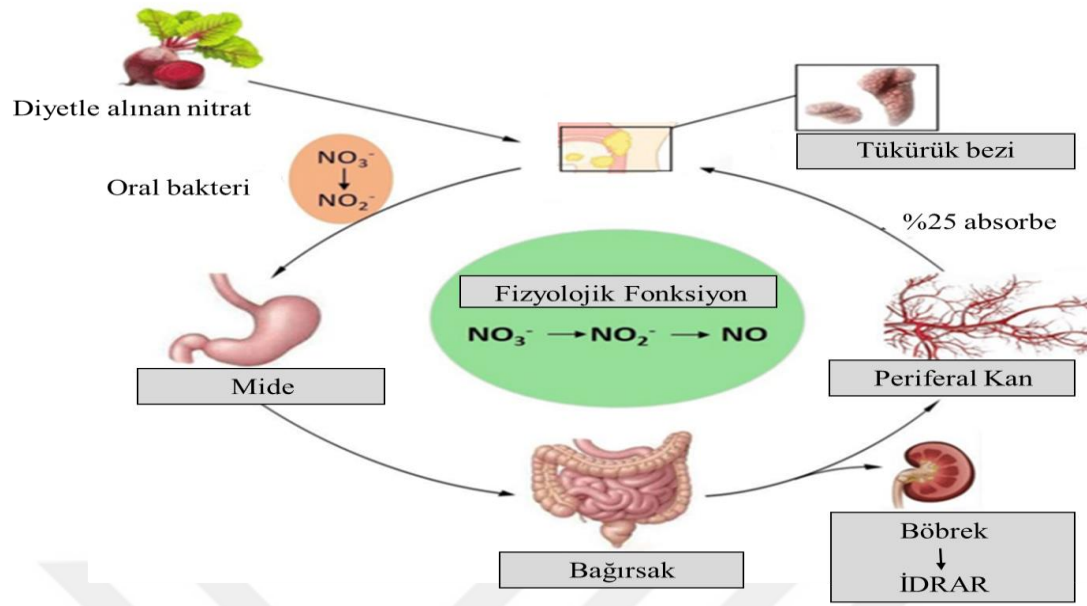
Azotun doğada dolaşımı, dünyadaki yaşam için bir ön koşuldur. Bitkiler ve memeliler atmosferik azotu kullanırken, nitrat ve nitrit bu döngüde temel araçlar olarak oluşturulur. Bu anyonların nitrozamin oluşturma eğilimi nedeniyle neoplastik gelişim ile olan ilişkileri ön plana çıkmaktadır. Hem eksojen nitrozasyon aktivitesi hem de bu döngünün endojen üretimi insanlar üzerinde etkiye sahiptir (Weitzberg ve Lundberg, 2013).

Nitratlar asidik koşullarda kararsızdır ve bu nedenle kendiliğinden nitritlere ve nitrojen dioksit'e ayrışır. Bu nedenle, nitrat metabolizmasından kaynaklanan nitritlerin yanı sıra gıda ile verilenler ayrıca gastrointestinal sistemde N-nitroso bileşiklerinin (aminler ve amidler gibi) öncülleri ile reaksiyona girebilir ve N-nitroso bileşiklerinin oluşumuna neden olabilir (Ohshima ve Bartsch, 1981). Nitritlerin ikincil aminlerle reaksiyonu, karsinojen nitrozaminlerin oluşumuna yol açtığı için özellikle tehlikeli olarak kabul edilir. Nitritli birincil aminler, yalnızca hemen alkol ve nitrojene indirgenen kararsız nitrozaminler oluştururken, üçüncül aminler nitritlerle reaksiyona girmez (Doel vd., 2005). Endojen nitrozasyonun, N-nitroso bileşiklerine toplam insan maruziyetinin %45-75'inin oluşumuna yol açtığı tahmin edilmektedir (Tricker, 1997). Organizmada nitrozamin oluşumu ortamdaki nitrit konsantrasyonuna ve pH değerine (3-7) bağlıdır. Ayrıca bakteriler, sıcaklıkta (100-185°C) nitrozamin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Özçelik, 1982). Ek olarak, midede düşük pH ve demir varlığı (mide özsuyu önemli miktarda demir içerir) nitrozasyon sürecini önemli ölçüde artıran faktörlerdir (Palamutoğlu ve Sarıçoban, 2012; De La Pomélie vd., 2017). Ortamın pH'ına ve bakterilerin aktivitesine bağlı olarak nitrozaminler mide dışında, ağız boşluğunda, bağırsaklarda, enfekte tümörde ve pankreasta üretilir. Bununla birlikte ortamdaki iyonlar ve diğer bileşikler nitrozaminlerin oluşumunu etkiler. Demir iyonları ve tiyosiyanat bu oluşumu katalize ederken, askorbik asit, laktik asit, tokoferol gibi bileşikler, C ve E vitaminleri nitrozaminlerin oluşumunu azalttığı rapor edilmiştir (Bartsch vd., 1993; Bayraktar vd., 1998; Lunn vd., 2007).

Normal koşullar altında, nitrat iyonu toksik değildir. Bununla birlikte, diyetteki nitratın %5-20'si, gastrointestinal sistemdeki anaerobik bakteriler tarafından daha

tehlikeli nitrit formuna dönüştürülür. Nitrat-nitrit-nitrik oksit yolunda, diyet ve tükürük nitratları kısmen nitritlere dönüştürülür ve bunlar daha sonra fizyolojik olarak aktif nitrojen oksitlere dönüştürülür. Aynı zamanda endojen nitritin ana kaynağı olan diyet nitratlarının yaklaşık %5-7'si ve tükürük nitratlarının %20'si, kommensal bakteriler tarafından ağız boşluğunda nitritlere indirgenir. Nitratlar, dilin arkasında bulunabilen oral bakteri suşları tarafından üretilen nitrat redüktaz enzimleri (NOS) tarafından nitritlere dönüştürülür. Çeşitli enzimatik (deoksihemoglobin, miyoglobin, nöroglobin, ksantin oksidoredüktaz, aldehit oksidaz, karbonik oksidaz ve mitokondriyal enzimler) ve enzimatik olmayan (pH) yollar, oral tüketimden sonra diyetdeki nitratları ve nitritleri midede nitrik oksit ve diğer aktif nitrojen oksitlere dönüştürür (Karwowska ve Kononiuk, 2020). Tükürük bezinde üretilen nitrit mide lümenine girdiğinde, hemen nitroz asit (HNO_2) haline gelmek üzere protonlanır. Nitroz asidin kendiliğinden parçalanması sonucu nitrik oksit, azot dioksit (NO_2) ve dinitrojen trioksit (N_2O_3) gibi çeşitli azot oksitler üretilir. Dinitrojen trioksit daha sonra sırasıyla etil nitrit, S-nitrozotioller (S-NO) ve N-nitrozaminler oluşturmak için etanol, tiyoller ve ikincil aminlerle reaksiyona girer (Weitzberg ve Lundberg, 2013). Bu bileşikler bağırsakta sistemik olarak emildikten sonra kan ve plazmaya girer. Kan ve doku nitrik oksit, nitritler ve nitratları üretmek için kendiliğinden oksitlenebilir. Toplam nitratın yaklaşık %75'i idrarla atılırken, kalan nitrat yeniden emilir ve tükürük bezlerinde konsantre edilir (Şekil 1.3). Tükürük bezi nitrat konsantrasyonları plazma seviyelerinden 10-20 kat daha fazladır (Bedale vd., 2016; Ma vd., 2018; Karwowska ve Kononiuk, 2020).

Sonuç olarak, sindirim sisteminin başlangıcı olan ağız nitrozaminin ilk oluşum yeridir. Diyetle alınan nitrat ve nitritlerin bir kısmı mide asidi ile temas ettiğinde ikincil aminler gibi bazı amin türlerinin varlığında nitrozaminler oluştururlar. İnce bağırsakta artık nitrit ve nitrat emilir ve kan dolaşımına girer. Tükürük bezleri kanda dolaşan nitratın yaklaşık % 25'ini aktif olarak emer ve ağız boşluğundaki mikroorganizmalar daha sonra bu nitratı nitrite dönüştürür. Kalan nitratın çoğu idrarla (Şekil 1.3) atılır (Bedale vd., 2016; Ma vd., 2018).



Şekil 1.3: Vücuttaki nitrit, nitrik oksit metabolizması (Ma vd., 2018).

1.1.6. Gıdalarda Kontaminant Olarak Nitrozaminler

Nitratlar ve nitritler çevrede yaygındır ve azot döngüsünün bir parçası olarak bitki kaynaklı gıdalarda doğal olarak bulunur. Ek olarak, bu bileşikler, gıda kalitesini iyileştirmek ve mikrobiyal kontaminasyona ve kimyasal değişikliklere karşı koruma sağlamak için katkı maddesi olarak kullanılır (Karwowska ve Kononiuk, 2020). Gıdalarda kullanılan koruyucu maddeler, depolama koşulları, mikrobiyolojik aktivite, pişirilme şekilleri, gıda ürünündeki nitrit miktarı, gıdanın kalitesi, yağı, kurutma ve tutsüleme sırasında kullanılan ısıtma işlem ve toplama türü gıdalarda N-nitrozo bileşiklerinin oluşmasında etkili olan faktörlerdir (Herrmann vd., 2015; Ünlü ve Bayır, 2022).

Eksojen N-nitrozaminin birincil kaynakları, endojen N-nitrozamin üretiminin yanı sıra, salamura ve tuzlanmış konserve yiyecekleri, tutsülenmiş konserve yiyecekleri, malt ilaveli içecekleri ve kürlenmiş et ürünlerini içerir (Tricker ve Preussmann, 1991). En büyük nitrat miktarı, nitrat bakımından zengin bir ortamda yetişen bitkilerde birikir (Griesenbeck vd., 2009). Nitratın diyet alımının en önemli kaynakları sebze ve meyvedir (EFSA 2008). Araştırmalar, yapraklı sebzelerin tohumlara veya yumru köklere kıyasla daha yüksek nitrat seviyelerine sahip olma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, roka, marul ve ıspanak en yüksek nitrat içeriğine sahiptir. Pancar ve kereviz de

önemli miktarda nitrat içeren sebzelere örnektir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO 2016) göre, insanlar genellikle günde 1,2 ile 3,0 mg nitrit tüketir. Nuñez de González vd.'nin (2015) yapmış oldukları araştırmaya göre, insanların nitratlara maruz kalmasının yaklaşık %80-85'inin sebze kaynaklı olduğu gösterilmiştir. Bu bileşikler tüketildiğinde, yaklaşık %60-70'i kolayca emilir ve hızla idrarla atılır. İnsanlarda nitratın yaklaşık %3'ü idrarda üre ve amonyak olarak görülür. Nitratlar ayrıca mideden geçişte bozulmadan kalabilir ve dolaşım sistemine girebilir. Asidik mide koşullarında veya kan ve dokularda çeşitli yüksek biyoaktif reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bunlar, midede ikincil aminler bulunduğu toksikolojik öneme sahip nitrozaminlerin üretilmesinde rol oynayabilir (Ding vd., 2018).

Bitkilerde nitrat birikimini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Genel olarak, gübre uygulamaları, nitrat redüktaz aktivitesi, büyüme hızı ve ışık yoğunluğu, yağış seviyesi dahil olmak üzere büyüme koşulları gibi faktörler sebzelerdeki nitrat içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir (Hord vd., 2009). Buna bağlı olarak, tüketilen toplam nitrozamin miktarı ve bununla ilişkili risk, artan diyet alımının bir sonucu olarak artar ve bu da atılım seviyesini yükseltir (Lin vd., 2002). Nitrit ve nitrat içeren fermente soslar tüketildikten sonra mide sindirimi sırasında nitrozamin miktarı artmaktadır. Nitrozil metmiyogloblin ve nitrosotiolinlerin dengesizliği, midede nitrosonyum iyonlarının konsantrasyonunda artışa yol açabilir. Proteoliz sindirim sırasında gerçekleştiğinden, ikincil amin biyoyararlanımı da artar. Sonuç olarak, reaksiyonun reaktiflerindeki bir artış, endojen N-nitrozasyonu artırabilir (Keuleyan vd., 2022). Tükürük ve idrar örneklerini de inceleyen bir araştırmaya göre, gıda ve sudaki nitrozamin miktarını azaltmak, nitrozaminlere maruz kalmanın yanı sıra olası riskleri de azaltabilir. Aksi takdirde her gün tüketilen kronik nitrozamin miktarı arttıkça tümör gelişme riski daha yüksek olacaktır (Moazeni vd., 2020). Nitrit alımının artması ile pankreas kansinomu riski azalırken, glioma, mesane ve mide kansinomu riski artmaktadır. Tiroid kansinomu riskinin artması, yüksek nitrat alımı ile ilişkilendirilmiştir (Said Abasse vd., 2022). Ayrıca, işlenmiş sığır eti yemek ile tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık geliştirme riski arasında pozitif bir ilişki vardır (Feskens vd., 2013). Vaka kontrol çalışmalarının çoğuna göre, işlenmiş et alımı yemek borusu ve mide kansinomu gelişme riskini artırırken, et, işlenmiş et ve tütülenmiş yemek alımı mide kansinomu gelişme riskini artırır (Jakszyn ve Gonzalez, 2006).

1.1.7. İçme Sularında Kontaminant Olarak Nitrozaminler

Nitrozaminler normal koşullar altında gıda veya suda oldukça kararlıdır, suda çözünür, oksidasyona, biyolojik bozunmaya ve adsorpsiyona karşı oldukça dirençlidir. Nitrozaminler, yüzey ve yeraltı sularında, atık su arıtma tesisi girişlerinde ve atık sularında ve ayrıca içme sularında bulunmuştur. İçme suyunda dezenfeksiyon yan ürünleri olarak çeşitli uçucu nitrozaminler tanımlanmıştır. İyi bilinen nitrozamin öncüleri arasında gıdalardaki ve sudaki aminlerin yanı sıra su ürünlerindeki trimetilamin bulunurken, nitroza edici maddeler arasında nitritler ve kloraminler bulunur (WHO 2011). Bu nedenle nitrozaminler, su endüstrisinde dezenfeksiyon yan ürünleri (WHO 2011) ve gıda endüstrisinde işleme yan ürünleri (Zhu, 2015) olarak kabul edilmektedir. İçme suyundaki patojenlerle mücadele etmek için iki açıdan çaba gösterilmesi gerekmektedir. Birincisi, su arıtımı sırasında patojenik mikroorganizmaların inaktivasyonu için gerekli olan etkili dezenfeksiyondur. Günümüzde, klorlama en yaygın dezenfeksiyon seçeneğidir. İkincisi, bitmiş suda istenmeyen mikropların yeniden çoğalmasını önlemek için bir su dağıtım sisteminde yeterli dezenfektan (klor) kalıntısının muhafaza edilmesi gerekliliğidir (Sharma vd., 2017). Yaygın dezenfeksiyon yan ürünlerini kontrol etmek ve musluk suyundaki klor seviyelerini korumak amacıyla bazı ülkelerde dezenfeksiyon için klor yerine kloramin kullanılır. Doğrudan kloramin ilavesine ek olarak, bazı kuyular gübre ve kanalizasyondan kaynaklanan kirlenme nedeniyle yüksek miktarda amonyak içerir. Bu durumda; klorun dezenfektan olarak kullanılması kloramin oluşumuna yol açar (Zhang vd., 2016). Bununla birlikte, serbest klor, ozon, klor dioksit ve kloraminler gibi birçok dezenfektan, potansiyel olarak farklı su matrisi bileşenleriyle, antropojenik kirleticiler, bromür ve iyodür ile reaksiyona girerek sitotoksik, genotoksik ve/veya karsinojen olan istenmeyen dezenfeksiyon yan ürünleri üretebilir (Ding vd., 2019).

Nitrozamin dezenfeksiyon yan ürünleri konsantrasyonları içme suyunda izin verilen sınırları çok aşmaktadır ve uzun süreli maruz kalma, tümör başlangıcı ve ilerlemesinde önemli olan metabolik bozukluklara neden olma potansiyeline sahiptir. Nitrozamin dezenfeksiyon yan ürünleri kronik inflamasyonu indükleyebilir ve sfingolipid ve çoklu doymamış yağ asidi metabolizmasını aktive ederek tümör oluşumunu

başlatabilir. Aminoasit ve nükleotid metabolizması ile ilgili olarak, nitrozamin dezenfeksiyon yan ürünleri triptofan metabolizmasını ve *de novo* nükleotid sentezini inhibe edebilir. Ayrıca, *de novo* nükleotid sentezinin inhibisyonu, nitrozaminlerin neden olduğunda DNA hasarını onaramaz (Sun vd., 2024). Tarım alanlarında yaşayan popülasyonlar tipik olarak nitratla kirlenmiş içme suyuna en yüksek maruziyete sahiptir. İçme suyundan alınan nitratın sağlık üzerinde zararlı etkileri olabileceği üç temel mekanizma vardır. Birincisi, methemoglobinin oluştuğu mekanizma ile ilgilidir, böylece kanın oksijen taşıma kapasitesini inhibe eder. Vücutta, oral bakteriler nitratı nitrite dönüştürür, bu da hemoglobine bağlanır. İkinci mekanizma, hayvan çalışmalarında güçlü karsinojenler ve teratojenler olan N-nitrozo bileşiklerinin endojen oluşumunu içerir. Nitratın indirgenmiş formu olan nitrit, asidik midede reaksiyona girerek çeşitli nitroza edici maddeler oluşturur ve daha sonra proteinlerden veya ilaçlar gibi diğer kaynaklardan gelen aminler ve amidlerle reaksiyona girer ve çoğu güçlü hayvansal karsinojen olan N-nitrozo bileşikleri oluşturur. Son olarak, yüksek dozlarda nitrat, hayvan çalışmalarında gösterildiği gibi, iyot alımını inhibe edebilir ve tiroide hipertrofik değişikliklere neden olabilir (Ward, 2009). Doğu Avrupa'da yapılan son çalışmalarda, yüksek nitrat seviyelerine sahip içme suyu içen çocuklarda, daha düşük nitrat seviyeleri olan bölgelerdeki çocuklara kıyasla tiroid anormallikleri oranlarında artış bulunmuştur (van Maanen vd., 1994; Tajtakova vd., 2006). Nitratın içme yoluyla alınması N-nitrozo bileşiklerinin idrarla atılımını arttırdığını göstermektedir (Mirvish vd., 1992). Son yıllarda kimyasal gübrelerin yoğun kullanımı nedeniyle bu bileşikler endüstriyel kaynaklardan çevreye girerek asitlik düzeyini artırmaktadır. Bu bileşikler toprağa karışarak yağmurla sulara da karışır. Nitratlı gübrelerin ve atık suların sulama amacıyla tekrar kullanılması, bitkilerin kök ve yapraklarında nitrat oluşumuna neden olarak nitrozamin oluşumunu artırır (Gough vd., 1977; Mallik vd., 1981). İçme suyundaki nitrozaminlerin bileşimi ve seviyeleri, su kaynağının özelliklerine, su arıtma prosesine ve dezenfeksiyon türüne bağlıdır (Charrois vd., 2011). İçme suyu teknolojisinde nitrozaminler için dikkate alınması gereken temel strateji, nitrozaminleri sudan uzaklaştırmanın veya oluşumunu önlemenin etkili yollarını bulmaktır. Sudaki nitrozaminleri önlemenin tek yolu, bunların nasıl oluştuğunu anlamak ve suyu mevcut en iyi yöntemlerle arıtarak nitrozamin üretimini azaltmaktır (Nawrocki ve Andrzejewski, 2011).

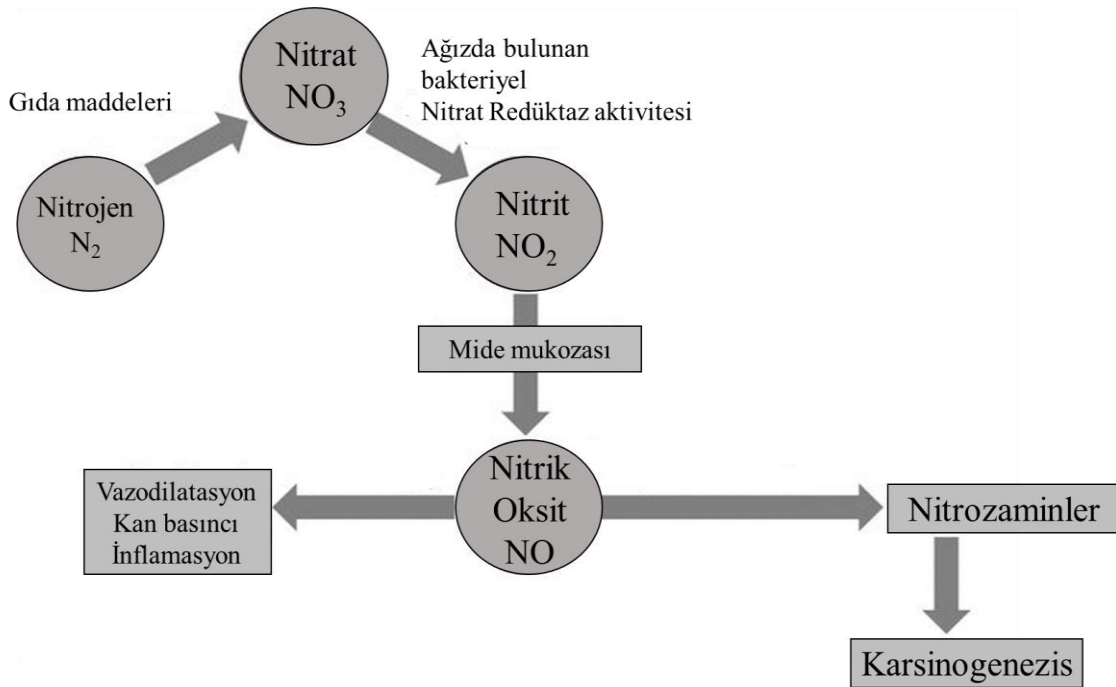
1.1.8. Nitrozaminlerin Etki Mekanizması

Nitrozaminlerin, hepatotoksisite (Sheweita vd., 2017), nörotoksisite (Nishie vd., 1984), immünotoksisite (Spinardi-Barbisan vd., 2004) ve genotoksisite (Brendler vd, 1992) dahil olmak üzere birçok yan etkiye neden olduğu bilinmektedir. Bazı nitrozaminler vücuda farklı yollarla girer, vücutta aktivitesi azalır ve idrarla dışarı atılır. Vücuda gıda yoluyla giren belirli seviyelerdeki nitrozaminlerin insanlarda ve hayvanlarda tümörlere neden olma riski düşüktür. Fakat solunan sigara dumanı ve hava gibi çeşitli kaynaklardan organizmaya alınan ya da endojen oluşan çoğu nitrozamin türleri, tümör gelişme riskini artırmaktadır (Tricker ve Preussmann, 1991). Nitrozaminler, epigenetik veya genomik stabiliteyi değiştirerek (Souliotis vd., 2002), DNA onarımına müdahale ederek (Aiub vd., 2009), reseptör aracılı sinyal yollarını aktive ederek (Fararjeh vd., 2019), immunosupresyona neden olarak (Iwaniuk vd., 2015) ve hücre proliferasyonunu etkileyerek (Chakraborty vd., 2007) tümör oluşumunu indükleyebilir. Nitrozaminlerin aktivasyonu sonucu kendiliğinden oluşan nitrozüreler, doku veya hücrelerin DNA'sı ile etkileşime girerek baz değişikliklerine ve karsinojenezisin başlamasına neden olur (Ajith ve Janardhanan, 2006). Nitrozaminler toksik etkileri; kan, karaciğer, böbrek ve kan akışı yüksek olan diğer organlarda gösterebilirler. Nitrozaminlerin deney hayvanlarına verilmesiyle başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve dokularda (akciğer, böbrek, mesane, özofagus, mide, bağırsak, beyin) tümörlere neden olduğu (Şekil 1.4) birçok çalışmada gösterilmiştir (Vendemiale vd., 2001; Thirunavukkarasu ve Sakthisekaran, 2001; Jain vd., 2020).



Şekil 1.4: N-nitrozo bileşiklerinin neden olduğu farklı tümör türleri (Jain vd., 2020).

Çevrede yaygın olarak bulunan nitrozaminler güneşte yıkımlanmaktadır. Ancak nitrat ve nitrit bileşikleri ile vücuda alındığında tümör için risk faktörüdür (Mirvish 1995; Aiub vd., 2003). Nitrat, midede nitrite dönüşür. Nitrit ise mide mukozasında nitrik oksit aracılığıyla nitrozaminleri oluşturarak çeşitli dokularda karsinogeneze (Şekil 1.5) neden olur (Gangolli vd., 1994; Prasad ve Chetty, 2008). Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, oral yoldan nitrit alımında ratlarda öldürücü doz-50 (LD₅₀)'nin 100–200 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Lundberg vd., 2011).

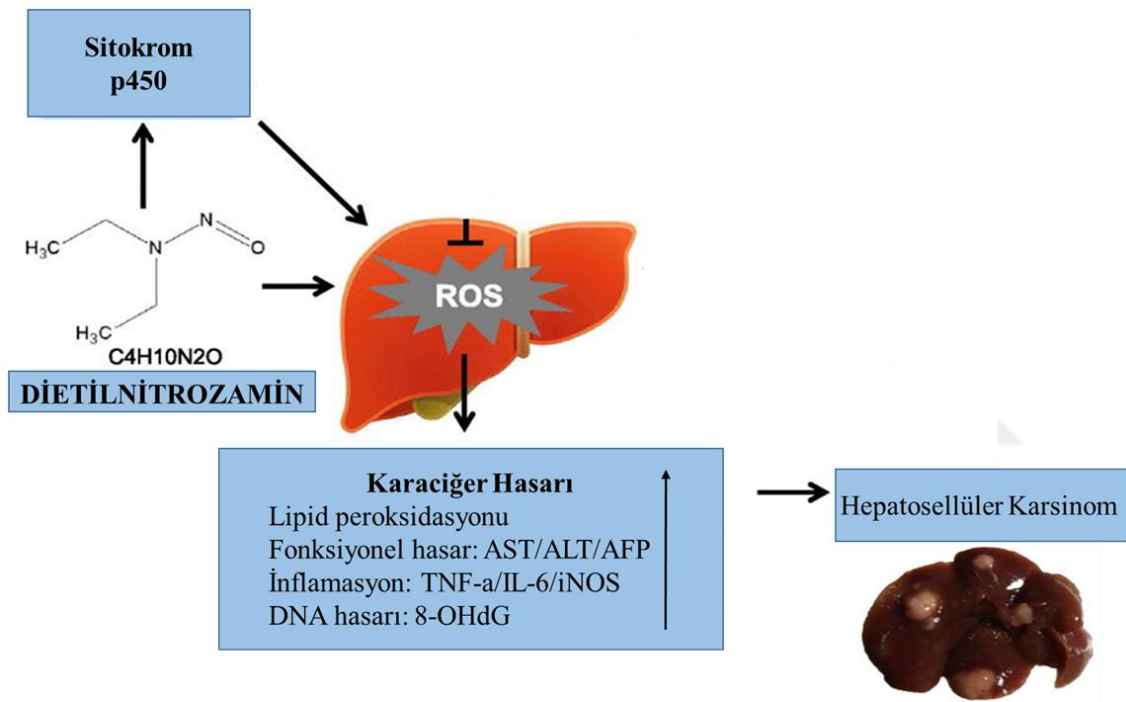


Şekil 1.5: Nitrozaminlerden tümör oluşum mekanizması (Gangolli vd., 1994).

1.1.9. Dietilnitrozamin (DEN)

Molekül ağırlığı 102,14 g/mol olan dietilnitrozamin (DEN - C₂H₅)₂NNO) su, lipidler ve çeşitli organik çözücülerde çözünebilen kimyasal bir maddedir (Kumar vd., 2017). Dejeneratif, proliferatif ve neoplastik karaciğer lezyonlarına sebep olan DEN, tümör indükleyici olarak deneysel hayvan modellerinde ve tümör araştırmalarında kullanılmaktadır. Biyolojik aktivasyonu sitokrom P-450 tarafından sağlanan ve aktive olan DEN, ROS'un yükselmesine neden olur. ROS'taki bu artış DNA modifikasyonu, mitokondrial hasar ve lipid peroksidasyonuna yol açarak inflamasyon, oksidatif stres ve hücre hasarına neden olmakta ve tümör gibi birçok hastalığın oluşumunu tetiklemektedir.

(Mitsumori vd., 1997). Bunun yanında DEN verilmesinden 6 saat sonra karaciğer dokusunda yükselen 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin DNA'da oksidatif hasara (Şekil 1.6) neden olduğu gösterilmiştir (Yamada vd., 2006; Yu vd., 2020). Birçok sitokin ve büyüme faktörü DEN etkisi ile salgılanır ve bunlar, DEN mutasyonlarının çoğalmasını engelleyen dinlenme halindeki hepatositleri uyarır. Bu süreç genetik değişiklikleri yeni kuşak hücrelere aktarabilir. Bunu karaciğerdeki neoplastik sürecin devamı, büyüme artışı, displazi, hepatik adenomu ve hepatik karsinomaya dönüşüm izler (Kang vd., 2007).



Şekil 1.6: DEN'e bağlı oluşan karaciğer hasarı (Yu vd., 2020).

Karaciğer dışında DEN, özofagusda tümörlere sebep olurken (EPA 2016) aynı zamanda karaciğer ve böbrek enzimlerine olumsuz etkileyerek (Bansal vd., 2000), kanda kolesterol seviyesini yükseltme gibi sağlık sorunları da meydana getirmektedir (Tang vd., 1992). Dietilnitrozamin'in aynı zamanda mutajenik ve genotoksik etkileri de bulunmaktadır (Donovan ve Smith, 2008). Dietilnitrozamin için kabul edilebilir alım dozu 26,5 ng/gün olarak bildirilmiştir (WHO 2019).

1.2. Embelin

1.2.1. Embelia Ribes'in Biyolojik Özellikleri

Embelin (2,5-dihidroksi-3-undesil-1,4-benzokinon), Myrsinaceae familyasına ait olan *Embelia ribes* Burm (yalancı karabiber) bitkisinin kurutulmuş meyvelerinden izole edilen, doğal olarak oluşan bir para- benzokinondur (Lu vd., 2016; Sheng vd., 2020). Embelin, *Embelia ribes*'in bitkisinin meyveleri, meyve kabukları, kök kabuğu, gövde kabuğu, tohumları ve yaprakları (Şekil 1.7) dahil olmak üzere tüm kısımlarından elde edilen önemli bir bileşendir (Ferreria ve Laddha, 2013; Rondevaldova vd., 2015; Sharma vd., 2022). Embelin, insan sağlığı için faydaları olan bitki kaynaklı bir bileşik olup, fenolik lipidlerden biridir. Fenolik lipidler, esas olarak bitkiler tarafından sentezlenen ancak hayvanlar, mantarlar ve bakteriler tarafından hem normal gelişim sırasında hem de enfeksiyon, yaralanma ve UV radyasyonu gibi stres koşullarına yanıt olarak sentezlenen ikincil metabolitlerdir (Kozubek ve Tyman, 1999). Embelin, *Lysimachia punctata* (Primulaceae) ve *Oxalis erythrorhiza* (Oxalidaceae) gibi diğer bitkilerden de elde edilir (Feresin vd., 2003; Podolak vd., 2005; Podolak ve Strzałka, 2008). Uzun süredir *Embelia ribes*, Hindistan'da şifalı bir bitki olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkinin tamamı inflamasyon, romatizma, ateş ve çeşitli deri hastalıklarının tedavisinde anti-inflamatuar ve antinosiseptif (ağrı eşişini artırıcı) olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında yılan ve böcek sokmalarına karşı da etkili olduğu bilinmektedir (Narayanaswamy ve Gnanamani, 2014). *Embelia ribes*'in parlak turuncu meyveleri, merkezi sinir sistemi bozukluklarının tedavisinde etkilidir ve çeşitli sindirim problemlerine karşı kullanılabilir ve ayrıca, gaz giderici, antelmintik, kontraseptif ve müshil etkileri de vardır. Bitki bronşit, mental hastalıklar, nefes darlığı, kalp hastalıkları, idrar akıntıları, sarılık, hemikrania (baş ağrısı bozukluğu), yara ve tümörleri tedavi etmek için kullanılır. *Embelia ribes* meyvelerinin etil asetat ekstraktının da potansiyel bir anti-viral ajan olduğu kanıtlanmıştır (Hossan vd., 2018). *Embelia ribes* meyvesinin ayrıca tip 2 diyabetik farelerde glikoz ve lipid metabolizmasını düzenlediği, insülin duyarlılığını artırdığı, kan basıncını ve lipid peroksidasyonunu baskılayarak böbrek hasarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Chaudhari vd., 2013). *Embelia ribes* meyvelerinin etanolik özütünün oral yoldan verilmesinin, alloksan kaynaklı diyabetik farelerde kan şekeri seviyesini düşürdüğü

(Purohit vd., 2008) ve diyabetik ratlarla karşılaştırıldığında hayvanlarda kan şekeri, glikolize hemoglobin (HbA1c), kalp hızı ve sistolik kan basıncı düzeylerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Bhandari vd., 2008). Bitkinin yaprakları ise yatıştırıcı, büzüştürücü ve antitoksik özellikleri ile kaşıntı, boğaz ağrısı, ağız aftları, ağrısız ülserleri, deri hastalıkları ve cüzzam tedavisinde kullanılır. Tohumları, anti-bakteriyel ve anti-tüberküloz özelliklere sahiptir. Köklerinin kaynatılması, influenza ve mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Varier, 2006; Harish, 2012).



Şekil 1.7: Embelia ribes (Sharma vd., 2022).

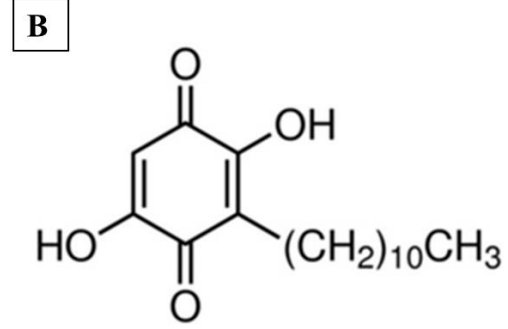
1.2.2. Embelinin Kimyası

Embelinin moleküler formülü $C_{17}H_{26}O_4$ (Şekil 1.8) moleküler ağırlığı 294,183 g/mol ve erime noktası yaklaşık 142–143°C'dir. Embelin, alkil zincirinden oluşan bir hidroksil benzokinon ve bir para-benzokinon türevidir. Bu nedenle, para-benzokinonun temel fiziksel-kimyasal özelliğine sahiptir (Kundap vd., 2017; Badmanaban vd., 2019; Sheng vd., 2020). Turuncu renk gösterir, ipek ve yün boyamak için kullanılabilir (Samatha ve Vasudevan, 1996). Embelin, polar olmayan bir molekül olup, zayıf sulu çözünürlüğü (Pathan ve Bhandari, 2010; Singh vd., 2014) nedeniyle düzensiz biyoyararlanım (uygulama yerinden hedef bölgeye ulaşabilen miktarı) gösterir. Uzun alkil zinciri embeline güçlü lipofilik yetenek (Lamblin vd., 2012) ve yüksek hücre zarı geçirgenliği sağlayarak daha kararlı hale gelmesini ve hücrelere kolayca girmesini sağlar (Joshi vd., 2007). Süblimasyon (maddenin ısı uyguladığında katı halden direkt gaz haline geçmesi durumu) ve uçuculuk, embelinin diğer önemli özellikleridir. Isıtıldıktan sonra normal basınç altında ayrılmaz ve su buharı ile damıtılabilir, bu da ekstraksiyonunu ve saflaştırılmasını kolaylaştırır. Embelin ayrıca bir fenolik lipiddir ve ışığa duyarlıdır.

Metanolde, 450 nm'de bir pik absorbans gösterir. Uygun dalga boyundaki ışıkla ışınlığında, embelin aktive edilebilir ve antioksidan sistem yoluyla anti-neoplastik ve anti-inflamatuar etkiler sağlar (Joy vd., 2014; Joy vd., 2015).



***Embelia ribes* (Yalancı Karabiber)**

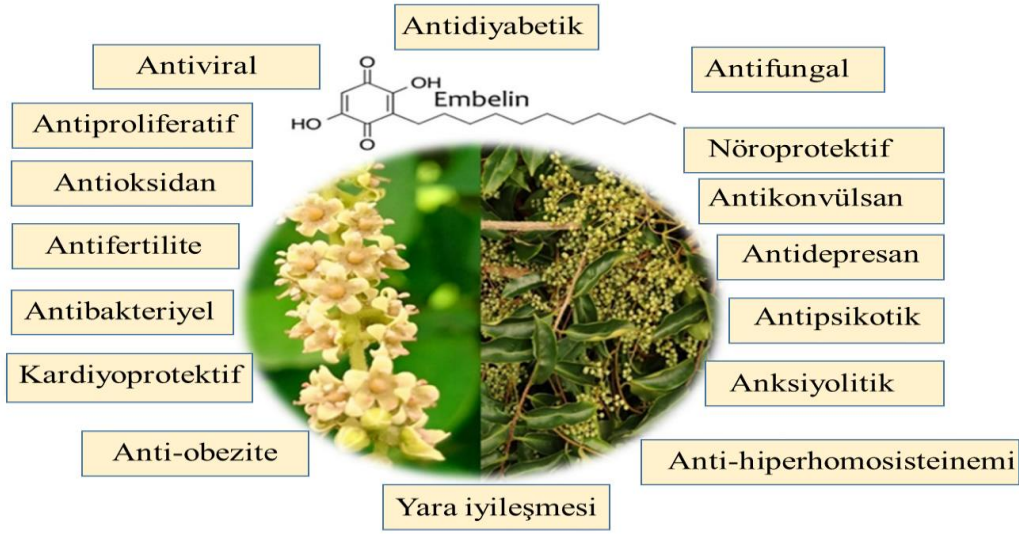


Embelinin Kimyasal Yapısı

Şekil 1.8: *Embelia ribes* meyve ve yaprakları (A) ve embelinin kimyasal yapısı (B) (Kundap vd., 2017).

1.2.3. Embelinin Etki Mekanizması

Embelin, artrit, bakteriyel enfeksiyonlar, tümör, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, nörodejeneratif bozukluklar, yara iyileşmesi vb. dahil olmak üzere birçok kronik hastalığın önlenmesi ve tedavisinde önemli bir potansiyel etkiye sahiptir. Embelin, anti-fertilite (Kumar vd., 2012), anti-tümöral (Danquah vd., 2012; Dhanjal vd., 2014), anti-inflamatuar (Kalyan Kumar vd., 2011; Xue vd., 2014), analjezik (Chitra vd., 1994), anti-oksidan (Singh vd., 2009), hepatoprotektif (Sreepriya ve Bali, 2006), yara iyileştirici, anti-bakteriyel (Dwivedi ve Singh, 2015) ve anti-konvülsan aktiviteler (Mahendran vd., 2011) da dahil olmak üzere çok çeşitli tıbbi özelliklere (Şekil 1.9) sahiptir (Sharma vd., 2022).



Şekil 1.9: Embelinin Etki Mekanizması (Sharma vd., 2022).

1.2.3.1. Embelinin Antitümöral Aktivitesi

Embelinin farklı tümör hücrelerinde farklı yollarla antitümöral özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Embelin, inflamasyon, hücre sağkalımı ve proliferasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemede çok önemli bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B'nin (NF- κ B) aktivitesini inhibe eder. NF- κ B genellikle tümör hücrelerinde aşırı aktive olur ve kontrolsüz büyümelerine katkıda bulunur. Embelin, NF- κ B'yi bloke ederek, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını baskılamaya yardımcı olur (Kannaiyan vd., 2011). Embelin ayrıca anti-anjiyojenik özelliklere sahiptir, yani anjiyogenezi inhibe edebilir. Anjiyogenezin bozulması, tümörlere kan akışını sınırlar ve böylece ilerlemelerini engeller (Coutelle vd., 2014). Embelin, farklı tümör hücreleri türlerinde düzenlenmiş bir hücre ölümü şekli olan apoptozu indüklemeye yeteneğini göstermiştir. Apoptoz, embelinin anormal ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak ve tümörün kontrolsüz çoğalmasını önlemek için izlediği önemli bir mekanizmadır. Embelinin apoptotik etkisi, kaspazların aktivasyonunu ve B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinlerinin modülasyonunu içerir (Basha vd., 2022).

Apoptoz inhibitör protein 3'ün (IAP3) inhibitörü olarak da bilinen XIAP'e bağlı apoptoz proteini inhibitörünün (XIAP) mesane tümörü hücrelerinde büyük ölçüde aşırı eksprese edildiği ve apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. XIAP'ın küçük molekül

inhibitörlerinden biri olan embelinin mesane tümörü tedavisinde, XIAP'ı inhibe ederek ve fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/Protein Kinaz B (Akt) yoluyla apoptozu indükleyerek tümör hücre büyümesini baskıladığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Fu vd., 2016).

Çalışmalar, insan mide karsinomu hücrelerinde anti-neoplastik aktivitesini ve embelin mekanizmasını araştırmıştır. Yapılan bir çalışmada, embelinin, PI3K/Akt, janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT), p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) ve p53 gibi hücre büyümesi ve apoptoz ile ilişkili çeşitli sinyal yollarını düzenlendiği, mide karsinomu hücrelerinin canlılığını bastırıp apoptozu indüklediği ve 5- fluorourasilin anti-neoplastik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Wang vd., 2014). Ayrıca embelinin, S (sentez) ve G2/M (mitoz ve sitokinez) fazlarında hücre döngüsünün durmasını indüklediği, XIAP ve siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1), CDC25B, CDC25C, siklin B1 ve siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur. Başka bir çalışmada, mide karsinomu hücrelerinin embelin ile tedavisinin hücre proliferasyonunu azalttığı, kaspaz-3 aktivasyonunu tetiklediği ve NF- κ B, p65 aktivasyonunu düşürdüğü bildirmiştir (Xu vd., 2016). Bu sonuçlar, embelinin, p38 MAPK'yı uyararak ve NF- κ B sinyal yollarını baskılayarak insan mide karsinomu hücrelerinde apoptozu desteklediğini göstermektedir.

Karaciğer tümörü hücrelerinde (HepG2) yapılan bir çalışmada, embelinin bu hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek doza ve zamana bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği ve ayrıca, HepG2 hücrelerinde G2/M (mitoz ve sitokinez) fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu doğrulanmıştır (Taghiyev vd., 2012).

Kolanjiokarsinom, safra kanalı epitel hücrelerinden köken alan yaygın bir tümördür. Embelinin KMCH ve Mz-ChA-1 kolanjiokarsinom hücre hatlarında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, S ve G2/M fazlarında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, embelinin bu hücre dizilerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmede ve XIAP ekspresyonunu azaltmada önemli role sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Wehrkamp vd., 2014).

Embelinin kolitis-iliskili kolon karsinomu üzerindeki etkisini inceleyen araştırmada, embelin, kolonda makrofajların toplanmasını bloke ettiği, tümör mikroçevresindeki makrofajların M2 benzeri polarizasyonunu azalttığı ve kolon karsinomu gelişimini bastırđıęı gösterilmiştir (Wu vd., 2016). Embelinin ayrıca makrofajlarda NF-κB sinyalini inhibe ettiği ve kolon karsinomu gelişiminde yer alan tümör nekroz faktörü-a (TNF-a), interlökin-6 (IL-6) ve siklooksijenaz-2'yi (COX-2) azalttığı yine bu çalışmada ortaya konmuş ayrıca embelinin, Th2 sitokinlerin varlığında M2 makrofajların polarizasyonunu da inhibe ettiğide ifade edilmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak, embelinin kolon karsinomundaki anti-neoplastik özelliğinin kısmen makrofajları hedeflemesinin olabileceği ileri sürölmüştür. Başka bir çalışmada ise embelinin IL-6/STAT3 aktivasyonunu ve Th17 bağışıklık tepkisini kısıtlayarak kolitise bağlı karsinomu durdurduğu tespit edilmiştir (Dai vd., 2014).

1.2.3.2. Embelinin ve Antimalaryal Aktivitesi

Doğal olarak türetilmiş bazı bileşikler gibi, embelinin de (*Embelia ribes* bitkisi ve ana bileşenleri) olası mekanizması ile antimalaryal aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, hemozoin oluşumunu inhibe ederek 4-aminokinolin ve klorokin ile benzer bir etki mekanizmasına sahip embelinin antimalaryal aktivitesinden bahsedilmiştir (Huang, 1982; Zaid vd., 2017). Bir diğer araştırmacı grubu, embelinin heme demiri ile bağlanması için olası mekanizmayı inceleyerek hemozoin oluşumunu engellediği, böylece parazitlerin büyümesini durdurduğunu göstermişlerdir (Basilico vd., 1997). Daha sonra Bezu vd. (2015) çalışmalarında, embelin ve yarı sentetik aromatik amin türevinin *in vivo* antimalaryal etkisini bildirmişler ve ayrıca, bu çalışmada, aromatik yarı sentetik amin türevlerinin antimalaryal aktivitesinin, embelinden daha iyi olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, Srivastava vd. (2014), PCAF / GCN5 ailesi histon asetiltransferazın inhibisyonunu gösteren etki mekanizması ile embelinin düşük mikromolar konsantrasyonda parazitik büyümenin azalması yoluyla antimalaryal aktivitesinden bahsetmektedir. Ayrıca, Thota vd. (2016), embelin türevlerinin izolasyonunu ve ardından karakterizasyonlarını ve antimalaryal aktivitelerini araştırarak 6-metilembelin, 4-hidroksi-2-metoksibenzamid, 5-O-etilembelin ve 5-O-metilembelin türevinin, embelin

ile karşılaştırıldığında orta derecede antimalaryal aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

1.2.3.3. Embelinin Antiviral Aktivitesi

Potansiyel antiviral ajanlar geliştirmek için, tıbbi olarak uygulanabilir bitkilerden birçok biyoaktif bileşik izole edilmiş, antiviral aktivitesi açısından araştırılmıştır (Rushdi vd., 2020; Wei vd., 2020). Bunun ışığında, Hossan vd. (2018), embelinin kurutulmuş meyvelerinin etil asetat ekstraktının influenza virusu A / Porto Riko / 8/34'e (H1N1) karşı antiviral aktivitesinin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, embelinin, viral yaşam döngüsünün erken aşamalarında hücre kültüründe virus replikasyonunu baskıladığı bulunan viral hemaglutinin reseptör bağlama bölgesi ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Yapılan başka bir çalışmada, iki potansiyel bileşik olan metilprednizolon ve deksametazon gibi kinon türevi olan embelinin Covid-19'a karşı inhibitör mekanizması olduğu gösterilmiştir (Caruso vd., 2020a). Hücre kültüründe yapılan bir çalışmada embelinin yüksek anti-hepatit B virusu (anti-HBV) aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Parvez vd., 2019). Son zamanlarda, embelinin antiviral aktivitesi üzerine yapılan başka bir araştırmada, embelin Herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1) enfeksiyonunun neden olduğu oksidatif hasarı inhibe ederek enfeksiyonu tamamen azalttığı gösterilmiştir (Elias vd., 2021).

1.2.3.4. Embelinin Anti-diyabetik ve Anti-obeze Aktiviteleri

Obezite, yağ dokusu ve diğer organlarda aşırı yağ birikimi ile birlikte lipid ve karbonhidrat metabolizmasının kronik metabolik bir hastalığıdır (Hajer vd., 2008). Diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, koroner kalp hastalığı ve benzeri gibi çeşitli tehlikeli hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Embelin tedavisinin insülin ve leptin ile indüklenen obez modellerde glikoz serum düzeylerini düşürdüğü, hepatik tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) seviyelerini azalttığı ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve redükte glutatyon (GSH) seviyelerinin ekspresyonunu artırdığı ifade edilmiştir (Chaudhari vd., 2012). Çalışmalara göre, embelin ile tedavi, yağ kaynaklı modellerde vücut kitle indeksini, serum lipid seviyelerini ve inflamasyonu azaltmaktadır

(Qin vd., 2019). Çalışmalar ayrıca bu bileşiğin adipogenez ve lipogenezini bloke etmedeki etkinliğini göstermiştir. Bu sonuçlar, embelin obezite ve glukoz tolerans düzeylerinin tedavisi için önemli bir ajan olarak ön plana çıkarmaktadır (Gao vd., 2017).

Diyabet, pankreas dokularının kan, serum ve biyokimyasal parametrelerinde yüksek anomalilere yol açan bir dizi metabolik bozukluktur (Hajer vd., 2008). Meta-analiz, *Embelia ribes* ekstraktının ve ana aktif türevinin, yani embelin kan şekeri, HbA1c, insülin ve lipid profilinde faydalı etkiler gösterdiğine dair bilimsel kanıtlar sağlamıştır. Ek olarak, *Embelia ribes* özü ve embelin, diyabetik modellerde kalp atış hızını, sistolik kan basıncını, laktat dehidrojenazı, kreatinin kinazı ve oksidatif stres belirteçlerini normalleştirmiştir (Durg vd., 2017a). *In vivo* modellerde embelin ve glibenklamid müdahalesi, HbA1c, serum glukoz seviyelerini ve NO aktivitesini önemli ölçüde azaltmış ve serum insülin seviyelerini artırmıştır. Ek olarak, diyabetik fare modellerinde pankreas antioksidan enzimleri yükseltmiş, insülin duyarlılığını düzeltmiş, β hücrelerini hasardan korumuş, oksidatif stres baskılamış ve glikoz homeostazı korunmuştur. Bunun dışında, embelin tedavisi ile diyabetik ratlarda pankreas adacık hücrelerinin kayda değer bir şekilde yenilenmiş ve yara iyileşmesi hızlanmıştır (Gupta vd., 2012; Deshmukh vd., 2013).

Embelin ve kinon türevlerinin anti-diyabetik aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Embelin, PI3K/p-AKT sinyal yolağında glukoz taşıyıcı protein 4'ün (GLUT4) translokasyonu ve aktivasyonu ile diyabetik ratlarda plazma insülin düzeylerini azaltır (Gandhi vd., 2013). Bhandari vd. (2013), yüksek yağlı diyet ve düşük doz streptozotosin ile indüklenen tip 2 diyabetik ratlarda *Embelia ribes*'in etanolik ekstraktının anti-diyabetik aktivitesinin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Alam vd. (2018), streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda oral olarak verilen embelin diyabeti iyileştirdiğini bildirmişlerdir.

1.2.3.5. Embelinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Antimikrobiyal ajanlar, bakterileri, mantarları veya protozoaları yok eden, büyümelerini veya üreme yeteneklerini baskılayan maddelerdir. İlginç bir şekilde, çok sayıda çalışma,

embelinin önemli antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Buna göre çözünürlüğünü artırmak, sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitesini geliştirmek amacıyla yeni embelin türevleri hazırlanmıştır. Embelini ikincil aminlerle muamele ederek embelin türevlerini sentezledikleri ve bu bileşiklerin antiproliferatif ve antimikrobiyal aktiviteleri inceledikleri çalışmada; yalnızca bir bileşiğin insan kolon karsinomu hücre dizisi (HCT-116), meme tümörü hücre dizisi (MCF-7), pankreas karsinomu hücre dizisi (MIAPaCa-2) ve prostat karsinomu hücre dizisi (PC-3) gibi hücre hatlarına karşı sırasıyla 30, 41, 34 ve 36 μM 'lik düşük IC_{50} değerleri ile daha iyi antiproliferatif aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu bileşikler ayrıca antimikrobiyal aktivite açısından da test edilmiş ve sadece dimetilamino ve piperidin türevi, 8 ve 16 $\mu\text{g/ml}$ minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri ile gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Singh vd., 2014).

Embelin, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi belirli bakteri türlerine karşı önemli antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Aynı zamanda, *Salmonella typhi*, *S. boydii* ve *Proteus mirabilis*'e karşı da orta derecede aktivite göstermiştir (Chitra vd., 2003). Ayrıca, *Streptococcus mutans*'ın sağlam biyofilm oluşturan izolatlarına karşı embelinin önemli bir anti-biyofilm etkisini ortaya çıkarılmış ve böylece bu mikropların neden olduğu oral enfeksiyonların tedavisi için etkili bir ilaç adayı olduğunu kanıtlanmıştır (Dwivedi ve Singh, 2015).

1.2.3.6. Embelinin Anti-inflamatuar Aktivitesi

Embelia ribes Burm'un biyoaktif bir bileşeni olan benzokinon türevi embelin, anti-inflamatuar ve antioksidan dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite spektrumuna sahiptir. Kronik inflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar ve tümörler dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıklara dönüşme riski daha yüksek olduğundan, interlökin-1 beta (IL-1 β) ve TNF-a'nın embelin tarafından inhibisyonu, inflamasyonun neden olduğu kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için umut vericidir. Son zamanlarda, Bansal vd. (2020), *Embelia ribes*'ten izole edilen embelin, yüksek yağlı diyetle beslenen obez C57BL/6 farelerinde nükleer faktör eritroid türevi-2 (Nrf-2) ve NF- κB sinyal yollarını

düzenleyerek oksidatif stresi ve inflamasyonu iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışma ile sispalin tarafından tetiklenen nefrotoksiteden korunmak için embelinin temel mekanizmasının Nrf2/ Hem oksijenaz-1 (HO-1) sinyal yolu olduğunu ve bu nedenle embelinin NF-κB yollarını bloke ederek oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığını ortaya konmuştur (Qin vd., 2019).

Yapılan bir çalışmada, embelinin ratlarda asetik asit kaynaklı ülseratif kolitis tedavisinde etkili olduğu, vücut ağırlığı kaybı, ishal ve büyük bağırsak kanaması gibi semptomları hafiflettiği, kolon dokusunun ağırlığını azalttığı ve kolon inflamasyonundaki iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (Badamaranahalli vd., 2015). Rat ülseratif kolitis modelinde, embelin kolonik miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ve lipid peroksidleri (LPO), serum laktat dehidrojenazı (LDH) azaltmış ve GSH düzeylerini ise artırmıştır (Thippeswamy vd., 2011a; Badamaranahalli vd., 2015). Embelinin, dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenen kolitis modelinde farelerin kolonlarında TNF-a, IL-1β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri baskılayarak kolitisi iyileştirdiği ve splenomegaliyi hafiflettiği bulunmuştur (Kumar vd., 2011). Bu çalışmalar, embelinin, inflamatuvar araçların ekspresyonunu baskılayarak hastalıklı bölgelerde olağanüstü anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu ve bu nedenle ülseratif kolitis tedavisinde olumlu terapötik faydalar sağlayabileceğini düşündürmektedir (Kumar vd., 2011; Nidhi vd., 2017).

Embelin yara iyileşmesinde önemli bir yapıya sahiptir. *Embelia ribes* yapraklarının etanolik ekstraktları ve embelinin insizyonun hızlı epitelizasyonunu, kollajenasyonu, yara kasılması ve yaranın gerilme kuvvetini artırdığı gözlenmiştir. Embelin ile tedavi edilen deney hayvanlarının histolojik analizi, kollajen liflerinin çapraz bağlanmasının arttığını göstermiştir (Kumara Swamy vd., 2007). Bu veriler, embelinin yara iyileşmesini kolaylaştırmada olumlu etkileri olduğunu ve kronik yaraların tedavisinde potansiyel kullanılabilirliğini göstermektedir. Embelinin yara iyileşmesini teşvik etmedeki çeşitli etkileri, terapötik önemini vurgulamakta ve yara bakımı alanındaki mekanizmaları ve klinik kullanımları hakkında gelecekteki araştırmalar için yollar açmaktadır. Embelin inflamatuvar hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir.

1.2.3.7. Embelinin Antioksidan Aktivitesi

Antioksidan ajanlar, serbest radikal ara ürünlerini ortadan kaldırarak bir zincir reaksiyonunu sonlandırabilen bileşiklerdir. Hem embelinin hem de bitki kaynağının antioksidan aktiviteleri üzerinde farklı türde olası çalışmalar yapılmıştır. Embelin, lipid peroksidasyonunu önleyerek hücre zarlarının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur ve hücreleri oksidatif hasardan korur (Jagetia ve Baliga, 2004). Embelin, SOD ve CAT gibi enzimlerin aktivitesini artırarak hücresel antioksidan savunma sistemini artırır (Caruso vd., 2020b).

Embelinin karaciğer hastalıklarındaki koruyucu etkilerini inceleyen önceki çalışmalar, hepatokarsinogenezis ve lipid peroksidasyonuna odaklanmıştır. Çalışmalar, embelinin akut karaciğer hasarı modellerinde karaciğer doku hasarını ve fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermiştir (Singh vd., 2009; Wang vd., 2019). Embelinin, antioksidan özelliklerinden dolayı hepatoselüler nekrozu ve apoptozu azaltır. Karbon tetraklorür (CCl₄), serbest radikaller üreterek hepatik inflamasyona ve tümöre neden olan güçlü bir karsinojendir. Singh vd. (2009), embelin tedavisinin, hayvanların karaciğerinde CCl₄ kaynaklı lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ek olarak, embelin hayvanların serumunda CCl₄ kaynaklı alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalın fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), gama-glutamil transferaz (GGT) ve toplam bilirubin düzeylerini baskılamıştır. Embelin tedavisinin karaciğeri korumasının, inflamasyonu ve fibrojenizi baskılayan antioksidan etkisinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Tiyoasetamid (TAA) kaynaklı karaciğer hasarı oluşturulan farelerde 50 µg/g oral embelin uygulamasının hepatik nekrozu/apoptozu baskıladığı ve sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (Wang vd., 2019).

N-nitrozodimetilamin ve fenobarbital ile hepatokarsinogenez oluşturulan rat modelinde, embelinin (50 mg/kg/gün) hepatik hiperplastik nodüllerin indüklenmesini bloke ettiği, vücut ağırlığı kaybını önlediği ve hepatik fonksiyon belirteçlerini (ALT, AST, ALP) iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu hepatokarsinogenez modelinde, hepatik glutatyon antioksidan seviyelerinde azalma, lipid peroksidasyonunda artış ve displazi ve anormal kromatin paternli atipik hücreler gibi histolojik değişiklikler gözlenmiştir

(Sreepriya ve Bali, 2005). Embelin tedavisinin serbest radikal oluşumunu engellediği ve antioksidan aktivite yoluyla bu biyokimyasal ve patolojik değişiklikleri iyileştirebildiği ve hatta tersine çevirebildiği bulunmuştur (Sreepriya ve Bali, 2006).

1.2.3.8. Embelinin Nörolojik Bozukluklar Üzerine Etkisi

Nörolojik bozukluklar, merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki rahatsızlıklardan oluşur. En yaygın nörolojik bozukluklardan bazıları Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, felç ve çoğunlukla nöronların ve glial hücrelerin kaybindan kaynaklanan multipl sklerozdur (Chaudhuri ve Behan, 2004). Embelin, klinik öncesi çalışmalarda dikkat çekici farmakolojik profili nedeniyle nörolojik bozuklukların tedavisi için potansiyel bir aday olarak iddia edilmiştir. Bir çalışmada, kronik serebral hipoperfüzyon modelinde embelinin nöroprotektif ve anti-Alzheimer etkisi olduğu, sinaptik plastisite hasarını önlediği ve hipokampal nörotransmitterleri yeniden kurarak nöromodülatör aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Bhuvanendran vd., 2019). Bu sonuçlar, embelinin hafızayı geliştirdiğini ve sinaptik plastisite hasarını inhibe ettiğini ve nörodejeneratif bilişsel patolojiler için potansiyel bir ilaç olabileceğini göstermektedir.

Embelin, anti-psikotik aktiviteye bağlı inme, epilepsi ve psikotik bozuklukların önlenmesi ve tedavisinde önemli olduğu gösterilmiştir (Durg vd., 2017b). İlginç bir şekilde, embelin, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ekspresyonunu artırarak ve beyni oksidatif stresten, nöronal inflamasyondan ve hipotalamik-hipofiz adrenal ekseninin nötralize edici aktivitesinden koruyarak kronik öngörülemez stres kaynaklı depresif davranışları etkili bir şekilde bastırabilir (Wang vd., 2018). Başka bir çalışmada, embelin müdahalesi ile, doza bağlı bir şekilde elektroşok ve pentilentetrazol tarafından indüklenen nöbetlerin önemli ölçüde baskılandığını gösterilmiştir ve embelinin etkisi, standart ilaçlar fenitoin ve diazepam'a benzer olarak ifade edilmiştir (Mahendran vd., 2011). Bazı çalışmalarla inme, kronik epilepsi ile ilişkili bilişsel işlev bozukluğunun tedavisinde etkili olabileceği ve ayrıca bir anti-amnezik ajan olduğu gösterilmiştir (Thippeswamy vd., 2011b; Bhuvanendran vd., 2018; Kundap vd., 2019).

1.2.3.9. Embelinin Kardiyovasküler Aktivitesi

Embelin, oksidatif stresi, apoptozu ve kardiyotoksisiteyi azaltarak miyokard hasarına karşı potansiyel kardiyoprotektif etkilere sahiptir. Embelin antioksidan aktiviteyi güçlendirerek miyokardiyal lipid peroksidasyonunu, mitokondriyal apoptotik hasarı, kardiyak hasar belirteçlerini azaltır ve histopatolojik faydalar gösterir (Martín-Acosta vd., 2023). Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan tavşanlara embelin verilmesiyle serum IL-1 β , IL-6, TNF-a seviyeleri ve kardiyak troponin I (cTnI), nekroz oranı, apoptotik indeks ve *NF- κ B p65* ekspresyonunun azaldığı, hemodinamik ve miyokardiyal fonksiyonunun iyileştiği görülmüştür (Zhao vd., 2015). Başka bir çalışma, embelin plazminojen aktivatör inhibitörü-1'i (PAI-1) inhibe ederek güçlü anti-trombotik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (Wang vd., 2020). Embelinin protein kinaz C (PKC) aktivatörü forbol 12,13-dibutirat gibi farklı agonistler tarafından kanın pıhtılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, embelin, granül salınımına ve glikoprotein IIb-IIIa aktivasyonuna yol açan protein kinaz B ve MAPK aktivasyonu gibi PKC sinyallerini baskılamıştır. Embelin, anti-trombosit ve anti-trombotik etkilere sahiptir (Li vd., 2019). Embelinin, farelerin mezenterik mikrodamarlarında trombüs gelişimini azalttığı, abdominal aort anevrizmalarını önlediği, antiplatelet ve anti-trombotik özelliklere sahip bir PKC baskılayıcı olarak bilinmektedir (Liu vd., 2018).

1.2.3.10. Embelinin Fertilite Üzerine Etkisi

Bazı çalışmalar, embelin alımının erkek ve dişi deney hayvanlarında kısırlığa neden olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, erkek tavşanlara iki hafta boyunca intramusküler olarak verilen embelinin, bir hafta içinde testosteron seviyelerini %90'a kadar düşürdüğü ve embelin dozunun artmasıyla birlikte luteinize edici hormon ve progesteron seviyelerinde de yükselme olduğu görülmüştür (Githui vd., 1991). Ayrıca embelin uygulamasının erkek ratlarda spermatogenezi bozduğu da belirtilmiştir. Ancak, bu ilacın geri çekilmesi ile birlikte herhangi bir ciddi yan etki olmaksızın anti-spermatojenik değişikliklerin tersine döndüğü görülmüştür (Gupta vd., 1989). Doza bağlı bir şekilde oral olarak verilen embelinin sperm sayısı ve sperm hareketliliğinde azalttığı da gözlenmiştir (Seth vd., 1982). Öte yandan subkutan olarak verilen embelinin, testis

histolojisinde değişikliğe, anti-androjenik ve anti-spermatogonik etkilere yol açtığı görölmüştür (Seth vd., 1982; Agrawal vd., 1986).

Embelin, tavşanlarda önemli anti-ovulator etkiye sahiptir (Seth vd., 1982). Ek olarak, embelin gebeliğin erken günlerinde ratlara 60 ve 120 mg/kg oral dozda post-koital olarak verildiğinde anti-implantatif aktivitesi göstermiştir. Çalışmalarda ratlarda embelinin 10 mg/kg'lık minimal oral dozda %100 anti-implantatif aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (Rathinam vd., 1976; Poojari, 2014). Bunun yanı sıra, başka bir çalışmada, gebeliğin ilk haftasında dişi ratlara 100 mg/kg dozunda oral embelin uygulamasının, rahim ağırlığı, protein, glikojen ve alkalın fosfataz aktivitesi gibi östrojene duyarlı parametreleri etkilemediği bildirilmiştir. Buna göre embelinin ne östrojenik ne de anti-östrojenik etkili olabileceği ileri sürölmüştür (Krishnaswamy ve Purushothaman, 1980). Ovaryumları alınmış ratlarda, gebeliğin ilk haftasından gebeliğin sonlandırılmasıyla birlikte oral embelin uygulaması anti-östrojenik ve zayıf progestasyonel etkiye neden olmuştur (Johri vd., 1991). Yine de, embelinin insanlardaki etkilerini doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Sonuçta, kronik hastalıkların çoğu yaşlı popülasyonda görülür ve embelin kaynaklı kısırlık geri dönüşümlüdür, bu nedenle bu bileşiğin etkisi onların yaşamlarını engellemeyebilir. Bu çalışmalar, embelinin hem erkeklerde hem de kadınlarda potansiyel bir kontraseptif ajan olabileceğini göstermektedir.

1.2.4. Embelinin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Embelinin güvenliğı ve zararlı etkilerini araştırmak için kemirgenlerde ve diğer hayvan modellerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ratlarda 30 gün boyunca 75 mg/kg/gün oral embelin dozu, böbrekte 249 mg/g, testiste 257 mg/g ve bağırsakta 232 mg/g gibi yüksek düzeylere ulaşmıştır. Beyin dokusunda (163 mg/g), kalpte (196 mg/g) ve dalakta (176 mg/g) embelin konsantrasyon seviyelerinin tüm bu organlarda yavaşça azaldığını, bu da vücuttan 21.86 saatlik bir yarılanma ömrü ile yavaş bir eliminasyon sürecine sahip olduğunu göstermektedir (Gupta vd., 1990; Gupta ve Sanyal, 1991; Poojari, 2014).

Embelinin 30 gün boyunca subkutan dozu, kalpte 204 mg/g, testiste 200 mg/g, epididimde 176 mg/g, böbrekte 159 mg/g ve beyinde 147 mg/g yüksek konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur. Dalakta 139 mg/g, seminal veziküllerde 110 mg/g, karaciğerde 106 mg/g, bağırsakta 90 mg/g, prostatta 86 mg/g ve akciğerlerde 82 mg/g düşük embelin konsantrasyon seviyeleri gözlenmiştir (Gupta vd., 1990; Poojari, 2014). Embelinin yaklaşık bir ay boyunca düzenli olarak oral dozu, ince bağırsak bölgelerinde D-glukoz, L-alanin, L-lösin ve kalsiyum emilimini arttırdığı ve erkek ratlarda ince bağırsağın segmentlerinde alkalın fosfataz, laktaz, lösin aminopeptidaz, maltaz, sükras vb. gibi bağırsak enzimlerinin artışı sağladığı gösterilmiştir (Gupta vd., 1990, Gupta vd., 1991).

Ratlarda intravenöz ve oral yolla uygulanan embelinin farmakokinetik çalışmaları, %97'lik bir biyoyararlanım ile tam emilim gösterdiği ve yarı ömrü, intravenöz uygulamada 9.5 saat ve oral uygulamada 11 saat olarak bulunmuştur. Karaciğer, dalak, kalp ve akciğer ile karşılaştırıldığında, beyinde 0.25 ile 2 saat boyunca yüksek bir ilaç konsantrasyonu tespit edilmiş olup, dozun %60.9'u 24 saat sonra idrarda belirlenmiştir (Zutshi vd., 1990).

1.2.5. Embelin Toksisitesi

Embelinin 10 mg ile 3 g/kg oral uygulamasının kemirgenlerde herhangi bir zararlı etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ek olarak, embelinin 10 mg/kg'da 10 hafta boyunca tekrarlayan girişiminden sonra subakut toksisitenin ratlarda güvenli olduğu tespit edilmiştir (Poojari, 2014). CCl₄ kaynaklı hepatotoksik ratlarda yapılan çalışmalarda, 5 hafta boyunca embelinin 100 mg/kg oral uygulamasının ödemi azaltarak; protein ve albümin seviyelerini yükselterek hepatoprotektif etkilediği gösterilmiştir (Singh vd., 2009; Poojari vd., 2010). Bununla birlikte, başka bir çalışmada, embelinin 6 hafta boyunca 120 mg/kg dozunda dişi ratlar için toksik olduğunu bildirilmiştir (Prakash, 1994). Çalışma, embelin uygulamasının böbrek ve adrenal hücrelerde asit ve alkalın fosfataz aktivitelerinde artış, değişmiş nekroz, karaciğer ve böbrekte perinükleer vakuolasyon, böbrekte tubuler hasar ve adrenal hipertrofi ile sonuçlandığını ortaya koymuş ve bunların tümünün embelin kesildikten sonra düzeldiğini göstermiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Deney Hayvanları

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: 23.SAĞ.BİL.15) ve Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Etik Kurulunca onaylanan (20/06/2023 tarih, karar no: 2023.06.05) bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Araştırma ve Uygulama Biriminde yapıldı. Çalışmada Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Araştırma ve Uygulama Biriminden sağlanan 3 aylık, 250–300 g ağırlığında, 28 adet, Wistar Albino erkek ratlar kullanıldı. Ratlar çalışma süresince standart şartlar altında havalandırmalı, sabit ısıllı odalarda, %50±5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık ± karanlık döngüsü bulunan laboratuvar koşullarında barındırıldı.

2.2. Deney Grupları

Ratlar rastgele seçilerek dört ayrı çalışma grubu oluşturuldu.

1. Sham Grubu (S), (n = 7): %1 Tween 80 ve %0,9'luk serum fizyolojik içeren karışım 14 gün boyunca (0.1 ml/100 g) intraperitoneal olarak verildi.

2. Embelin grubu (E), (n = 7): Ratlara 14 gün boyunca, embelin 1.2 mg/kg/gün dozunda %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde, %1 Tween 80 ile çözündürülerek intraperitoneal olarak verildi.

3. Dietilnitrozamin grubu (DEN), (n = 7): Bu gruptaki ratlara tek doz 200 mg/kg/gün DEN intraperitoneal verildi.

4. Dietilnitrozamin + Embelin Grubu (DEN + E), (n = 7): Bu gruptaki ratlara tek doz DEN (200 mg/kg intraperitoneal) verilerek 24 saat sonra, 1.2 mg/kg embelin %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde, %1 Tween 80 ile çözündürülerek intraperitoneal olarak 14 gün boyunca uygulandı.

2.3. Ratlarda Hepatotoksisite Oluşturulması

Ratlarda karaciğer hasarı oluşturmak için; DEN gruplarına, 200 mg/kg dietilnitrozamin (TCI, Tokyo, Japonya) serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek tek doz intraperitonel olarak verildi (Assar vd., 2021).

2.4. Embelin Uygulaması

Yüzde 0,9'luk serum fizyolojik içerisinde, %1 Tween 80 ile çözündürülerek hazırlanan 1.2 mg/kg/gün embelin (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, Amerika), 14 boyunca embelin gruplarındaki ratlara intraperitonel olarak uygulandı (Arora ve Deshmukh, 2017; Bhuvanendran vd., 2019).

2.5. Deneyin Sonlandırılması ve Örneklerin Toplanması

Deneyin başında ve sonrasında tüm ratların vücut ağırlıkları ölçüldü. On beş gün süren uygulama sonunda Ketamin/Ksilazin (90 mg/kg - 10 mg/kg) anestezisi uygulanan ratlardan intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri antikoagülan içermeyen tüplere konularak +4°C'de 3500 rpm 10 dakika santrifüj edildi ve serumlarına ayrıldı. Kardiyak kan örneklemesinin ardından, hayat belirtileri sonlanan tüm ratlar nekropsiye alınarak her bir ratın karaciğer dokusunun etrafındaki bağ ve yağ dokuları temizlenerek, standart bir şekilde total olarak çıkarıldı ve ağırlıkları ölçüldü. Karaciğer dokusu, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, organın bir parçası, histopatolojik incelemeler için %10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer karaciğer dokusu ile serum örnekleri biyokimyasal ve moleküler analizler yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

2.6. Karaciğer İndeksinin Hesaplanması

Alınan karaciğerlerin ağırlıkları tartılarak vücut ağırlığına oranlanmasıyla karaciğer indeksleri hesaplandı.

$$\text{Karaciğer İndeksi} = [\text{Total Karaciğer Ağırlığı} / \text{Vücut Ağırlığı}] \times 100$$

2.7. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması

2.7.1. Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Analizleri

Serum örneklerinde AST, ALT, ALP, LDH, GGT, total bilirubin, albümin, trigliserit (TG), kolesterol (TC), yüksek dansiteli kolesterol (HDL), düşük dansiteli kolesterol (LDL) gibi rutin biyokimyasal parametrelerin analizleri, uygun ölçüm kitleri kullanarak (Beckman Coulter, Miami, FL, Amerika) Beckman Coulter AU680 analizörü ile (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) yapıldı.

2.7.2. Total Oksidan ve Total Antioksidan Kapasitenin Ölçümü

Total oksidan kapasite (TOS) ölçümü ticari olarak üretilen ölçüm kiti (Total Oxidant Status Assay Kit, Ürün Kodu: RL0024, Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ELISA mikroparka okuyucu (Thermo Multiscan GO, 1510, Finland) analizöründe yapıldı. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit equivalan olarak ifade edildi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$) (Erel, 2005).

Çizelge 2.1: Total oksidan kapasite (TOS) ölçümü (Erel, 2005)

	Numune	Standart
Çalışma standardı	-	45 μl
Numune (Serum)	45 μl	
Buffer Solüsyonu	300 μl	300 μl
30 saniye sonra 530 nm’de birinci absorbanslar (A1) okundu.		
Prokromojen çözelti	15 μl	15 μl
37°C’de 5 dakika inkübe edilerek 530 nm’de ikinci absorbanslar (A2) okundu.		
$\Delta A \text{ numune} = \text{Numunenin ikinci absorbansı} - \text{Numunenin ilk absorbansı}$ $\Delta A \text{ standart} = \text{Standart’ın ikinci absorbansı} - \text{Standart’ın ilk absorbansı}$ Standart konsantrasyonu = 10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$ Hesaplama ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) = $[\Delta A \text{ numune} / \Delta A \text{ standart}] \times \text{Standart konsantrasyonu}$		

Total antioksidan kapasite (TAS) ölçümü ticari olarak üretilen ölçüm kiti (Total Antioxidant Status Assay Kit, Ürün Kodu: RL0017, Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ELISA mikroparka okuyucu (Thermo Multiscan GO, 1510, Finland) analizöründe yapıldı. Ölçüm sonuçları mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edildi (Erel, 2004).

Çizelge 2.2: Total antioksidan kapasite (TAS) ölçümü (Erel, 2004)

	Numune	H ₂ O	Standart
Çalışma standardı	-	-	18 µl
Numune (Serum)	18 µl	-	-
H₂O (su)		18 µl	-
Buffer Solüsyon	300 µl	300 µl	300 µl
30 saniye sonra 660 nm’de birinci absorbanslar (A1) okundu.			
Prokromojen çözelti	45 µl	45 µl	45 µl
37°C’de 5 dakika inkübe edilerek 660 nm’de ikinci absorbanslar (A2) okundu.			
$\Delta A_{\text{numune}} = \text{Numunenin ikinci absorbansı} - \text{Numunenin ilk absorbansı}$ $\Delta A_{\text{H}_2\text{O}} = \text{H}_2\text{O’nun ikinci absorbansı} - \text{H}_2\text{O’nun ilk absorbansı}$ $\Delta A_{\text{standart}} = \text{Standart’ın ikinci absorbansı} - \text{Standart’ın ilk absorbansı}$ Hesaplama (mmol Trolox Eq/L) = $(\Delta A_{\text{H}_2\text{O}} - \Delta A_{\text{numune}}) / (\Delta A_{\text{H}_2\text{O}} - \Delta A_{\text{standart}})$			

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi µmol birimine çevrildi.

$$\text{OSİ} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 100]$$

2.8. Gen Ekspresyon Analizleri

2.8.1. Total RNA İzolasyonu

Karaciğer dokusundan total RNA izolasyonu, A.B.T.TM RNA Purification Kit (Cat No: I02-01-10) kullanılarak yapılmıştır. Ratlardan alınan karaciğer dokuları (20 mg) 2 ml’lik endendorf tüpe konulmuş ve üzerine 1 ml “Buffer P” eklenerek, dokular homojenize edildi.

Homojenize olmuş örnekler oda sıcaklığında (15-25°C) 3 dk inkübe edildi. Her bir tüpe, 200 µL kloroform eklendi ve tüpler alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında tekrar 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edildi ve üstteki sulu faz kısmı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra tüplere, 1:1 oranında “Buffer RB” eklendi ve tüpler alt üst edilerek karıştırıldı. Bu karışımdan 700 µL alınıp 2 ml'lik kit içerisinde olan toplama tüpüne yerleştirilmiş olan spin kolona aktarıldı ve 12.000 rpm'de 20 saniye santrifüje edildikten sonra toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 500 µL “Yıkama Tamponu I” ilave edilip 12.000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi. Her bir spin kolona 500 µL “Yıkama Tamponu II” ilave edilip 12.000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi. Kalan yıkama tamponunu çıkarmak için maksimum hızda 1 dakika daha santrifüjlendi. Her bir spin kolon steril, RNaz-free 1,5 mL'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 100 µL RNaz-free su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edilerek tam hızda 1 dakika santrifüj edildi. RNA konsantrasyonu NanoDrop 2000 spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Elde edilen RNA -80 °C'de saklandı.

2.8.2. cDNA Sentezi

Karaciğer dokularından izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için “EasyScript™ cDNA Synthesis Kit,” (Applied Biological Materials, Kanada) kullanılmıştır. Her bir örnek için ependorf tüpünde Template RNA reaksiyon karışımı hazırlandı [14,5 µL RNaz-free, 1 µL dNTP miks (10 mM), 1 µL oligo DT (10 µM)]. Bu karışımdan 16,5 µL alınarak 0.2 mL'lik PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerine her bir örneğe ait 3,5 µL RNA örnekleri eklendi. Hazırlanan bu karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edilerek sonrasında 1 dakika buzda bekletildi. Bir önceki basamaktan elde edilen Template RNA reaksiyon karışımına (20 µL), başka bir tüpte hazırlanan reaksiyon karışımı [4 µL 5XRT Buffer, 0,5 µL RNaseOFF Ribonükleaz inhibitör (40 U/µL), 1 µL EasyScript Plus™ RTase (200 U/µL)] ilave edildi. Örnekler PCR termal cycler cihazında (Techne, 5PRIMEG/02, Ukrayna) sırası ile 50°C'de 50 dakika, 85°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Bu aşamalar sonucunda elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

2.8.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Sonic hedgehog (*Shh*), Patched transmembran proteini-1 (Protein yamalı homolog 1; *Ptch1*), Smoothened (*Smo*), Glioma ile ilişkili onkogen 1 (*Gli1*), *Tnfa*, *Il6*, *Il1b*, tümör baskılayıcı protein 53 (*Tp53*), B hücreli lenfoma 2 (*Bcl2*), *Casp3*, Bcl2 benzeri X protein (*Bax*), (hedef genler) ve β -aktin (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystem™ StepOne™ Real-Time PCR System, Fisher Scientific) kullanılarak yapıldı. Çizelge 2.3'te hedef ve referans genlere özgü primer setlerin dizilimleri verilmiştir.

Çizelge 2.3: Genlerin primer dizilimleri (5'- 3')

Genler	Primer dizilimleri
<i>Shh</i>	F: CAA TTA CAA CCC CGA CAT CA R: AGT CAC TCG AAG CTT CAC TCC
<i>Ptch1</i>	F: ATT TCT TGC CCT TGG TGT TG R: GAA GGC AGT GAC ATT GCT GA
<i>Smo</i>	F: AGA AGG CCT TGG CAA TCA R: GAA GCC CAT TCC TGA TTG TG
<i>Gli1</i>	F: TGG AAG GGG ACA TGT CTA GC R: GCT CAC TGT TGA TGT GGT GC
<i>Tnfa</i>	F: CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC R: GCT ACG GGC TTG TCA CTC G
<i>Il6</i>	F: CTT CCA GCC AGT TGC CTT CTT G R: TGG TCT GTT GTG GGT GGT ATC C
<i>Il1b</i>	F: CCA GGA TGA GGA CCC AAG CA R: TCC CGA CCA TTG CTG TTT CC
<i>Tp53</i>	F: CTA CTA AGG TCG TGA GAC GCT GCC R: TCA GCA TAC AGG TTT CCT TCC ACC
<i>Bcl2</i>	F: AGA TGA AGA CTC CGC GCC R: GTA GTG AGA CCC ACG TAT GGA CC
<i>Casp3</i>	F: GAC TGC GGT ATT GAG ACA GA R: CGA GTG AGG ATG TGC ATG AA
<i>Bax</i>	F: TTC ATC CAG GAT CGA GCA G R: CTC GCT CAG CTT CTT GGT C
β -Aktin	F: AGG CCA ACC GTG AAA AGA TG R: ACC AGA GGC ATA CAG GGA CAA

RT-PCR reaksiyonu için 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Her bir hedef gen için ve referans gen için genlerin ekspresyonlarını kantite etmek amacıyla, optimize edilmiş gerçek-zamanlı PCR karışımı [7,5 μ L RNaz-free, 0,75 μ L'şer gene özgü forward ve

reverse primerler (Oligomer, Türkiye), 10 µL SYBR Green Mastermix (RealQ plus 2x master mix green, Danimarka)] hazırlandı. Her bir örnek için hazırlanan PCR karışımı 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı ve üzerine 1 µL cDNA örnekleri ilave edildi. Bu plaka RT-PCR cihazına yerleştirildi. Cihaz süre ve ısı ayarları, üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda 95°C’de 15 dakika, 95°C’de 30 saniye ve 60°C’de 30 saniye olarak 40 kez tekrar edecek şekilde ayarlandı. Reaksiyon sonucu ilgili genler arası mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimler, döngü eşiği (Ct) değerleri kullanılarak 2- $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre hesaplandı.

2.9. Histopatolojik İncelemeler

Mikroskopik değerlendirme için alınan karaciğer doku örnekleri %10’luk nötral formalin solüsyonu içerisinde 48 saat tespit edildi. Çeşme suyu altında yıkanan dokular otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020) düşükten-yüksek dereceli alkole doğru (50, 70, 80, 96’lık ve absolüt alkol) dehidre edildi ve ksilol ile şeffaflaştırıldı. Ksilollü parafin ve 56-58°C’de erimiş parafinde ikişer saat tutulan dokulardan parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklar rotary mikrotom (Leica RM 2155) ile kesildi, alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler su banyosu içerisinde lamlara alındı. Etüvde kurutulan kesitler ksilol serileri ile absolüt, 96, 80, 70 ve 50’lik alkollerden geçirilerek hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp (Luna, 1968) entallen yardımıyla lamelle kapatıldı. Işık mikroskobu (Nicon Eclipse Ci) altında incelendi ve sonrasında karaciğer örnekleri gruplar halinde mikroskop kamerası (Hayear®) ile fotoğrafları çekildi.

2.10. İstatiksel Analiz

İstatiksel değerlendirmeler yapılırken SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 27,0 paket programı kullanıldı. Bütün değerler ortalama $\pm$ standard sapma (Mean $\pm$ SD) şeklinde verildi. Kruskal-Wallis testi ikiden fazla gruplar arası karşılaştırmaların yapılmasında kullanıldı, Mann-Whitney U testi ise ikili grupların karşılaştırılması için kullanıldı, $p \leq 0,05$ ’den küçük değerler istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Embelinin Vücut ve Karaciğer Ağırlığı Üzerine Etkileri

Dietilnitrozamin verilerek karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda embelinin etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, S, E, DEN ve DEN + E grupların ilk-son vücut ağırlıkları, karaciğer ağırlıkları, karaciğer indeks düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Embelinin vücut ve karaciğer ağırlığı üzerine etkisi

Gruplar	S (n = 7)	E (n = 7)	DEN (n = 7)	DEN + E (n = 7)	P
İlk VA	252,2 ± 25,5	250,8 ± 15,9	253,2 ± 9,32	259,8 ± 11,0	0,494
Son VA	282,2 ± 11,5 ^a	276,4 ± 22,9	264,1 ± 7,35 ^a	275,4 ± 19,3	0,102
Karaciğer Ağırlığı	10,7 ± 1,11 ^{ab}	9,41 ± 0,32 ^a	10,5 ± 1,18	9,51 ± 0,74 ^b	0,028
Karaciğer İndeksi	3,78 ± 0,32	3,42 ± 0,32 ^a	3,99 ± 0,43 ^{ab}	3,47 ± 0,38 ^b	0,022

p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

^{a, b}: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki istatistiksel fark p≤0.05 düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin, VA: Vücut Ağırlığı.

Deneye başlamadan önce ratların başlangıç vücut ağırlığında anlamlı bir farklılık yoktu (p=0,494). Deney sonunda son vücut ağırlığında tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken (p=0,102), karaciğer ağırlığı ve indeks düzeylerindeki farklılıklar (p=0,028 ve p=0,022) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İkili karşılaştırmalarda, deney sonunda DEN grubunun vücut ağırlığının S grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (p=0,007), karaciğer indeks düzeyinin ise E ve DEN + E gruplarına göre arttığı görüldü (p=0,021 ve p=0,035). Sham grubuna göre E ve DEN + E gruplarının karaciğer ağırlıklarında anlamlı bir azalma saptandı (p=0,012 ve p=0,024) (Çizelge 3.1).

3.2. Embelinin Karaciğer Fonksiyon Düzeyleri Üzerine Etkileri

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların karaciğer enzim düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Embelinin karaciğer fonksiyon düzeyleri üzerine etkileri

Gruplar	S (n = 7)	E (n = 7)	DEN (n = 7)	DEN + E (n = 7)	P
AST (U/L)	121,5 ± 12,3 ^{ab}	117,0 ± 20,5 ^{cd}	156,5 ± 15,5 ^{ac}	146,2 ± 15,1 ^{bd}	0,001
ALT (U/L)	46,2 ± 6,13 ^{ab}	49,1 ± 8,09 ^c	67,8 ± 4,91 ^{ac}	56,3 ± 4,87 ^{bc}	<0,001
ALP (U/L)	285,4 ± 25,1 ^a	211,0 ± 39,5 ^{ab}	329,7 ± 38,7 ^a	289,4 ± 46,5 ^b	0,001
LDH (U/L)	1448,2 ± 163,7 ^{ab}	1152,3 ± 135,6 ^{ab}	2950,4 ± 283,2 ^{ac}	2001,9 ± 262,7 ^{bc}	<0,001
GGT (U/L)	1,84 ± 0,50 ^a	1,28 ± 0,21 ^{ab}	3,11 ± 0,63 ^{ab}	2,02 ± 0,64 ^b	0,001
TBİL (mg/dL)	0,13 ± 0,05 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	0,15 ± 0,01 ^{abc}	0,12 ± 0,02 ^c	0,030
Albümin (g/dL)	26,7 ± 1,08	26,5 ± 2,30	27,0 ± 2,27	26,5 ± 1,80	0,913

p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

a, b, c, d, Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki istatistiksel fark p≤0.05 düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin, AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, ALP: Alkalın Fosfataz, LDH: Laktat Dehidrogenaz, GGT: Gama-Glutamil Transferaz, TBİL: Total Bilirubin

Tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında serum albümin düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmezken (p=0,913), AST, ALT, ALP, LDH, GGT ve total bilirubin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p<0,05).

İkili karşılaştırmalarda ise S ve E gruplarına göre DEN ve DEN + E gruplarının serum AST (p=0,002; p=0,013 ve p=0,006; p=0,013; sırasıyla) ve ALT düzeylerinin yüksek olduğu görüldü (p=0,002; p=0,009 ve p=0,003; p=0,035; sırasıyla). Ayrıca DEN grubuna göre DEN + E grubunun ALT düzeylerinde anlamlı bir azalma görülürken (p=0,004), AST düzeylerindeki azalmanın ise anlamlı olmadığı tespit edildi (p=0,338). Serum ALP düzeyinin DEN grubunda S grubuna göre yüksek olduğu görüldü (p=0,030). Ancak DEN grubuna göre DEN + E grubunun ALP düzeyindeki azalma anlamlı değildi (p=0,096). Bunun yanında E grubunda serum ALP düzeyindeki azalmanın S, DEN, DEN + E gruplarına göre anlamlı olduğu saptandı (p=0,004; p=0,003 ve p=0,009; sırasıyla). Serum LDH düzeylerinin DEN ve DEN + E gruplarında S ve E gruplarına göre yüksek

olduğu bulundu ($p=0,002$; $p=0,002$; $p=0,002$; $p=0,002$; sırasıyla). Bunun yanında S grubuna göre E grubunun ($p=0,013$), DEN grubuna göre DEN + E grubunun serum LDH düzeyinin azaldığı saptandı ($p=0,003$). Serum GGT düzeyinin DEN grubunda S, E, DEN + E gruplara göre yüksek olduğu görüldü ($p=0,006$; $p=0,003$; $p=0,002$; $p=0,018$; sırasıyla). Ayrıca S, DEN ve DEN + E gruplarına göre E grubunun ($p=0,040$; $p=0,003$ ve $p=0,020$), DEN grubuna göre DEN + E grubunun serum GGT düzeyinin azaldığı saptandı ($p=0,018$). Serum total bilirubin düzeyinin DEN grubunda S, E ve DEN + E gruplarına göre daha yüksek olduğu bulundu ($p=0,031$, $p=0,006$ ve $p=0,027$). Bunun yanında ikili karşılaştırmada gruplar arasında serum albümin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 3.2).

3.3. Embelinin Lipid Profili Düzeyi Üzerine Etkileri

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların lipid metabolizmasına etki eden parametre düzeyleri (TG, TC, HDL ve LDL) karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3: Embelinin lipid profili düzeyi üzerine etkileri

Gruplar	S (n = 7)	E (n = 7)	DEN (n = 7)	DEN + E (n = 7)	P
TG (mg/dL)	62,0 ± 6,16 ^{ab}	46,0 ± 6,73 ^a	77,9 ± 2,96 ^{ab}	51,9 ± 6,10 ^b	<0,001
TC (mg/dL)	56,7 ± 3,28 ^a	50,0 ± 3,25 ^{ab}	60,0 ± 4,12 ^{ab}	54,6 ± 3,60 ^b	0,001
HDL (mg/dL)	32,2 ± 2,14	32,7 ± 4,14	29,9 ± 4,92	35,6 ± 4,72	0,236
LDL (mg/dL)	10,6 ± 0,63 ^a	8,78 ± 0,34 ^{ab}	17,5 ± 1,06 ^{ab}	10,5 ± 0,22 ^b	<0,001

p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

^{a, b}: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki istatistiksel fark $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin, TG: Trigliserit, TC: Total Kolesterol, HDL: Yüksek Dansiteli Kolesterol, LDL: Düşük Dansiteli Kolesterol

Tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında serum HDL düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmezken ($p=0,236$), TG, TC ve LDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$).

İkili karşılaştırmalarda ise serum TG, TC ve LDL düzeylerinin DEN grubunda S, E ve DEN + E gruplarına göre daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,05$). Embelin ve DEN

+ E gruplarında serum TG düzeyleri S ve DEN grubuna göre düşük olduğu görüldü ($p=0,010$; $p=0,004$ ve $p=0,020$, $p=0,004$; sırasıyla). Ayrıca S, DEN, DEN + E gruplarına göre E grubunun, DEN grubuna göre DEN + E grubunun serum TC ve LDL düzeylerinde anlamı bir azalma saptandı ($p<0,05$). Bunun yanında ikili karşılaştırmada diğer üç gruba göre DEN grubundaki HDL düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Çizelge 3.3).

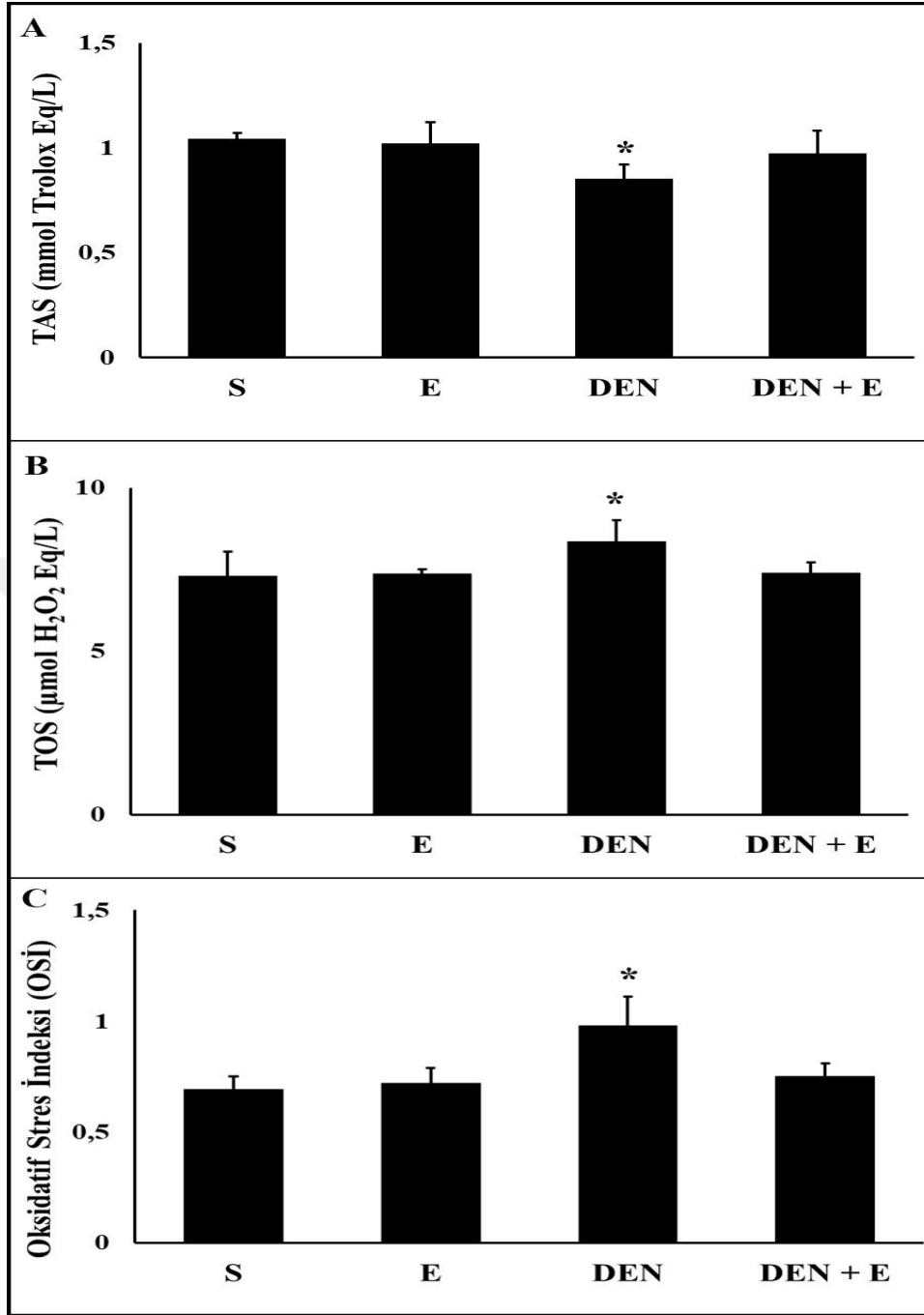
3.4. Embelinin Oksidatif Parametre Düzeyleri Üzerine Etkileri

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların serum TAS, TOS ve OSİ düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Şekil 3.1’de verilmiştir.

Serum TAS konsantrasyonları karşılaştırıldığında, S ($1,04 \pm 0,03$), E ($1,02 \pm 0,10$), DEN ($0,85 \pm 0,07$) ve DEN + E ($0,97 \pm 0,11$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,005$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, S, E ve DEN + E gruplarına göre DEN grubunun TAS konsantrasyonunun azaldığı gözlemlendi (sırasıyla $p=0,002$; $p=0,007$ ve $p=0,045$). Bunun yanında E ve DEN + E gruplarında S grubuna göre TAS konsantrasyonlarında farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 3.1A).

Serum TOS düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında, S ($7,28 \pm 0,77$), E ($7,34 \pm 0,13$), DEN ($8,35 \pm 0,65$) ve DEN + E ($7,38 \pm 0,33$) grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,017$). TOS düzeyleri bakımından gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, DEN grubunda S, E ve DEN + E gruplarına göre TOS düzeylerinin yüksek olduğu gözlemlendi, bu anlamlılıklar sırasıyla $p=0,013$; $p=0,018$ ve $p=0,010$ şeklindedir. Bunun yanında E ve DEN + E gruplarında S grubuna göre TOS düzeylerinde anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 3.1B).

Oksidatif stress indeks düzeyleri karşılaştırıldığında, S ($0,36 \pm 0,05$), E ($0,36 \pm 0,04$), DEN ($0,53 \pm 0,04$) ve DEN + E ($0,36 \pm 0,04$) gruplarının OSİ düzeylerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,002$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, S, E ve DEN + E gruplarına göre DEN grubunun OSİ düzeyindeki artışın anlamlı olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p=0,003$; $p=0,004$ ve $p=0,004$). (Şekil 3.1C).



Şekil 3.1: Embelinin oksidatif parametre düzeyleri üzerine etkileri

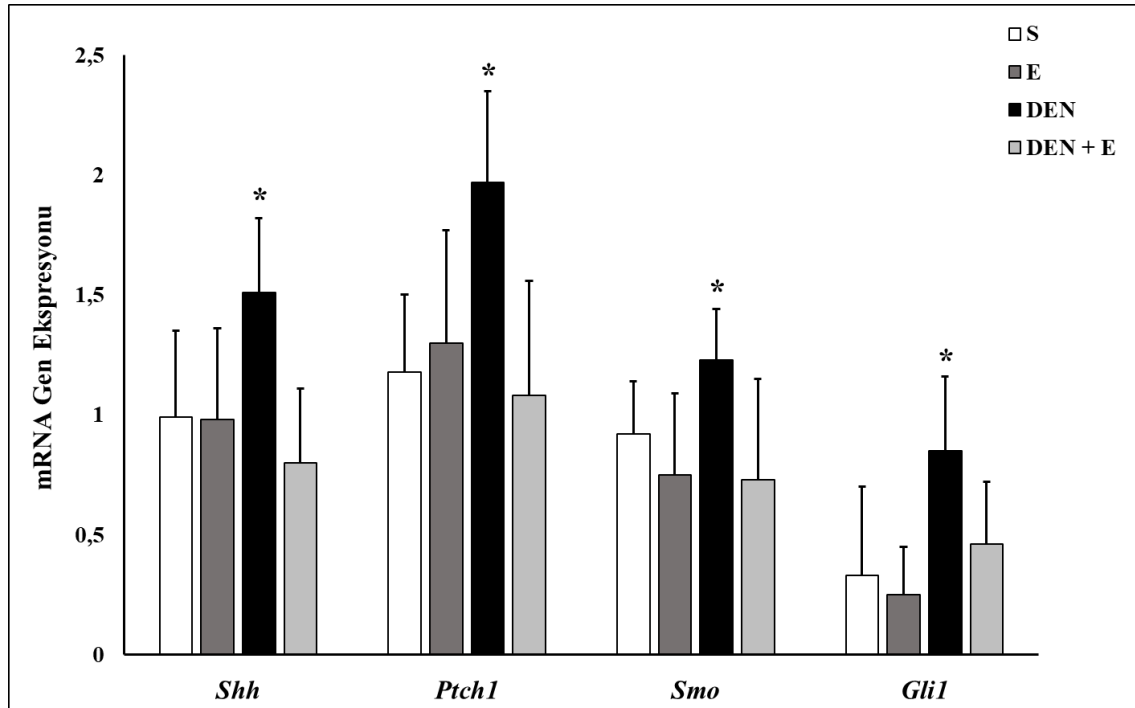
*; S, E ve DEN + E grupları ile DEN grubu arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

S: Sham, **E:** Embelin, **DEN:** Dietilnitrozamin, **DEN + E:** Dietilnitrozamin + Embelin, **TAS:** Total Antioksidan Status, **TOS:** Total Oksidan Status.

3.5. Embelinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkileri

3.5.1. *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* mRNA Gen Ekspresyonları

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların karaciğer dokusunda *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* gen mRNA gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* gen mRNA ekspresyon düzeyleri

*; S, E ve DEN + E grupları ile DEN grubu arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin, ***Shh***: Sonic hedgehog, ***Ptch1***: Patched Transmembran Proteini 1 (Protein Yamalı Homolog 1), ***Smo***: Smoothened, ***Gli1***: Glioma ile ilişkili Onkogen 1.

Karaciğer dokusunda *Shh* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($0,99 \pm 0,36$), E ($0,98 \pm 0,38$), DEN ($1,51 \pm 0,31$) ve DEN + E ($0,80 \pm 0,31$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,017$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Shh* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,016$; $p=0,032$ ve $p=0,003$; sırasıyla) (Şekil 3.2).

Karaciğer dokusunda *Ptch1* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,18 \pm 0,32$), E ($1,30 \pm 0,47$), DEN ($1,97 \pm 0,38$) ve DEN + E ($1,08 \pm 0,48$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,020$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Ptch1* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,006$; $p=0,037$ ve $p=0,010$; sırasıyla) (Şekil 3.2).

Karaciğer dokusunda *Smo* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($0,92 \pm 0,22$), E ($0,75 \pm 0,34$), DEN ($1,23 \pm 0,21$) ve DEN + E ($0,73 \pm 0,42$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,05$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Smo* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,025$; $p=0,025$ ve $p=0,037$; sırasıyla) (Şekil 3.2).

Karaciğer dokusunda *Gli1* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($0,33 \pm 0,37$), E ($0,25 \pm 0,20$), DEN ($0,85 \pm 0,31$) ve DEN + E ($0,46 \pm 0,26$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,018$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Gli1* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,025$; $p=0,010$ ve $p=0,025$; sırasıyla) (Şekil 3.2).

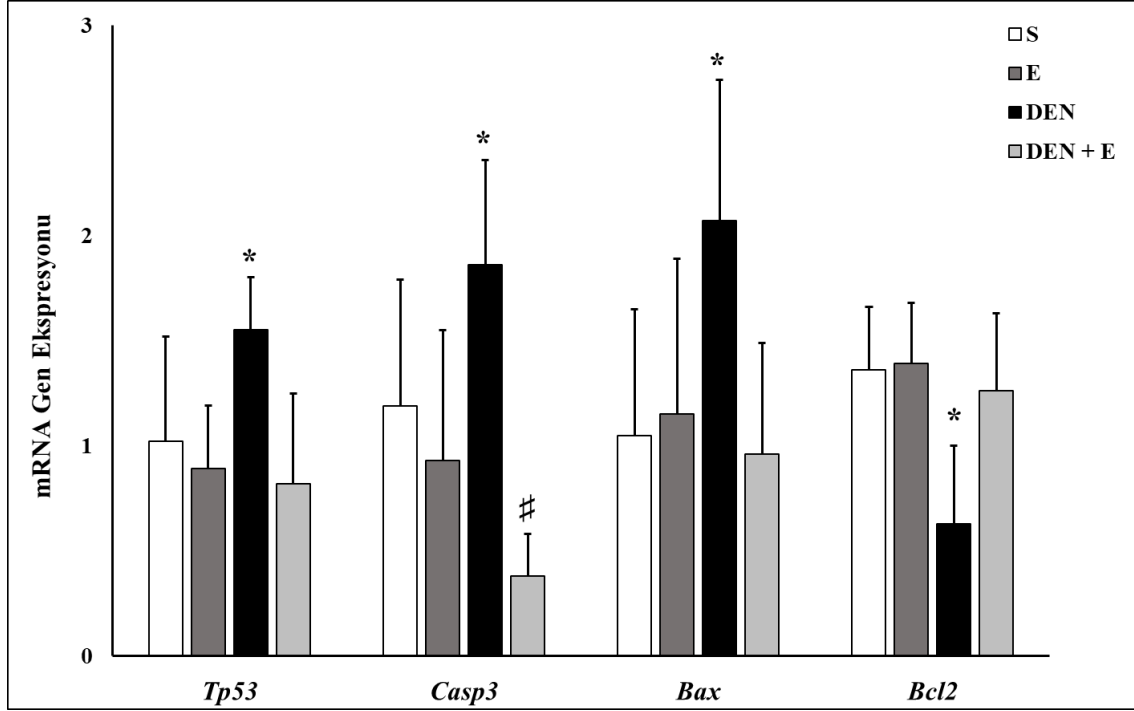
3.5.2. *Tp53*, *Casp3*, *Bax* ve *Bcl2* mRNA Gen Ekspresyonları

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların karaciğer dokusunda *Tp53*, *Casp3*, *Bax* ve *Bcl2* gen mRNA gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Şekil 3.3'de verilmiştir.

Karaciğer dokusunda *Tp53* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,02 \pm 0,50$), E ($0,89 \pm 0,30$), DEN ($1,55 \pm 0,25$) ve DEN + E ($0,82 \pm 0,43$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,015$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Tp53* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,046$; $p=0,004$ ve $p=0,009$; sırasıyla) (Şekil 3.3).

Karaciğer dokusunda *Casp3* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,19 \pm 0,60$), E ($0,93 \pm 0,62$), DEN ($1,86 \pm 0,50$) ve DEN + E ($0,38 \pm 0,20$) grupları

arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,003$). İkili karşılaştırmalarda DEN grubunun *Casp3* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,048$; $p=0,018$ ve $p=0,002$; sırasıyla). Bunun yanında DEN + E grubunun S grubuna göre *Casp3* gen mRNA gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı tespit edildi ($p=0,035$) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: *Tp53*, *Casp3*, *Bax* ve *Bcl2* gen mRNA ekspresyon düzeyleri

*; S, E ve DEN + E grupları ile DEN grubu arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

#; S grubu ile DEN + E grubu arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

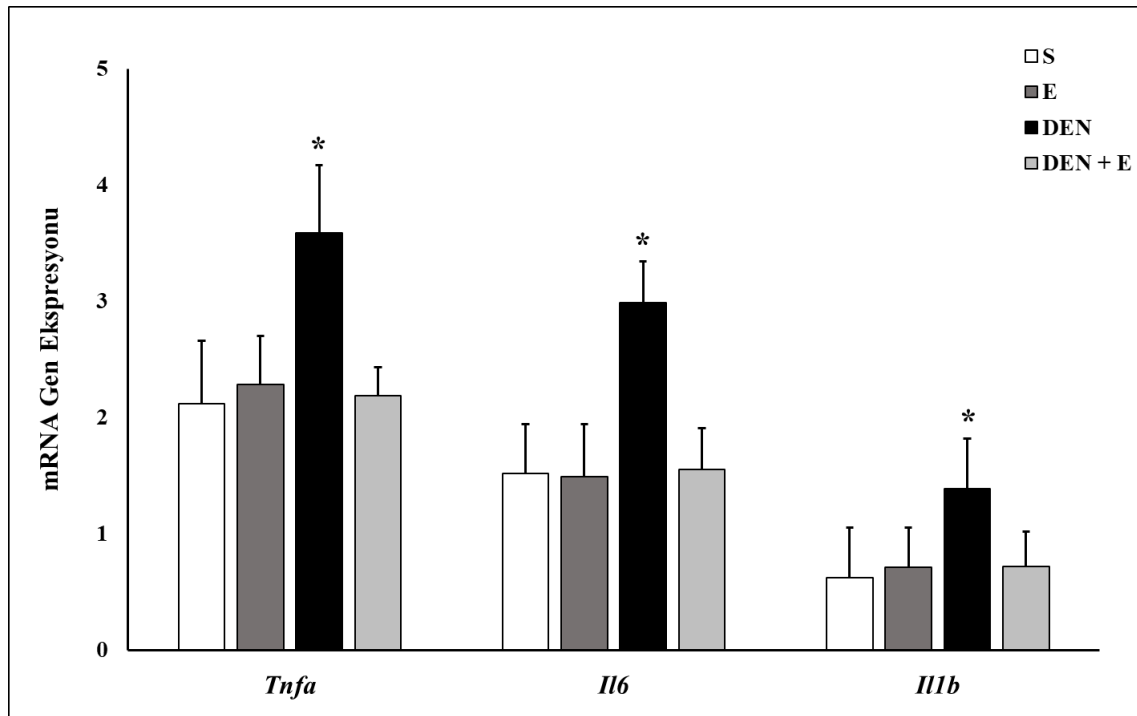
S: Sham, E: Embelin, **DEN**: Dietilnitrozamin, **DEN + E**: Dietilnitrozamin + Embelin, ***Tp53***: Tümör Baskılayıcı Protein 53, ***Casp3***: Caspase3, ***Bcl2***: B-Hücreli Lenfoma 2, ***Bax***: Bcl2 Benzeri X Protein

Karaciğer dokusunda *Bax* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,05 \pm 0,60$), E ($1,15 \pm 0,74$), DEN ($2,07 \pm 0,67$) ve DEN + E ($0,96 \pm 0,53$) grupları arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p=0,037$). DEN grubunun *Bax* mRNA gen ekspresyon düzeyinin S, E ve DEN + E gruplarına göre yüksek olduğu bulundu ($p=0,018$; $p=0,048$ ve $p=0,013$; sırasıyla). Bunun yanında *Bcl2* mRNA gen düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,36 \pm 0,30$), E ($1,39 \pm 0,29$), DEN ($0,63 \pm 0,37$) ve DEN + E ($1,26$

$\pm 0,37$) grupları arasındaki farklılık anlamlıydı ($p=0,013$). Diğer parametrelerin tersine DEN grubunda *Bcl2* gen ekspresyon düzeyindeki azalmasının S, E, DEN + E gruplarına göre anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla, $p=0,009$; $p=0,009$; $p=0,048$) (Şekil 3.3).

3.5.3. *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* mRNA Gen Ekspresyonları

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların karaciğer dokusunda *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen mRNA gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4: *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen mRNA ekspresyon düzeyleri

*; S, E ve DEN + E grupları ile DEN grubu arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin, *Tnfa*: Tümör Nekroz Faktörü- α , *Il6*: İnterlökin-6, *Il1b*: İnterlökin-1 Beta.

Karaciğer dokusunda *Tnfa* gen mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($2,12 \pm 0,54$), E ($2,28 \pm 0,42$), DEN ($3,59 \pm 0,58$) ve DEN + E ($2,19 \pm 0,24$) grupları arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Ayrıca karaciğer dokusunda *Il6* gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında S ($1,52 \pm 0,42$), E ($1,49 \pm 0,45$), DEN ($2,99 \pm$

0,35) ve DEN + E ($1,55 \pm 0,36$) gruplarının *Il6* gen düzeyleri arasında da farklılıklar vardı ($p=0,002$). Benzer şekilde *Il1b* gen ekspresyon düzeyleri S ($0,62 \pm 0,43$), E ($0,71 \pm 0,34$), DEN ($1,39 \pm 0,43$) ve DEN + E ($0,72 \pm 0,30$) grupları arasında anlamlıydı ($p=0,036$). İkili karşılaştırmalarda ise diğer gruplara göre DEN grubunun *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu, embelin gruplarında DEN grubuna göre bu gen ekspresyon düzeylerin azalmış olduğu bulundu ($p \leq 0,05$) (Şekil 3.4).

3.6. Embelinin Histopatolojik Parametre Düzeyleri Üzerine Etkileri

Sham, E, DEN ve DEN + E grupların karaciğer dokusunda histopatolojik parametre düzeyleri karşılaştırılarak gruplara ait sonuçlar Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4: Deney gruplarında embelinin histopatolojik bulgular üzerine etkisi

Gruplar	S (n = 7)	E (n = 7)	DEN (n = 7)	DEN + E (n = 7)	P
Konjesyon	$1,14 \pm 0,37^a$	$1,00 \pm 0,00^b$	$2,14 \pm 0,69^{ab}$	$1,42 \pm 0,53$	0,004
Pıhtı	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,00 \pm 0,00^b$	$0,14 \pm 0,37$	$0,57 \pm 0,53^{ab}$	0,018
Fibrozis	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,14 \pm 0,37$	$0,57 \pm 0,53^a$	$0,28 \pm 0,48$	0,093
Dejenerasyon	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,14 \pm 0,37^b$	$2,28 \pm 0,48^{ab}$	$1,42 \pm 0,53^{ab}$	<0,001
İnflamasyon	$0,14 \pm 0,37^a$	$0,14 \pm 0,37^b$	$2,00 \pm 0,81^{ab}$	$1,14 \pm 0,37^{ab}$	<0,001
Apoptoz	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,14 \pm 0,37^b$	$2,00 \pm 0,00^{ab}$	$1,42 \pm 0,53^{ab}$	<0,001
Kupffer	$0,42 \pm 0,53^a$	$0,57 \pm 0,53^b$	$2,00 \pm 0,00^{ab}$	$1,42 \pm 0,53^{ab}$	<0,001
Safra	$0,00 \pm 0,00^{ab}$	$0,00 \pm 0,00^{cd}$	$0,57 \pm 0,53^{ac}$	$0,57 \pm 0,53^{bd}$	0,013

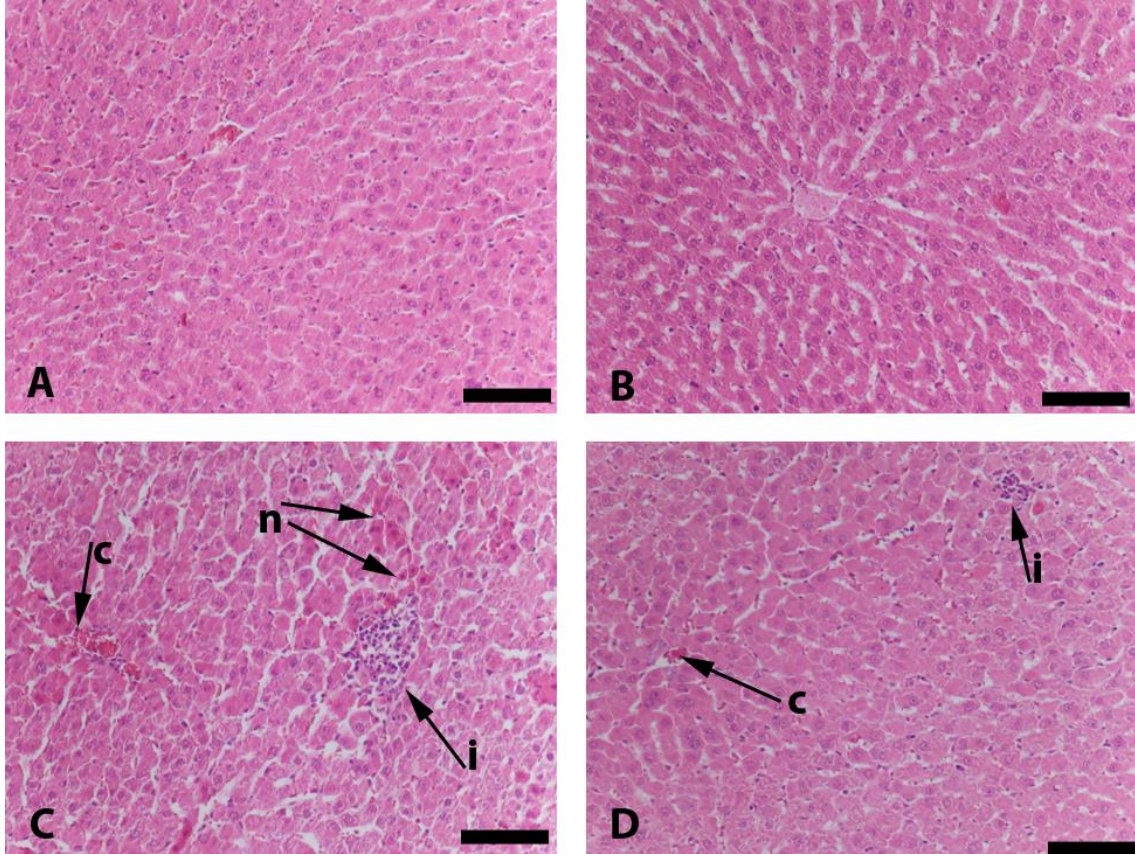
p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

^{a, b, c, d}: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki istatistiksel fark $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

S: Sham, E: Embelin, DEN: Dietilnitrozamin, DEN + E: Dietilnitrozamin + Embelin

Tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında karaciğer fibrozis düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmezken ($p=0,093$), diğer histopatolojik bulgularda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p \leq 0,05$). İkili karşılaştırmalarda S ve E gruplarında histopatolojik bulguları arasında herhangi bir farklılık görülmedi. Bunun yanında S grubunun karaciğer doku örneklerinin histolojik değerlendirmesinde bir lezyon bulunmadığı ve normal histolojik yapıda oldukları gözlemlendi. E grubu S grubuna çok benzeyen histopatolojik özelliklere sahipti. S grubuna göre DEN grubunun karaciğer

doku histolojisiinde konjesyon, dejenerasyon, inflamasyon, apoptozis, Kupffer hücre sayısı ve safra pigment birikiminde artış gözlendi. DEN + E grubunda DEN grubuna göre dejenerasyon, inflamasyon, apoptozis, Kupffer hücre sayısında azalma görülürken, S ve E gruplarına göre ise dejenerasyon, inflamasyon, apoptozis, Kupffer hücre sayısı ve safra pigment birikiminin daha fazla olduğu tespit edildi ( izelge 3.5) ( ekil 3.5).



Şekil 3.5: Gruplarındaki hayvanların karaciğerlerinin histopatolojik görünümü. HE boyası. Orijinal büyütme x 10. Ölçek  ubukları 100  m'yi temsil etmektedir.

A: Sham grubu, normal karaciğer dokusu. **B:** Embelin grubu, normal karaciğer dokusu. **C:** Dietilnitrozamin grubu, konjesyone damarlar, dejeneratif-nekrotik ve yangısal bulgular. **D:** Dietilnitrozamin + Embelin grubu, Dietilnitrozamin grubuna göre daha hafif bulgular. Oklarla gösterilen bulgular: n: nekrobiyotik-apoptotik hücreler; i: yangı; c: konjesyon.

4. TARTIŞMA

Nitrozaminler, nitritin yüksek sıcaklık veya asidik ortam gibi dış çevre koşulları yoluyla birincil, ikincil veya üçüncül amin öncülleri ile reaksiyona girmesiyle oluşan son derece güçlü karsinogen kimyasal bileşiklerden oluşan büyük bir gruptur (Altındağ vd., 2022). DEN, birçok hayvan türü için akut bir karaciğer toksini ve karsinogen bir ajandır. DEN'in içme suyu ile verilmesi veya oral gavaj ve intraperitoneal olarak uygulanmasının ratlarda hepatotoksik ve karsinogenik etki oluşturduğu belirlenmiştir (Gupta vd., 2016). Kemirgenlerde DEN ile uzun süreli oral beslenme, karaciğer tümörlerinin oluşumunda etkilidir. Tek doz DEN uygulaması (10–90 mg/kg vücut ağırlığı), kemirgenlerde geri döndürülemez bir karsinogenik etki oluşturmak için yeterlidir (Rajewsky vd., 1966; Tolba vd., 2015). DEN uygulamasıyla DNA hasarı 24 saat sonra bile ortaya çıkabilir (Farzaei vd., 2018). DEN'in oral veya parenteral uygulaması, çok düşük dozlarda bile karaciğerde ciddi hasara neden olur (Tolba vd., 2015). Bu nedenle, bu çalışma, intraperitoneal tek doz DEN (200 mg/kg) ile indüklenen karaciğer hasarı oluşturulan rat modelinde embelinin inflamatuvar ve apoptotik süreçler üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılmıştır.

Hayvanlarda vücut ve karaciğer ağırlığının araştırılması, karaciğerin patolojik durumunu değerlendirmede iki ön göstergedir. Karaciğer hasarı, iştahı ve gıda tüketimini azaltan bir hastalıktır (Hamza ve Al-Harbi, 2015). Çalışmamızda DEN grubundaki ratlarda, S grubuna göre vücut ağırlığında belirgin bir azalma görüldü. Bunun yanında E ve DEN + E gruplarına göre, DEN grubunda karaciğer indeks düzeyindeki artış anlamlyken, karaciğer ağırlığındaki artış anlamlı değildi. Buna göre DEN gruplarında vücut ağırlığının azalması, karaciğer indeks düzeylerinin artması karaciğer hasarı ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Yapılan bir çalışmada bizim çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak DEN verilen ratlarda vücut ağırlığında kayıp, karaciğer ağırlığında ise önemli bir artış olduğu gözlenmiştir (Kumar vd., 2022). Aynı bulgular önceki çalışmalarda da kaydedilmiştir (Sadik vd., 2008; Jayakumar vd., 2012). Yapılan çalışmalarda DEN'in neden olduğu karaciğer ağırlığındaki bu önemli artışın, metabolik aktivitedeki artışa (Assar vd., 2021) ya da karaciğer hücre hasarından kaynaklanan hücresel şişmeye ve karaciğerdeki yağlı değişikliklerine bağlı olabileceği vurgulanmıştır (Miller ve Zachary, 2017). Haftada 5 gün olacak şekilde 6 hafta boyunca içme suyuna 1

ppm/g vücut ağırlığı oranında DEN verilen Sprague Dawley ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada gruplarının ortalama vücut ağırlıklarında önemli bir değişiklik olmadığı görüldü (Poojari vd., 2010). Aynı çalışmada embelin ile tedavi edilen hayvanlarda karaciğer ağırlıklarında ve karaciğer indeks düzeylerinde, yalnızca DEN grubundaki artan ağırlıklara kıyasla önemli bir azalma kaydedildi. Çalışmamızda embelin verilen gruplarda karaciğer ağırlığında ve karaciğer indeks düzeylerinde azalma olduğu görüldü ve bu sonuçlar embelinin DEN'in neden olduğu hasara karşı iyileştirici özelliği olabileceğine yorumlandı.

Dietilnitrozaminin neden olduğu karaciğer hasarı genellikle karaciğer metabolizmasının instabilitesini yansıtır ve bu da serum enzim aktivitelerinde belirgin değişikliklere yol açar (Bulle vd., 1990). Aminotransferazlar (AST ve ALT), ALP, LDH ve GGT gibi hücre içi enzimler, karaciğer fonksiyonu için yararlı göstergelerdir ve artan seviyeleri karaciğer hasarının göstergeleridir. AST ve ALT karaciğerde bulunan ve karaciğer sağlığını değerlendirmede önemli olan enzimlerdir. Yüksek AST ve ALT seviyeleri genellikle karaciğer hasarına veya karaciğer hastalıklarına işaret eder (Limdi ve Hyde, 2003). Laktat Dehidrogenaz (LDH) glukozu enerjiye dönüştürdüğü kimyasal sürece yardımcı olan ve hızlandıran, hemen hemen tüm canlı hücrelerde bulunan ve organ veya doku zarar gördüğünde kana karışan bir enzimdir (Ramakrishnan vd., 2007). LDH enziminin kanda artışı, plazma membran bütünlüğünde ve/veya geçirgenliğinde spesifik olmayan bir değişikliği yansıtır. Genellikle solid tümörler olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde de LDH aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Lippert vd., 1981; Ramakrishnan vd., 2007). Hepatosit plazma zarına, esas olarak kanaliküler alana gömülü bir enzim olan GGT, glutatyonun glutamil grubunun transpeptidasyonu ve hidrolizinde, biyotransformasyonda, nükleik asit metabolizmasında ve karsinogenezde önemli bir rol oynar (Ma vd., 2014). Bu sitoplazmik enzimler, değişmiş zar geçirgenliği nedeniyle hepatosellüler hasar sırasında dolaşım sistemine aşırı miktarlarda salınır. Yapılan bir çalışmada, 200 mg/kg vücut ağırlığı tek doz DEN verilen ratlarda 16. haftanın sonunda serum AST, ALT, ALP, GGT hepatik belirteç enzimlerinin seviyesinde anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (Kumar vd., 2022). Başka bir çalışmada da DEN ile uygulanan ratlarda kontrole kıyasla karaciğer biyobelirteçlerinde (ALT, AST, GGT, ALP ve LDH) önemli bir artış gözlenmiştir (You vd., 2021). Farklı bir çalışmada da benzer sonuçlar

elde edilmiş olup kontrollere göre ratlara DEN uygulanması, daha önce bildirildiği gibi hepatoselüler hasarı gösteren ALT, AST ve ALP serum seviyelerinde belirgin bir artışa yol açtığı bulunmuştur (Rezaie vd. 2014). Bizim çalışmamızda ise karaciğer enzim düzeylerinin (AST, ALT, ALP, LDH, GGT) diğer gruplarla karşılaştırıldığında DEN grubunda artmış olduğu ve önceki çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü. Plazma membranının yırtılması ve hücrel hasardan sonra sitoplazmadan kan dolaşımına hızla salınması bu enzim düzeylerinin artmasına neden olduğu bilinmektedir (Bansal vd., 2000). Çalışmamızda bu enzimlerin serumdaki aktivitelerindeki artışın nedeni, DEN uygulamasından sonra hepatoselüler hasar sonucu bu sitozolik enzimlerin dolaşım sistemine sızması olabilir. Bu veriler bu çalışmanın deneysel karaciğer hasarı modelinin oluşturulmasında başarılı olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda oral embelin uygulamasının, artan karaciğer enzim aktivitelerini azalttığı gösterilmiştir (Singh vd., 2009). Bizim çalışmamızda özellikle E grubunda karaciğer enzim düzeylerinde azalma olduğu tespit edildi. DEN + E grubunda ise DEN grubuna göre serum ALT, LDH ve GGT düzeylerindeki azalmanın anlamlı olduğu, AST ve ALT düzeylerindeki azalmanın ise anlamlı olmadığı saptandı. Bu çalışma, embelin DEN'e bağlı karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda karaciğer enzim düzeylerini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir. Embelin karaciğer fonksiyonunun korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Serum biyokimyasal testlerinin rutin kullanımı, semptomların başlangıcından önce akut ve kronik karaciğer hasarının tespit edilmesini sağlar. Bu testler, hepatosellüler hasar belirteçlerinden (aminotransferazlar); karaciğer metabolizması testlerinden (total bilirubin); ve karaciğer sentetik fonksiyonu testlerinden (serum albümin) oluşur. Total bilirubin, protein, albümin ve globulin gibi proteinler enzimatik olmayan karaciğer belirteçleridir. Bilirubin, hem içeren proteinlerin parçalanmasından elde edilen doğal olarak oluşan bir pigmenttir. Albümin ise karaciğerden sentezlenen plazma proteindir (Woreta ve Alqahtani, 2014). Albüminin inflamatuvar süreçte çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Plazmada, albümin miktarı karaciğer sağlığının iyi bir göstergesidir. Yapılan bir çalışma, albüminin *in vitro* olarak doğrudan hepatosellüler karsinomu büyümesinde inhibitör özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Nojiri ve Joh, 2014). Bunun

yanında hepatosellüler karsinomlu hastalar üzerinde benzer bir etkiye sahip olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (Carr vd., 2016). Yapılan çalışmalarda, DEN kaynaklı hepatosellüler karsinom rat modelinde karaciğer enzimlerinin (AST, ALT, ALP ve total bilirubin) yükselmesine ve serum albümin düzeylerinde azalmasına bağlı olarak karaciğer işlev bozukluklarının olduğu gösterilmiştir (El-Magd vd., 2019; Ding vd., 2021; Kumar vd., 2022). Başka bir çalışma, AST, ALT, ALP ve total bilirubin düzeylerinin artması ve albümin düzeylerinin azalması hepatositlerin hasar gördüğünü ve ilişkili karaciğer fonksiyonlarında hasar olduğunu göstermektedir (Abdelhady vd., 2017). Siroz veya kronik karaciğer hastalığında, düşük serum albümin düzeylerinin ileri karaciğer hastalığının bir işareti olabileceği ve bununla birlikte, düşük serum albümini karaciğer hastalığına özgü olmadığı ve yetersiz beslenme, enfeksiyonlar, nefrotik sendrom veya protein kaybeden enteropati gibi diğer durumlarda ortaya çıkabildiği tespit edilmiştir (Longo ve Fauci, 2010). Bizim çalışmamızda, DEN gruplarında total bilirubin düzeylerinde artış olduğu, ancak albümin düzeylerinde önemli bir farklılık olmadığı gösterildi. Serum albüminin yaklaşık 21 günlük uzun bir yarı ömre sahip olduğu ve günde yaklaşık % 4'ünün bozulduğu bilinmektedir. Uzun yarı ömrü nedeniyle, akut viral hepatit veya ilaca bağlı karaciğer hasarı gibi akut karaciğer hastalığında serum albümin seviyeleri etkilenmeyebilir (Woreta ve Alqahtani, 2014). Buna göre, çalışmamızda gruplarda albümin düzeylerinde farklılıkların görülmemesinin nedeni bu olabilir. Ayrıca embelin verilen gruplarda da albümin düzeylerinde bir farklılık bulunmazken, total bilirubin düzeylerinin DEN grubuna göre azaldığı saptandı. Ratlara 25 mg/kg dozda oral verilen embelinin serum toplam bilirubin ve toplam protein seviyelerinin stabilize ederek, hepatik hücrelerin fonksiyonel durumunu iyileşme sağladığı gösterilmiştir (Singh vd., 2009).

Hepatosellüler karsinomun gelişimi ayrıca plazma lipid ve lipoprotein metabolizmasındaki bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir (Jiang vd., 2006). Tümör gelişimi, hücresel fonksiyonu ve büyümeyi etkileyen lipid metabolizmasındaki değişikliklerle ilişkilidir (Das vd., 1998). Rat karaciğerinde hepatosit nodüllerinin gelişimi, lipid parametrelerindeki ve oksidatif durumdaki değişikliklerle ilişkilidir (Abel vd., 2009). Malign dokudaki lipid profillerindeki değişiklikler, membran bütünlüğü, akışkanlığı ve büyüme ve hücre sağkalımı ile ilgili hücresel süreçlerin düzenlenmesi

üzerindeki etkileri nedeniyle önemlidir (Bartsch vd., 1999; Tapiero vd., 2002). Kolesterol seviyesindeki artış, membran akışkanlığını artırır, membran geçirgenliğini düzenler ve iç viskoziteyi ve ayrıca iç kimyasal bileşimi değiştirir (Afzal vd., 2012). Yapılan çalışmalarda DEN uygulanan gruplarda, kontrole göre, HDL düzeylerinde azalma, TG, TC ve LDL serum düzeylerinde önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (Afzal vd., 2012; Jiang vd., 2018; Eisa vd., 2022; Amudha vd., 2023). Lipid profilindeki değişikliğin, TG birikiminden, karaciğerde sentezlenen veya plazma lipitlerinden elde edilen kolesterolden safra asidi sentezinin inhibisyonundan kaynaklanıyor olabileceği ve bu da kolesterol düzeyinde artışa yol açabileceği bilinmektedir (Gupta vd., 2014). Çalışmamızda lipid metabolizması düzeylerinin (TG, TC ve LDL) DEN grubunda anlamlı olarak arttığı, ancak HDL düzeyindeki azalmanın anlamlı olmadığı görüldü. Bu sonuçlar, DEN uygulamasından sonra ratlarda TG ve TC düzeylerinde artış olduğunu bildiren önceki literatürle uyumludur (Afzal vd., 2012; Jiang vd., 2018; Eisa vd., 2022; Amudha vd., 2023). DEN'e bağlı karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda embelinin serum lipid düzeyleri üzerine etkisini gösteren literatür bulunmamaktadır. Ancak yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada embelin tedavisinin vücut ağırlığı ve yağ kazanımını azalttığını, serum lipid seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Chaudhari vd., 2012; Gao vd., 2017). Çalışmamızda diğer üç gruba göre E grubunun, DEN grubuna göre DEN + E grubunun serum lipid düzeylerinin azaldığı saptandı. Bu araştırmada embelinin lipid profilini koruduğu gözlenmiştir, bu nedenle embelinin karaciğer hasarının ilerlemesinin inhibisyonunda rol oynayabileceği öne sürülebilir.

Reaktif oksijen türleri (ROS), endojen veya eksojen kaynaklardan oluşur, oldukça reaktif, toksik ve mutajeniktir (Halliwell, 1994). DEN'in serbest radikaller ürettiği gösterilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Karaciğerde oluşan hasar sonucu serbest radikal oluşumu antioksidan durumu bozar ve sonuçta oksidatif strese ilerleyerek karsinogeneze giden yolu açar (Gey, 1993). DEN'in karaciğer hasarına ve tümöre neden olmasını sağlayan ana faktör, bu maddenin oksidatif strese ve DNA, lipitler ve proteinlere zarar veren ROS üretme olasılığının yüksek olmasıdır. DEN'in bu faktörleri oluşturabilmesi için, önce vücut içindeki sitokrom p450 adı verilen bir enzim tarafından metabolize edilmesi gerekir, bu da DEN'in hücre zarının lipid peroksidasyonuna ve alkilasyon yoluyla DNA eklentilerine yol açan yüksek seviyelerde ROS üretmesini

sağlar, bu da hücre hasarı ve yaralanmasına neden olur (Gupta vd., 2016). Antioksidanlar, ilaç metabolize edici enzimlerin indüksiyonu, prostaglandin sentezinin inhibisyonu, karsinojen kaynaklı mutajenezin inhibisyonu ve serbest radikallerin temizlenmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Hirose vd., 1994). Antioksidanlar, ROS oluşumunu önleyerek, ROS'un neden olduğu onarımı kolaylaştırarak ve diğer antioksidanların etkin çalışması için kofaktörler sağlayarak zarı ROS toksisitesinden koruyabilir (Sen, 1995). Tümör gibi yaşamı tehdit eden hastalıkların gelişimi, bu antioksidanların mevcudiyeti ile bağlantılıdır (Gutteridge, 1994). Doğal antioksidanlar, ROS üretimini inhibe edebilir ve böylece ilişkili hücre içi oksidatif stresi azaltabilir (Feng vd., 2001). DEN uygulamasının çeşitli oksidan ve antioksidan parametreler üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar bulunmasına rağmen (Sadık vd., 2008; Jayakumar vd., 2012), TAS, TOS ve OSİ düzeyleri ile ilişkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bir çalışmada (Sadık vd., 2008), 15 hafta boyunca haftada beş kez 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda DEN verilen grupta serum TAS düzeyinin artışın DEN tarafından oluşan oksidatif strese karşı adaptif bir yanıt olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda DEN grubunda antioksidatif parametre (TAS) düzeyinin azalması, oksidatif parametre (TOS ve OSİ) düzeylerinin ise artmış olması ratlarda DEN'e bağlı karaciğer hasarının oluşmasının bir göstergesi olabilir. Embelin verilen gruplarda ise S grubuna göre bir değişme gözlenmezken, DEN grubuna göre TAS düzeyinin arttığı, TOS ve OSİ düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Sonuçlarımız embelin ile tedavinin antioksidan etkiler yoluyla karaciğer hasarına karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir.

Karaciğer tümörü patogenezinde oksidatif stres, inflamasyon ve bağışıklık reaksiyonu gibi bir dizi faktörün rol oynadığı varsayılmaktadır (Ha vd., 2010). İnflamasyon, vücudun doku hasarı ve enfeksiyon gibi durumlara verdiği tepkidir. Vücudun inflamatuvar yanıtında, endotel geçirgenliğinin artması, inflamatuvar hücrelerin interstisyel boşluğa göçünün artması ve TNF-a ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımı gibi durumlar ortaya çıkar (Altındağ vd., 2022). IL-6'nın bazı tümör türleri ve inflamasyon ilişkili çeşitli hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Karaciğerin metabolik fonksiyonlarında rol oynayan IL-6'nın sinyal yollarının kalıcı aktivasyonu karaciğer için zararlıdır ve tümör gelişimine yol açabilir (Calabrese ve Rose-John, 2014). IL-6, özellikle karaciğer tümörünü tetikleyen iyi bilinen bir inflamatuvar ve tümör oluşturu

sitokindir (Nakagawa vd., 2014). Hem karaciğer tümöründe hem de sirozda IL-6 düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Xiang vd., 2018). TNF-a, IL-6'ya benzer şekilde, neoplastik hücrelere karşı sitotoksik ve sitostatik etkileri de içeren geniş bir fonksiyon spektrumu ile karakterize edilen proinflamatuvar bir sitokindir (Vassalli, 1992). TNF-a, aktive edilmiş makrofajlar, endotel hücreleri, fibroblastlar ve lenfositler tarafından sentezlenir; tümör nekrozuna, karaciğer akut faz reaktanların sentezine ve inflamasyona neden olur (Dursunoğlu ve Dursunoğlu, 2018). Nitrozaminler hücrenin mitokondriyal metabolizmasını etkileyerek ROS ve antioksidanların dengesizliğine neden olur. Bu durum oksidatif strese neden olabilirler ve deney hayvanlarında karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılırlar (Fuentes-Hernández vd., 2019). Önceki çalışmalar, inflamasyonun önemli belirteçleri olan TNF-a, IL-6 ve IL-1 β serum düzeylerinin ve ekspresyonunun DEN uygulaması ile arttığını ortaya koymuştur (Jiang vd., 2018; Mansour vd., 2019; Ding vd., 2021; Akree vd., 2023). Önceki çalışmalarla tutarlı olarak, bu çalışmada DEN grubunda karaciğerde *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen ekspresyon düzeylerinin artmış olduğunu ve DEN'in inflamasyonu indüklediğini gözlemledik. Bunun yanında embelin gruplarında DEN grubuna göre bu gen ekspresyon düzeylerin azalmış olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak, çalışmamızda DEN uygulamasıyla *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gibi inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon artışı ratlarda karaciğer hasarını tetikleyebilir. Buna bağlı olarak, embelin inflamatuvar mediyatörlerin salınımını kontrol ederek DEN'nin neden olduğu karaciğer hasarını iyileştirdiğini ve anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Tümör baskılayıcı gen p53 (Tp53), çeşitli streslere yanıt olarak aktive edilen ve hücre döngüsü durması, apoptoz ve/veya yaşlanmanın indüksiyonundan sorumlu olan güçlü bir transkripsiyon faktörüdür (Bieging vd., 2014). p53'ün birincil işlevi, genetik kararsızlıklara sahip dönüştürülmüş hücrelerin ortaya çıkmasını önlemektir ve bu nedenle tümörün başlangıcını ve gelişimini önlemede esastır (Nag vd., 2014). Tipik olarak, hücresel p53 seviyeleri düşüktür, ancak p53 proteini, DNA hasarına yanıt olarak fosforile edilir ve çekirdekte birikir. Bu, hücre döngüsünün durmasına ve/veya apoptozun indüksiyonuna yol açabilir (Schafer, 1998; Fridman ve Lowe, 2003). Fonksiyonel bir p53 bu nedenle DEN'e yanıt olarak hepatosit ölümünü indükleyebilir. Buna karşılık, işlevsel olmayan p53, yetersiz DNA onarımına ve DNA hasarlı veya mutasyona uğramış

hücrelerin çoğalmasına yol açabilir. p53, dışsal ve içsel yollarla apoptotik sinyallerin bir parçası olan çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenler (Riley vd., 2008). p53, Bax veya Bcl2 gibi apoptozda yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (Hickman vd., 2002). p53 ayrıca transkripsiyondan bağımsız yollarla apoptozu indükler (Ho vd., 2019). p53'ün mitokondriye göç ettiği ve anti-apoptotik proteinler Bcl2 ve Bcl-xL'ye bağlanarak doğrudan mitokondriyal dış zar geçirgenliğini indüklediği, efektör proteinler Bax salınmasını ve aktivasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Chen, 2016). Bcl2 protein ailesi proapoptotik faktörleri düzenler ve hücrenin ölüm ve yaşama kapasitesini belirlemede hayati bir role sahiptir (Tse vd., 2008). Antiapoptotik Bcl2 proteinleri aşırı eksprese edildiğinde apoptozu inhibe ederek hücre ömrünü uzatabilirken, proapoptotik proteinler (Bax ve kaspazlar) hücre ölümü indükleyicileri olarak işlev görebilir (Kale vd., 2018). Bax normalde sitoplazmada bulunur, ancak hücre ölümünü teşvik etmek için mitokondriye yer değiştirir; bununla birlikte, Bax'ın aktivitesi Bcl2 gibi anti-apoptotik faktörler tarafından nötralize edilir (Edlich vd., 2011). Çok sayıda tümör hücresinde *Bcl2* ve *Bcl-xL* ekspresyonu artarak apoptozun önlendiği bilinmektedir (Danial ve Korsmeyer, 2004). Dokularda *Casp3* ekspresyonunun varlığı apoptozun en önemli göstergelerinden biridir (Choudhary vd., 2015). Apoptoz, normal fizyolojik sürecin yanı sıra organizma için bir tehdit olarak kabul edilen hücrelerin ortadan kaldırılması için de gereklidir. Apoptoz, bağışıklık sistemi hastalıklarında, tümör oluşumunda ve oksidatif stres varlığında ortaya çıkar (Coşkun ve Özgür, 2011). DEN'in neden olduğu karaciğer hasarında, hücre proliferasyonunun yanı sıra hepatik hücre ölümü de meydana gelir (Mansour vd., 2019). Önceki çalışmalar, DEN'in hücre apoptozunu indüklediğini göstermiştir (Gupta vd., 2010). Yapılan bir çalışmada, DEN ile hepatosellüler karsinoma indüklenen ratlarda anti-apoptotik protein seviyelerinde (*Bcl2*, *Bcl-xL*) artış görülürken, pro-apoptotik (*Bax*), *p53*, *Casp3* ve *Casp9* protein seviyeleri azalmıştır (Perumal vd., 2018). Başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, DEN'in *Bcl2*'yi önemli ölçüde artırarak ve *Bax* ve *Casp3*'ü azaltarak apoptozu inhibe ettiğini, bu etkinin tümör hücresi çoğalmasını teşvik ettiği ve hücre sağkalımını artırdığı bildirilmiştir (Pfeffer ve Singh, 2018; Subramaniam vd., 2019). DEN verilen ratlarda gözlenen değişikliklerin aksine, çalışmamızda DEN grubunun karaciğer dokusunda *tp53*, *Casp3*, *Bax* mRNA gen ekspresyon düzeyleri artarken, *Bcl2* gen ekspresyonu azalmıştır. Buna göre ratlarda DEN'in neden olduğu karaciğer hasarı,

Bcl2'nin azalması, *Bax* artışı ve *Casp3* aktivasyonu ile ilişkili olabilir. Sonuçlarımız, DEN ile indüklenen karaciğer hasarı oluşturulan ratların karaciğerinde *tp53*, *Bax*'a bağımlı *Casp3* düzeyinin aktive edilmesi ve *Bcl2* gen ekspresyonunun azaltılması apoptozu tetiklemiş olabilir. Bir çalışmada *p53*'ün *Bcl2*'nin ekspresyonunu baskıladığını ve böylece *Bcl2*'nin aracılık ettiği sağkalım sinyallerini bloke ederek apoptoza katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (Miyashita vd., 1994; Miyashita ve Reed, 1995). Bu bağlamda çalışmamızda DEN grubunda *Bcl2* gen ekspresyon düzeylerinin azalmasının nedeni, artan *tp53*'ün *Bcl2* ekspresyonunu baskılamasından kaynaklanmış olabilir. Embelin verilen gruplarda ise *Casp3* gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı saptandı. Özellikle bu *Casp3* düzeyindeki azalma DEN + E grubunda S grubuna göre daha belirgindi. Bunun yanında embelin gruplarında *tp53*, *Bax*, gen ekspresyon düzeylerinde azalma, *Bcl2* düzeylerinde artma görüldü. Buna göre embelin, anti-apoptotik yolu aktive ederek DEN'e bağlı apoptotik sinyalleşmeyi önleyebilir ve anti-apoptotik etkiye sahip olabilir.

Sonic hedgehog (Shh), ilk olarak *Drosophila* türlerinde keşfedilen bir salgı sinyal proteindir. Shh sinyal yolu, çeşitli kök hücre tiplerinin hem çoğalmasını hem de farklılaşmasını düzenlemesi sebebiyle embriyogenez sırasında kritik öneme sahiptir (Nusslein-Volhard ve Wieschaus, 1980; Ruch ve Kim, 2013). Shh sinyalleme yolu ayrıca karaciğer dahil olmak üzere yetişkin dokuda yara iyileşme tepkilerini düzenler (Hooper ve Scott, 2005; Varjosalo vd., 2006). Shh sinyali, Shh'ye yanıt veren hedef hücrelerde ekprese edilen bir hücre yüzeyi reseptörü olan Ptch ile Shh ligandın etkileşimi ile başlatılır. Bu etkileşim, Ptch'nin başka bir molekül olan Smo aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkilerini ortadan kaldırır ve glioblastoma (Gli) ailesi transkripsiyon faktörleri (Gli1, Gli2, Gli3) tarafından aracılık edilen hücre içi sinyallerin yayılmasına izin verir. Aktive olan Gli proteinleri sitoplazmadan çekirdeğe taşınır ve hücre döngüsünün kontrolü, sinyal iletimini, anjiyogenezi ve apoptoz dahil olmak üzere hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Choudhry vd., 2014; Rimkus vd., 2016). Shh sinyal yolunun düzensizliği çeşitli hastalıkların patogenezinde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Çalışmalar, Shh sinyal yolunun anormal aktivasyonunun karaciğer tümörü, karaciğer fibrozu ve non-alkolik yağlı karaciğer hasarı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Gao vd., 2018; Kumar vd., 2019). Örneğin, hepatosellüler karsinom dokularında *Shh*, *Ptch*, *Smo* ve *Gli1*'in ekspresyonunun arttığı ve bu yolağın anormal aktivasyonu bilinmektedir (Cheng vd.,

2016). Aktifleştirilmiş Shh sinyal yolu tümör boyutuyla ilişkilidir ve ayrıca hepatosellüler karsinomun invazyonu ve metastazıyla yakından ilişkilidir (Lu vd., 2012). Öte yandan, Shh sinyal yolunun Gli inhibitörleri veya hedgehog antagonistleri tarafından inhibisyonunun hepatosellüler karsinom hücre canlılığını veya hücre büyümesini *in vitro* ve *in vivo* azalttığı gösterilmiştir ve bu da Shh sinyal yolunun inhibisyonunun potansiyel terapötik etkilerini düşündürmektedir (Chen vd., 2011). Yapılan çalışmada *Shh*, *Ptch* ve *Gli1* protein ekspresyonuna sahip hücrelerin çoğunlukla hiperplastik nodül, neoplastik nodül, interlobüler safra kanalının epitelleri ve preneoplastik dokularda dağıldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, Shh sinyal yolunun karaciğer karsinogenezi sırasında aktive olduğunu ve aktive olan Shh sinyal yolunun *siklin B1* ve *siklin bağımlı kinaz 1* proteininin ekspresyonunu artırarak hücre çoğalmasını desteklediğini ve bunun da sonunda karaciğer tümörünün gelişmesine yol açtığı bulunmuştur (Cai vd., 2016).. Çalışmamızda ise, diğer gruplarla karşılaştırıldığında DEN grubunun karaciğer dokusunda *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* mRNA gen ekspresyon düzeyleri artmıştır. Bu da bir önceki çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Bulgularımıza göre, Shh sinyal yolağının aktive olması ve karaciğer dokusunda gen ekspresyon düzeylerinin artması DEN'e bağlı karaciğer hasarının gelişmesine yol açmış olabilir. Bununla birlikte embelin verilen gruplarda ise bu gen ekspresyon düzeyleri azalmıştır. DEN'e bağlı karaciğer hasarı ve Shh sinyal yolağı üzerine embelinin etkilerini araştıran herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Ancak bir çalışmada Shh proteini, iki pankreas karsinomu hücre hattında embelinin anti-proliferatif etkilerini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuş ve embelinin Shh yolunu baskılayarak pankreas karsinomu hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği ifade edilmiştir (Huang vd., 2014). Sonuçlarımıza göre, embelin karaciğer dokularında *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* mRNA ekspresyon seviyelerini azaltarak DEN'e bağlı karaciğer hasarından sonra hepatositlerin yenilenmesine ve karaciğerin yeniden organizasyonuna yardımcı olabilir. Bununla birlikte, bu konunun aydınlatılabilmesi için embelinin Shh sinyalini nasıl düzenlediği ve embelinin karaciğer ve çeşitli dokularda diğer moleküllerle veya sinyal yolaklarıyla Shh sinyali üzerindeki etkisi gösteren farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dokularda oksidatif strese bağılı hücre hasarı oluşturan DEN, karaciğerde nekroza ve ardından fibroza neden olan toksik ajanlardan biri olarak kabul edilir (Rodriguez vd., 2020). Hepatosellüler nekroza, DEN'in neden olduğu karaciğer hasarında artmış hücre proliferasyonu eşlik eder (Mansour vd., 2019). Önceki çalışmalarda, DEN verilen hayvanların karaciğer dokusunun histopatolojik değerdendirmesinde hücresel infiltrasyon, dejenerasyon ve nekroz gibi patolojik değışiklikler bildirilmiştir (Kang vd., 2013; Khan vd., 2017; Altındağ vd., 2022). İçme suyu ile 27 hafta boyunca DEN (100 mg/L) verilen ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada hayvanların karaciğerlerinin 6 hafta sonunda nodülsüz pürüzsüz yüzeyli görünümde olduğu, ancak 9 ile 27 hafta aralığında ise hepatosellüler karsinoma özellikleri olarak karaciğerin periferik yüzeyinde kademeli genişleme ve birkaç grimsi beyaz nodül ve odaklar oluştđu gösterilmiştir (Fathy vd., 2017). Literatüre uygun olarak çalışmamızda DEN verilen ratların karaciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, dejenerasyon, konjesyon, apoptozis ve fibrozis gözlenmiştir. Poojari vd. (2010), DEN'in neden olduğu karaciğer hasarında gözlenen preneoplastik odakların, patolojik dejeneratif değışikliklerin, fokal preneoplastik lezyonların insidansının embelin tedavisi ile azaldığını bildirmiştir (Poojari vd., 2010). DEN + E ve özellikle E gruplarında karaciğerde DEN kaynaklı histopatolojik bulguların önemli ölçüde azaldığını bulduk. Bulgularımız literatür ile uyumludur.

Sonuç olarak, ratlara tek doz 200 mg/kg doz DEN uygulanarak gerçekleştirilen bu çalışmada, DEN'in karaciğerde neden olduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar embelin tedavisi ile önemli ölçüde azalabileceğı ve karaciğer hasarını hafifletebileceğı moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerle doğrulanmıştır. Bunun yanında, sonuçlarımız embelinin karaciğerde tedavi edici etkisi, TAS düzeyini artırarak anti-oksidan, *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* düzeyini azaltarak anti-inflamatuvar, *Tp53*, *Bax*, *Casp3* gen ekspresyonunu azaltarak anti-apoptotik özellikleri ve Shh sinyal yolunun aktivasyonunun azaltılmasına bağılı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, DEN'e bağılı karaciğer hasarına karşı embelin yeni bir terapötik ajan olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Deneye başlamadan önce ratların başlangıç vücut ağırlığında anlamlı bir değişme gözlenmedi.
2. DEN grubunun vücut ağırlığı S grubuna göre anlamlı olarak azalırken, karaciğer indeks düzeyi ise E ve DEN + E gruplarına göre artmıştır.
3. Sham grubuna göre E ve DEN + E gruplarının karaciğer ağırlıkları anlamlı olarak azaldı.
4. Karaciğer fonksiyon düzeylerinin (AST, ALT, ALP, LDH, GGT ve total bilirubin) diğer gruplarla karşılaştırıldığında DEN grubunda artmış olduğu bulundu. Bunun yanında özellikle E grubunda bu parametrelerde azalma olduğu tespit edildi. DEN + E grubunda ise DEN grubuna göre serum ALT, LDH ve GGT düzeylerindeki azalmanın anlamlı olduğu, AST ve ALT düzeylerindeki azalmanın ise anlamlı olmadığı saptandı. Serum albümin düzeylerinde ise tüm gruplarda bir farklılık görülmedi.
5. Serum lipid düzeylerinin (TG, TC ve LDL) DEN grubunda anlamlı olarak arttığı, ancak HDL düzeyindeki azalmanın anlamlı olmadığı görüldü. Diğer gruplara göre E grubunun, DEN grubuna göre DEN + E grubunun serum lipid düzeylerinin azaldığı izlendi.
6. DEN grubunda antioksidatif parametre (TAS) düzeyi azalırken, oksidatif parametre (TOS ve OSI) düzeyleri ise artmıştır. Embelin verilen gruplarda ise S grubuna göre bir değişme gözlenmezken, DEN grubuna göre TAS düzeyinin arttığı, TOS ve OSI düzeylerinin azaldığı tespit edildi.
7. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında DEN grubunun karaciğer dokusunda *Shh*, *Ptch1*, *Smo* ve *Gli1* mRNA gen ekspresyon düzeyleri artmış olduğu, embelin verilen gruplarda ise bu gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı görüldü.
8. S, E ve DEN + E grupları ile karşılaştırıldığında DEN grubunun karaciğer dokusunda *Tp53*, *Casp3*, *Bax* mRNA gen ekspresyon düzeyleri artarken, *Bcl2* gen ekspresyonu azalmıştı. Embelin gruplarında ise *Tp53*, *Casp3*, *Bax* gen ekspresyon düzeylerinde azalma, *Bcl2* düzeylerinde artma görüldü.
9. Diğer gruplara göre DEN grubunun *Tnfa*, *Il6* ve *Il1b* gen ekspresyon düzeylerinin artmış olduğu, embelin gruplarında DEN grubuna göre bu gen ekspresyon düzeylerin azalmış olduğu bulundu.

10. DEN verilen ratların karaciğer dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, dejenerasyon, konjesyon, apoptozis ve fibrozis gözlemlendi. DEN + E ve özellikle E gruplarında karaciğerde DEN kaynaklı histopatolojik bulgularının önemli ölçüde azaldığı görüldü.
11. Gelecekte bu konunun tam olarak aydınlatılması için DEN hasarına bağlı embelinin farklı dozlarda ve uygulama şekillerinde karaciğer dışında diğer dokular üzerine akut ve kronik etkilerinin inceleneceği çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. KAYNAKLAR

- Abel, S., De Kock, M., van Schalkwyk, D.J., Swanevelder, S., Kew, M.C., Gelderblom, W.C. (2009). Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 81(5-6): 391-399.
- Abdelhady, D., El-Abasy, M., Abou-Asa, S., Elbially, Z., M. Shukry, M., Hussein, A., Saleh, A.A., El-Magd, M. (2017). The ameliorative effect of aspergillus awamori on aflatoxin B1-induced hepatic damage in rabbits. *World Mycotoxin J*, 10: 363-73.
- Afzal, M., Kazmi, I., Gupta, G., Rahman, M., Kimothi, V., Anwar, F. (2012). Preventive effect of Metformin against N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular carcinoma in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(4): 365-370.
- Ahmed, O.M. (2016). Relationships between oxidative stress, cancer development and therapeutic interventions. *Journal of Cancer Science and Research*, 1(1): e104.
- Agrawal, S., Chauhan, S., Mathur, R. (1986). Antifertility effects of embelin in male rats. *Andrologia*, 18(2): 125-131.
- Aiub, C.A., Pinto, L.F., Felzenszwalb, I. (2003). N-nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett*, 145 (1): 36-45.
- Aiub, C.A., Pinto, L.F., Felzenszwalb, I. (2009). DNA-repair genes and vitamin E in the prevention of N-nitrosodiethylamine mutagenicity. *Cell Biol. Toxicol*, 25: 393-402.
- Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. (2006). Chemopreventive activity of a macrofungus Phellinus rimosus against N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *J Exp Ther Oncol*, 5(4): 309-21.
- Akree, L.S., Amin, Z.A., Ahmad, H.O. (2023). In silico and in vivo hepatoprotective activity of the synthesized 5-benzylidene-2-thiohydantoin against diethylnitrosamine-induced liver injury in a rat model. *Scientific Reports*, 13(1): 4681.
- Alam, M.S., Ahad, A., Abidin, L., Aqil, M., Mir, S.R., Mujeeb, M. (2018). Embelin-loaded oral niosomes ameliorate streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 97: 1514-1520.
- Altındağ, F., Boğokşayan, S., Bayram, S. (2022). Eumelanin protects the liver against diethylnitrosamine-induced liver injury. *Toxicology*, 480: 153311.
- Amudha, P., Jayalakshmi, M., Vidya, R., Poojitha, B.N. (2023). Chemopreventive and Therapeutic Efficacy of Enhalus acoroides against Diethylnitrosamine Induced Hepatocellular Carcinoma in Wistar Albino Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(4): 2597-2617.
- Arboatti, A.S., Lambertucci, F., Sedlmeier, M.G., Pisani, G., Monti, J., Álvarez, M.L., Francés, D.E. A., Ronco, M.T., Carnovale, C.E. (2018). Diethylnitrosamine Increases Proliferation in Early Stages of Hepatic Carcinogenesis in Insulin-Treated Type 1 Diabetic Mice. *BioMed Research international*, 9472939.
- Arora, R., Deshmukh, R. (2017). Embelin Attenuates Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Behavioral, Biochemical, and Neurochemical Abnormalities in Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(9): 6670-6680.

- Assar, D.H., Mokhbatly, A.A., Ghazy, E.W., Ragab, A.E., Abou Asa, S., Abdo, W., Elbially, Z.I., Mohamed, N.E., El-Far, A.H. (2021). Ameliorative Effects of *Aspergillus awamori* against the Initiation of Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine in a Rat Model: Regulation of Cyp19 and p53 Gene Expression. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6): 922.
- Badamaranahalli, S.S., Koppam, M., Bhagawati, S.T., Durg, S. (2015). Embelin lipid nanospheres for enhanced treatment of ulcerative colitis - Preparation, characterization and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76: 73-82.
- Badmanaban, R., Padathil, M.S., Majeed, S., D.M., Parveen, H.A. (2019). Review on Plant Derived Multitarget Therapeutic Phytomolecule–Embelin. *Wor J Current Med Phar Res*, 1: 166.
- Bansal, A.K., Trivedi, R., Soni, G.L., Bhatnagar, D. (2000). Hepatic and renal oxidative stress in acute toxicity of N-nitrosodiethylamine in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(9): 916-920.
- Bansal, P., Bhandari, U., Ahmad, S. (2020). Embelin from *Embelia ribes* ameliorates oxidative stress and inflammation in high-fat diet-fed obese C57BL/6 mice. *Phcog Mag*, 16(5): 443-449.
- Bartsch, H., Pignatelli, B., Calmels, S., Ohshima, H. (1993). Inhibition of nitrosation, In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*. Springer, Boston, USA, p: 27-44.
- Basha, N.J., Basavarajaiah, S.M., Baskaran, S., Kumar, P. (2022). A comprehensive insight on the biological potential of embelin and its derivatives. *Natural Product Research*, 36(12): 3054-3068.
- Basilico, N., Monti, D., Oliaro, P., Taramelli, D. (1997). Non-iron porphyrins inhibit beta-haematin (malaria pigment) polymerisation. *FEBS Letters*, 409(2): 297-299.
- Bayraktar, N., Gökçe, R., Ergün, Ö. (1998). Gıdalarda Nitrat ve Nitrit Kalıntılarının İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1-2): 105-106.
- Bedale, W., Sindelar, J.J., Milkowski, A.L. (2016). Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat Science*, 120: 85-92.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Food chemistry. 4th ed., Springer, Berlin.
- Bezu, K., Bisrat, D., Asres, K. (2015). In vivo antimalarial evaluation of embelin and its semi-synthetic aromatic amine derivatives. *Phcog J*, 7(5): 305-310.
- Bhandari, U., Jain, N., Ansari, M. N., Pillai, K.K. (2008). Beneficial effect of *Embelia ribes* ethanolic extract on blood pressure and glycosylated hemoglobin in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Fitoterapia*, 79(5): 351-355.
- Bhandari, U., Kumar, H., Chaudhari, S., Khanna, G., Najmi, A.K. (2013). Antidiabetic effects of *Embelia ribes* extract in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *FrontLife Sci*, 7(3-4):186-196.
- Bhuvanendran, S., Kumari, Y., Othman, I., Shaikh, M.F. (2018). Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. *Frontiers in Pharmacology*, 9: 665.
- Bhuvanendran, S., Bakar, S.N.S., Kumari, Y., Othman, I., Shaikh, M.F., Hassan, Z. (2019). Embelin Improves the Spatial Memory and Hippocampal Long-Term Potentiation in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Scientific Reports*, 9(1): 14507.

- Bieging, K.T., Mello, S.S., Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14: 359-370.
- Brendler, S.Y., Tompa, A., Hutter, K.F., Preussmann, R., Pool-Zobel, B.L. (1992). In vivo and in vitro genotoxicity of several N-nitrosamines in extrahepatic tissues of the rat. *Carcinogenesis*, 13: 2435-2441.
- Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L., Boffetta, P. (2012). Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. *Food and chemical toxicology: British Industrial Biological Research Association*, 50(10): 3646-3665.
- Bulle, F., Mavie, P., Zafrani, E.S., Preaux, A.M., Lescs, M.C., Siegrist, S., Dhumeaux, D., Guellaën, G. (1990). Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 11(4): 545-550.
- Cai, H., Li, H., Li, J., Li, X., Li, Y., Shi, Y., Wang, D. (2016). Sonic hedgehog signaling pathway mediates development of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biology*, <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5463-6>.
- Calabrese, L.H., Rose-John, S. (2014). IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 10(12): 720-727.
- Carr, B.I., Guerra, V., Giannini, E.G., Farinati, F., Ciccarese, F., Rapaccini, G.L., Di Marco, M., Benvegnù, L., Zoli, M., Borzio, F., Caturelli, E., Masotto, A., Trevisani, F. (2016). A Liver Index and its Relationship to Indices of HCC Aggressiveness. *Journal of Integrative Oncology*, 5(4): 178.
- Caruso, F., Rossi, M., Pedersen, J.Z., Incerpi, S. (2020a). Computational studies reveal mechanism by which quinone derivatives can inhibit SARS-CoV-2. Study of embelin and two therapeutic compounds of interest, methyl prednisolone and dexamethasone. *Journal of infection and public health*, 13(12): 1868-1877.
- Caruso, F., Rossi, M., Kaur, S., Garcia-Villar, E., Molasky, N., Belli, S., Sitek, J.D., Gionfra, F., Pedersen, J.Z., Incerpi, S. (2020b). Antioxidant Properties of Embelin in Cell Culture. Electrochemistry and Theoretical Mechanism of Scavenging. Potential Scavenging of Superoxide Radical through the Cell Membrane. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(5): 382.
- Chakraborty, T., Chatterjee, A., Rana, A., Srivastawa, S., Damodaran, S., Chatterjee, M. (2007). Cell proliferation and hepatocarcinogenesis in rat initiated by diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital: potential roles of early DNA damage and liver metallothionein expression. *Life Sci*, 81: 489-499.
- Charrois, J., Boyd, J.M., Froese, K.L., Hrudey, S.E. (2011). Occurrence of N-nitrosamines in Alberta public drinking-water distribution systems. *J Environ Eng Sci*, 6: 103-114.
- Chaudhuri, A., Behan, P.O. (2004). Fatigue in neurological disorders. *Lancet (London, England)*, 363(9413): 978-988.
- Chaudhari, H.S., Bhandari, U., Khanna, G. (2012). Preventive effect of embelin from embelia ribes on lipid metabolism and oxidative stress in high-fat diet-induced obesity in rats. *Planta Medica*, 78(7): 651-657.
- Chaudhari, H.S., Bhandari, U., Khanna, G. (2013). Embelia ribes extract reduces high fat diet and low dose streptozotocin-induced diabetic nephrotoxicity in rats. *EXCLI Journal*, 12, 858-871.
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a026104.

- Chen, Y.J., Lin, C.P., Hsu, M.L., Shieh, H.R., Chao, N.K., Chao, K.S. (2011). Sonic hedgehog signaling protects human hepatocellular carcinoma cells against ionizing radiation in an autocrine manner. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 80(3): 851-859.
- Chen, X., Gao, M., Jian, R., Hong, W.D., Tang, X., Li, Y., Zhao, D., Zhang, K., Chen, W., Zheng, X., Sheng, Z., Wu, P. (2020). Design, synthesis and α -glucosidase inhibition study of novel embelin derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1): 565-573.
- Cheng, W.T., Xu, K., Tian, D.Y., Zhang, Z.G., Liu, L.J., Chen, Y. (2009). Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 34(3): 829-836.
- Chitra, M., Sukumar, E., Suja, V., Devi, C.S.S. (1994). Antitumor, anti-Inflammatory and analgesic property of embelin, a plant product. *Chemotherapy*, 40: 109-113.
- Chitra, M., Devi, C.S., Sukumar, E. (2003). Antibacterial activity of embelin. *Fitoterapia*, 74(4): 401-403.
- Choudhary, G.S., Al-Harbi, S., Almasan, A. (2015). Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods in Molecular Biology*, 1219: 1-9.
- Choudhry, Z., Rikani, A.A., Choudhry, A.M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M.W., Sarfraz, M. K., Haider, K., Shafiq, A.A., Mobassarrah, N.J. (2014). Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of Neurosciences*, 21(1): 28-31.
- Cooney, R.V., Ross, P.D., Bartolini, G.L., Romseyer, J. (1987). N-nitrosamine formation: Factors influencing the aqueous reactions of nitrogen oxide with morfoline. *Environ Sci.* 21: 77-83.
- Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arch Med Rev J*, 20: 145-158.
- Coutelle, O., Hornig-Do, H.T., Witt, A., Andree, M., Schiffmann, L.M., Piekarek, M., Brinkmann, K., Seeger, J.M., Liwschitz, M., Miwa, S., Hallek, M., Krönke, M., Trifunovic, A., Eming, S.A., Wiesner, R.J., Hacker, U.T., Kashkar, H. (2014). Embelin inhibits endothelial mitochondrial respiration and impairs neoangiogenesis during tumor growth and wound healing. *EMBO Molecular Medicine*, 6(5): 624-639.
- Dai, Y., Jiao, H., Teng, G., Wang, W., Zhang, R., Wang, Y., Hebbard, L., George, J., Qiao, L. (2014). Embelin reduces colitis-associated tumorigenesis through limiting IL-6/STAT3 signaling. *Molecular cancer therapeutics*, 13(5): 1206-1216.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2): 205-219.
- Danquah, M., Duke, C.B., Patil, R., Miller, D.D., Mahato, R.I. (2012). Combination therapy of antiandrogen and XIAP inhibitor for treating advanced prostate cancer. *Pharmaceutical Research*, 29(8). 2079-2091.
- Dar, K.K., Ali, S., Ejaz, M., Nasreen, S., Ashraf, N., Gillani, S.F., Shafi, N., Safeer, S., Khan, M.A., Andleeb, S., Mughal, T.A. (2019). In vivo induction of hepatocellular carcinoma by diethylnitrosoamine and pharmacological intervention in Balb C mice using *Bergenia ciliata* extracts. *Brazilian journal of biology. Revista Brasileira de Biologia*, 79(4): 629-638.

- Das, U.N., Madhavi, N., Sravan Kumar, G., Padma, M., Sangeetha, P. (1998). Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 58(1):39-54.
- De La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P. (2017). Mechanisms and kinetics of tryptophan N-nitrosation in a gastro-intestinal model. *Food Chem*, 218: 487-495.
- Deshmukh, P.T., Gupta, V.B. (2013). Embelin accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. *Journal of Asian Natural Products Research*, 15(2): 158-165.
- Dhanjal, J.K., Nigam, N., Sharma, S., Chaudhary, A., Kaul, S.C., Grover, A., Wadhwa, R. (2014). Embelin inhibits TNF- α converting enzyme and cancer cell metastasis: molecular dynamics and experimental evidence. *BMC Cancer*, 14: 775.
- Ding, Z., Johanningsmeier, S.D., Price, R., Reynolds, R., Truong, V.D., Payton, S.C., Breidt, F. (2018). Evolution of nitrate and nitrite content in pickled fruit and vegetable products. *Food Control*, 90: 304-311.
- Ding, S., Deng, Y., Bond, T., Fang, C., Cao, Z., Chu, W. (2019). Disinfection byproduct formation during drinking water treatment and distribution: A review of unintended effects of engineering agents and materials. *Water Research*, 160: 313-329.
- Ding, J., Qi, C., Li, J., Huang, C., Zhang, J., Zhang, Y., Li, Y., Fan, B. (2021). Se-Methylselenocysteine Alleviates Liver Injury in Diethylnitrosamine (DEN)-Induced Hepatocellular Carcinoma Rat Model by Reducing Liver Enzymes, Inhibiting Angiogenesis, and Suppressing Nitric Oxide (NO)/Nitric Oxide Synthase (NOS) Signaling Pathway. *Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 27: e929255.
- Doel, J.J., Benjamin, N., Hector, M.P., Rogers, M., Allaker, R.P. (2005). Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *Eur J Oral Sci*, 113: 14-19.
- Donovan, P.J., Smith, G.T. (2008). Urethane and N-nitrosodiethylamine are mutagenic for the Syrian hamster fetus. *Mutation Research*, 657(2): 160-163.
- Durg, S., Veerapur, V.P., Neelima, S., Dhadde, S.B. (2017a). Antidiabetic activity of Embelia ribes, embelin and its derivatives: A systematic review and meta-analysis. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 86: 195-204.
- Durg, S., Vandal, R., Dhadde, S.B., Thippeswamy, B.S., Veerapur, V.P., Badami, S. (2017b). Antipsychotic activity of embelin isolated from Embelia ribes: A preliminary study. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 90: 328-331.
- Dursunoğlu, D., Dursunoğlu, N. (2018). İnflamasyon, endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler biyo-belirteçler ve uykuda solunum bozuklukları. *Türkiye Klin J Cardiol-Spec Top*, 11: 47-53.
- Dwivedi, D., Singh, V. (2015). Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of Streptococcus mutans. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(1): 57-61.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, 145(1): 104-116.
- EFSA, 2008. Nitrate in vegetables. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal*, 689: 1-79.

- Elias, T., Lee, L. H., Rossi, M., Caruso, F., Adams, S.D. (2021). In Vitro Analysis of the Antioxidant and Antiviral Activity of Embelin against Herpes Simplex Virus-1. *Microorganisms*, 9(2): 434.
- El-Magd, M.A., Mohamed, Y., El-Shetry, E.S., Elsayed, S.A., Abo Gazia, M., Abdel-Aleem, G.A., Shafik, N.M., Abdo, W.S., El-Desouki, N.I., Basyony, M.A. (2019). Melatonin maximizes the therapeutic potential of non-preconditioned MSCs in a DEN-induced rat model of HCC. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114: 108732.
- EPA, 2016. Six-Year Review 3 Technical Support Document for Nitrosamines, EPA 810-R-16-009, USA.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, 37(4): 277-85.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38(12): 1103-11.
- Eisa, M.A., Mansour, A.M., Abdelghany, T.M., Salama, S.A. (2022). Silymarin ameliorates diethylnitrosamine induced liver fibrosis in wistar rats. *Az J Pharm Sci*, 66: 246-266.
- Fahrer, J., Christmann, M. (2023). DNA Alkylation Damage by Nitrosamines and Relevant DNA Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5): 4684.
- Fararjeh, A.S., Tu, S.H., Chen, L.C., Cheng, T.C., Liu, Y.R., Chang, H.L., Chang, H.W., Huang, C.C., Wang, H.R., Hwang-Verslues, W.W., Wu, C.H., Ho, Y.S. (2019). Longterm exposure to extremely low-dose of nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induce non-malignant breast epithelial cell transformation through activation of the $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptormediated signaling pathway. *Environ Toxicol*, 34: 73-82.
- Fathy, A.H., Bashandy, M.A., Bashandy, S.A.E., Mansour, A.M., Elsayed, B. (2017). Sequential analysis and staging of a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in male Wistar albino rat model. *Can J Physiol Pharmacol*, 95(12): 1462-1472.
- Farzaei, M.H., Zobeiri, M., Parvizi, F., El-Senduny, F.F., Marmouzi, I., Coy-Barrera, E., Naseri, R., Nabavi, S.M., Rahimi, R., Abdollahi, M. (2018). Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients*, 10(7): 855.
- Feng, Q., Kumagai, T., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., Uchida, K. (2001). Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. *Free Radic Res*, 35: 779-788.
- Feresin, G.E., Tapia, A., Sortino, M., Zacchino, S., de Arias, A.R., Inchausti, A., Yaluff, G., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. (2003). Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3): 241-247.
- Ferreria, G.M., Laddha, K.S. (2013). Histochemical localization of embelin in fruits of *Embellia Ribes Brum* and its quantification. *Int J Pharma Biosci Technol*, 1:16-19.
- Feskens, E.J., Sluik, D., van Woudenberg, G.J. (2013). Meat consumption, diabetes, and its complications. *Curr Diab Rep*, 13: 298-306.
- Frabouleta, I., Chahen, L., Lestremat, F., Grimstvedt, A., Schallert, B., Moeller, B.C., Järvinen, E. (2016). Round Robin Tests on Nitrosamines Analysis in the Effluents of a CO₂ Capture Pilot Plant. *Energy Procedia*, 86: 25-261.
- Fu, X., Pang, X., Qi, H., Chen, S., Li, Y., Tan, W. (2016). XIAP inhibitor Embelin inhibits bladder cancer survival and invasion in vitro. *Clinical & Translational Oncology*, 18(3): 277-282.

- Fuentes-Hernández, S., Alarcón-Sánchez, B.R., Guerrero-Escalera, D., Montes-Aparicio, A.V., Castro-Gil, M.P., Idelfonso-García, O.G., Rosas-Madrigal, S., Aparicio-Bautista, D.I., Pérez-Hernández, J. L., Reyes-Gordillo, K., Lakshman, M.R., Vázquez-Garzón, V.R., Baltiérrez-Hoyos, R., López-González, M.L., Sierra-Santoyo, A., Villa-Treviño, S., Pérez-Carreón, J.I., Arellanes-Robledo, J. (2019). Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 378: 114611.
- Fridman, J.S., Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22: 9030-9040.
- Gandhi, G.R., Stalin, A., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., Paulraj, M.G., Vishal, R. (2013). Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(1): 2243-2255.
- Gangolli, S.D., van den Brandt, P.A., Feron, V.J., Janzowsky, C., Koeman, J.H., Speijers, G.J., Spiegelhalder, B., Walker, R., Wisnok, J.S. (1994). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology*, 292(1). 1-38.
- Gao, Y., Li, J., Xu, X., Wang, S., Yang, Y., Zhou, J., Zhang, L., Zheng, F., Li, X., Wang, B. (2017). Embelin attenuates adipogenesis and lipogenesis through activating canonical Wnt signaling and inhibits high-fat diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*, 41(5): 729-738.
- Gao, L., Zhang, Z., Zhang, P., Yu, M. Yang, T. (2018). Role of canonical Hedgehog signaling pathway in liver. *Int J Biol Sci*, 14: 1636-1644.
- Gey, K.F. (1993). Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. *Br Med Bull*, 49: 679-699.
- Githui, E.K., Makawiti, D.W., Midiwo, J.O. (1991). Changes in the concentrations of testosterone, luteinising hormone and progesterone associated with administration of embelin. *Contraception*, 44(3): 311-317.
- Gough, T.A., McPhail, M.F., Webb, K.S., Wood, B.J., Coleman, R.F. (1977). An examination of some foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines. *J Sci Food Agric*, 28(4): 345-351.
- Griesenbeck, J.S., Steck, M.D., Huber, J.C., Sharkey, J.R., Rene, A.A., Brender, J.D. (2009). Development of estimates of dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines for use with the Short Willet Food Frequency Questionnaire. *Nutr J*, 6(8): 16.
- Griess, P. (1864). On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. *Phil Trans R Soc Lond*, 154: 667e731.
- Gupta, S., Sanyal, S. N., Kanwar, U. (1989). Antispermato-genic effect of embelin, a plant benzoquinone, on male albino rats in vivo and in vitro. *Contraception*, 39(3): 307-320.
- Gupta, S., Sanyal, S. N., Kanwar, U. (1990). Changes in glucose/amino acid/calcium uptake and brush-border membrane-associated enzymes in rat small intestine after the administration of embelin (plant benzoquinone), an antifertility agent. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36(2), 153-164.
- Gupta, S.K.U., Sanyal, S.N. (1991). Biodistribution of embelin, a benzoquinone of male antifertility potential. *Fitoterapia*, 62: 419-428.
- Gupta, S., Sanyal, S., Kanwar, U. (1991). Effects of embelin, a male antifertility agent, on absorptive and digestive functions of rat intestine. *Journal of Ethnopharmacology*, 33(3): 203-212.

- Gupta, C., Vikram, A., Tripathi, D.N., Ramarao, P., Jena, G.B. (2010). Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat. *Phytotherapy Research*, 24(1): 119-128.
- Gupta, R., Sharma, A.K., Sharma, M.C., Gupta, R.S. (2012). Antioxidant activity and protection of pancreatic β -cells by embelin in streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Diabetes*, 4(3): 248-256.
- Gupta, G., Krishna, G., Chellappan, D.K., Gubbiyappa, K.S., Candasamy, M., Dua, K. (2014). Protective effect of pioglitazone, a PPAR γ agonist against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393(1-2): 223-228.
- Gupta, P., Bhatia, N., Bansal, M.P., Koul, A. (2016). Lycopene modulates cellular proliferation, glycolysis and hepatic ultrastructure during hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 8(29), 1222-1233.
- Gushgari, A.J., Halden, R.U., Venkatesan, A.K. (2017). Occurrence of N-Nitrosamines in US Freshwater Sediments near Wastewater Treatment Plants. *J Hazard Mater*, 323: 109e115.
- Gutteridge, J.M. (1994). Antioxidants, nutritional supplement and life threatening diseases. *Br J Biomed Sci*, 51: 288-295.
- Ha, H.L., Shin, H.J., Feitelson, M.A., Yu, D.Y. (2010). Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(48): 6035-6043.
- Hajer, G.R., van Haeften, T.W., Visseren, F.L. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24): 2959-2971.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344: 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: Cheeseman, K.H. (ed) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, p: 144-147.
- Hamza, R.Z., Al-Harbi, M.S. (2015). Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and Nigella sativa extract supplements. *Asian Pac J Trop Med*, 5(7): 521-531.
- Harish, G.U., Danapur, V., Jain, R., Patell, V.M. (2012). Endangered medicinal plant Embelia ribes Burm. f.-a review. *Pharmacognosy Journal*, 4: 6-19.
- Herrmann, S.S., Granby, K., Duedahl-Olesen, L. (2015). Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*, 174, 516-26.
- Hickman, E.S., Moroni, M.C., Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(1): 60-66.
- Hirose, M., Imaida, K., Tamano, S. (1994). Cancer chemoprevention by antioxidants. In: Ho CT (ed) *Food phytochemicals: teas, spices and herbs*. American Chemical Society Press, Washington, p: 122-132.
- Ho, T., Tan, B.X., Lane, D. (2019). How the other half lives: What p53 does when it is not being a transcription factor. *Int J Mol Sci*, 21: 13.
- Hooper, J.E., Scott, M.P. (2005). Communicating with hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 306-17.
- Hord, N.G., Tang, Y., Bryan, N.S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 90: 1-10.

- Hossan, M.S., Fatima, A., Rahmatullah, M., Khoo, T.J., Nissapatorn, V., Galochkina, A.V., Slita, A.V., Shtro, A.A., Nikolaeva, Y., Zarubaev, V.V., Wiart, C. (2018). Antiviral activity of *Embelia ribes* Burm. f. against influenza virus in vitro. *Archives of Virology*, 163(8): 2121-2131.
- Huang C.Y. (1982). Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the Job plot. *Methods in Enzymology*, 87: 509-525.
- Huang, M., Tang, S.N., Upadhyay, G., Marsh, J.L., Jackman, C.P., Shankar, S., Srivastava, R. K. (2014). Embelin suppresses growth of human pancreatic cancer xenografts, and pancreatic cancer cells isolated from KrasG12D mice by inhibiting Akt and Sonic hedgehog pathways. *PloS One*, 9(4): e92161
- IARC 2007, Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines, Lyon, France.
- Iwaniuk, A., Jabłonska, E., Jabłonski, J., Ratajczak-Wrona, W., Garley, M. (2015). Expression of selected proteins of the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in human leukocytes exposed to N-nitrosodimethylamine. *Hum Exp Toxicol*, 34: 591-600.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S. (2004). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain Indian medicinal plants in vitro: a preliminary study. *Journal of Medicinal Food*, 7(3): 343-348.
- Jain, D., Chaudhary, P., Varshney, N., Janmeda P. (2020). Carcinogenic effects of N-nitroso compounds in the environment. *Environment Conservation Journal*, 21(3): 25-41.
- Jakszyn, P., Gonzalez, C.A. (2006). Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*, 12: 4296-4303.
- Jayakumar, S., Madankumar, A., Asokkumar, S., Raghunandhakumar, S., Gokula dhas, K., Kamaraj, S., Divya, M.G., Devaki, T. (2012). Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360(1-2): 51-60.
- Jiang, J., Nilsson-Ehle, P., Xu, N. (2006). Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism. *Lipids in Health and Disease*, 5:4.
- Jiang, W., Wen, D., Cheng, Z., Yang, Y., Zheng, G., Yin, F. (2018). Effect of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, against DENA-induced liver cancer in rats mediated via NF- κ B activation and inflammatory cytokines. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(12): e22220.
- Johri, R.K., Pahwa, G.S., Sharma, S.C., Zutshi, U. (1991). Determination of estrogenic/antiestrogenic potential of antifertility substances using rat uterine peroxidase assay. *Contraception*, 44(5): 549-557.
- Joshi, R., Kamat, J.P., Mukherjee, T. (2007). Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies. *Chem Biol Interact*, 167: 125-134.
- Joy, B., Nishanth Kumar, S., Soumya, M.S., Radhika, A.R., Vibin, M., Abraham, A. (2014). Embelin (2,5-dihydroxy-3-undecyl-p-benzoquinone): a bioactive molecule isolated from *Embelia ribes* as an effective photodynamic therapeutic candidate against tumor in vivo. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 21(11): 1292-1297.

- Joy, B., Kumar, S.N., Radhika, A.R., Abraham, A. (2015). Embelin (2,5-Dihydroxy-3-undecyl-p-benzoquinone) for photodynamic therapy: study of their cytotoxicity in cancer cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2): 1069-1079.
- Kale, J., Osterlund, E.J., Andrews, D.W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25(1): 65-80.
- Kalyan Kumar, G., Dhamotharan, R., Kulkarni, N.M., Mahat, M.Y., Gunasekaran, J., Ashfaque, M. (2011). Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 662(1-3): 63-69.
- Kang, J.S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F.J., Fukushima, S. (2007). Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Research*, 67(23). 11141-11146.
- Kang, J.S., Kang, H.G., Park, Y.I., Lee, H., Park, K., Lee, Y.S., Kim, S., Ryu, D.Y. (2013). Expression of epithelial cell adhesion molecule and proliferating cell nuclear antigen in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(1): 138-142.
- Kannaiyan, R., Shanmugam, M.K., Sethi, G. (2011). Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Letters*, 303(1): 9-20.
- Karwowska, M., Kononiuk, A. (2020). Nitrates/Nitrites in Food-Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(3): 241.
- Keuleyan, E., Bonifacie, A., Sayd, T., Duval, A., Aubry, L., Bourillon, S., Gatellier, P., Promeyrat, A., Nassy, G., Scislowski, V., Picgirard, L., Théron, L., Santé-Lhoutellier, V. (2022). In vitro digestion of nitrite and nitrate preserved fermented sausages - New understandings of nitroso-compounds' chemical reactivity in the digestive tract. *Food chemistry: X*, 16: 100474.
- Khan, F., Khan, T.J., Kalamegam, G., Pushparaj, P.N., Chaudhary, A., Abuzenadah, A., Kumosani, T., Barbour, E., Al-Qahtani, M. (2017). Anti-cancer effects of Ajwa dates (*Phoenix dactylifera* L.) in diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 418.
- Kozubek, A., Tyman, J.H. (1999). Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chemical Reviews*, 99(1): 1-26.
- Krishnaswamy, M., Purushothaman, K. K. (1980). Antifertility properties of *Embelia ribes* : (embelin). *Indian Journal of Experimental Biology*, 18(11): 1359-1360.
- Kumar, D., Kumar, A., Prakash, O. (2012). Potential antifertility agents from plants: a comprehensive review. *J Ethnopharmacol*, 140:1-32.
- Kumar, G.K., Dhamotharan, R., Kulkarni, N.M., Honnegowda, S., Murugesan S. (2011). Embelin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *International Immunopharmacology*, 11(6): 724-731.
- Kumar, R.S., Murugananthan, G., Balasubramanian, R. (2017). Anticarcinogenic Potential of Ethanol Extract of *Indigofera cordifolia* Roth. (Fabales: Fabaceae) on Diethylnitrosamine Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *Braz J Biol Sci*, 4: 53-66.
- Kumar, V., Dong, Y., Kumar, V., Almawash, S., Mahato, R.I. (2019). The use of micelles to deliver potential hedgehog pathway inhibitor for the treatment of liver fibrosis. *Theranostics*, 9: 7537-7555.

- Kumar, A., Naithani, M., Kumar, N., Singh, N., Agrawal, S., Sharma, A., Thapliyal, S., Singh, J., Handu, S. (2022). Piperlongumine inhibits diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 41: 9603271211073593.
- Kumara Swamy, H.M., Krishna, V., Shankarmurthy, K., Abdul Rahiman, B., Mankani, K.L., Mahadevan, K.M., Harish, B.G., Raja Naika, H. (2007). Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia ribes* Burm. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3): 529-534.
- Kundap, U.P., Bhuvanendran, S., Kumari, Y., Othman, I., Shaikh, M.F. (2017). Plant Derived Phytocompound, Embelin in CNS Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 76.
- Kundap, U.P., Paudel, Y.N., Kumari, Y., Othman, I., Shaikh, M.F. (2019). Embelin Prevents Seizure and Associated Cognitive Impairments in a Pentylenetetrazole-Induced Kindling Zebrafish Model. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 315.
- Lamblin, M., Sallustrau, A., Commandeur, C., Cresteil, T., Felpin, F.X., Dessolin, J. (2012). Synthesis and biological evaluation of hydrophilic embelin derivatives. *Tetrahedron*, 68: 4655-4663.
- Li, J.Y., Chen, R.J., Huang, L.T., Lee, T.Y., Lu, W.J., Lin, K.H. (2019). Embelin as a Novel Inhibitor of PKC in the Prevention of Platelet Activation and Thrombus Formation. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10): 1724.
- Lijinsky, W., Epstein, S.S. (1970). Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, 225(5227): 21-23.
- Lijinsky, W., Conrad, E., Van de Bogart, R. (1972). Carcinogenic nitrosamines formed by drug-nitrite interactions. *Nature*, 239(5368): 165-167.
- Limdi, J.K., Hyde, G.M. (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal*, 79(932): 307-312.
- Lin, K., Shen, W., Shen, Z., Wu, Y., Lu, S. (2002). Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *International Journal of Cancer*, 102(3): 207-211.
- Lippert, M., Papadopoulos, N., Javadpour, N.R. (1981). Role of lactate dehydrogenase isoenzymes in testicular cancer. *Urology*, 18: 50-53
- Liu, Q., Wang, Q., Li, H. (2018). Embelin inhibits abdominal aortic aneurysm through decreasing IL-6-induced STAT3 and NF- κ B inactivation. *Molecular Medicine Reports*, 18(2): 2365-2372.
- Longo, D.L., Fauci, A.S. (2010). Harrison's gastroenterology and hepatology. McGraw Hill Professional.
- Lu, J.T., Zhao, W.D., He, W., Wei, W. (2012). Hedgehog signaling pathway mediates invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via ERK pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(5): 691-700.
- Lu, H., Wang, J., Wang, Y., Qiao, L., Zhou, Y. (2016). Embelin and Its Role in Chronic Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 928: 397-418.
- Luna, L.G., (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd edition. Blakiston Division, McGraw-Hill.
- Lundberg, J.O., Larsen, F.J., Wegtzberg, E. (2011). Supplementation with nitrate and nitrite salts in exercise: a word of caution. *Journal of Applied Physiology*, 111(2): 616-617.

- Lundberg, J. O., Weitzberg, E. (2013). Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*, 62(4): 616-629.
- Lunn, J.C., Kuhnle, G., Mai, V., Frankenfeld, C., Shuker, D.E.G., Glen, R.C., Bingham, S.A. (2007). The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, 28: 685-690.
- Ma, H., Zhang, L., Tang, B., Wang, Y., Chen, R., Zhang, B., Chen, Y., Ge, N., Wang, Y., Gan, Y., Ye, S., Ren, Z. (2014). γ -Glutamyltranspeptidase is a prognostic marker of survival and recurrence in radiofrequency-ablation treatment of hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 21(9): 3084-3089.
- Ma, L., Hu, L., Feng, X., Wang, S. (2018). Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging and Disease*, 9(5): 938-945.
- Maduagwu, E., Bassir, O. (1980). A comparative assessment of toxic effects of dimethylnitrosamine in six different species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 53: 211-219.
- Mahendran, S., Thippeswamy, B.S., Veerapur, V.P., Badami, S. (2011). Anticonvulsant activity of embelin isolated from *Embelia ribes*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 18(2-3): 186-188.
- Magee, P.N., Barnes, J. (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Canc*, 10: 114.
- Mallik, M.A.B., Tesfai, K., Pancholy, S.K. (1981). Formation of carginogenic nitrosamines in soil treated with pesticides, and in sewage amended with nitrogen compounds. *Pro Oklahoma Acad Sci*, 61: 31-35.
- Mansour, D.F., Abdallah, H.M.I., Ibrahim, B.M.M., Hegazy, R.R., Esmail, R.S.E., Abdel- Salam, L.O. (2019). The carcinogenic agent diethylnitrosamine induces early oxidative stress, inflammation and proliferation in rat liver, stomach and colon: protective effect of ginger extract. *Asian Pac J Cancer Prev*, 20: 2551-2561.
- Martín-Acosta, P., Cuadrado, I., González-Cofrade, L., Pestano, R., Hortelano, S., de Las Heras, B., Estévez-Braun, A. (2023). Synthesis of Quinoline and Dihydroquinoline Embelin Derivatives as Cardioprotective Agents. *Journal of Natural Products*, 86(2): 317-329.
- Miller, M.A., Zachary J.F. (2017). Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, Maryland Heights, Elsevier Mosby, p: 2-43.e19.
- Mirvish, S. S., Grandjean, A. C., Moller, H., Fike, S., Maynard, T., Jones, L., Rosinsky, S., & Nie, G. (1992). N-nitrosoproline excretion by rural Nebraskans drinking water of varied nitrate content. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1(6): 455-461.
- Mirvish, S.S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett*, 93 (1): 17-48.
- Mitsumori, K., Onodera, H., Shoda, T. (1997). Liver tumour-promoting effects of oxfendazole in rats. *Food Chem Toxicol*, 35. 799-806.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9(6): 1799-1805.
- Miyashita, T., Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2): 293-299.

- Moazeni, M., Heidari, Z., Golipour, S., Ghaisari, L., Sillanpää, M., Ebrahimi, A. (2020). Dietary intake and health risk assessment of nitrate, nitrite, and nitrosamines: a Bayesian analysis and Monte Carlo simulation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(36): 45568-45580.
- Morselli, P.L. (1995). Drug metabolism in vitro: Role of drug metabolism in drug disposition and effects. In: Pacifici GM, Fracchia GN (Editors). *Advances in Drug Metabolism in Man. Luxembourg: European Commission*, 3-34.
- Nag, S., Zhang, X., Srivenugopal, K.S., Wang, M.H., Wang, W., Zhang, R. (2014). Targeting MDM2-p53 Interaction for Cancer Therapy: Are We There Yet? *Curr Med Chem*, 21: 553-574.
- Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M.A., Seki, E., Hidalgo, J., Koike, K., Kaufman, R.J., Karin, M. (2014). ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell*, 26(3): 331-343.
- Narayanaswamy, R., Gnanamani, A. (2014). 2, 5-dihydroxy-3-undecyl-1, 4-benzoquinone (Embelin)-a second solid gold of India- A review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6: 23-30.
- Nawrocki, J., Andrzejewski, P. (2011). Nitrosamines and water. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1-2): 1-18.
- Nidhi, Dadwal, A., Hallan, S.S., Sharma, S., Mishra, N. (2017). Development of enteric-coated microspheres of embelin for their beneficial pharmacological potential in ulcerative colitis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(6): 1-9.
- Nishie, K., Fiddler, W., Pensabene, J.W. (1984). Comparison of the acute toxicities of N-nitrosothiazolidine and N-nitrosomorpholine. *J Toxicol Environ. Health*, 13: 595-608.
- Nojiri, S., Joh, T. (2014). Albumin suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation and the cell cycle. *Int J Mol Sci*, 15: 5163-5174.
- Núñez de González, M.T., Osburn, W.N., Hardin, M.D., Longnecker, M., Garg, H.K., Bryan, N.S., Keeton, J.T. (2015). A Survey of nitrate and nitrite concentrations in conventional and organic-labeled raw vegetables at retail. *J Food Sci*, 80: C942-C949.
- Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*, 287: 795-801.
- Ohshima, H., Bartsch, H. (1981). Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Canc Res*, 41: 3658-3662.
- Özçelik, S. (1982). Bazı gıdalarda nitrit ve nitrosaminlerin oluşumu ve sağlığa zararlı etkileri. *Gıda*, 7(4): 183-188.
- Uemura, T., Shimazu, T., Miura, R., Yamano, T. (1980). NADPH-dependent melanin pigment formation from 5-hydroxyindolealkylamines by hepatic and cerebral microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 93: 1074-1081.
- Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C. (2012). Et ürünlerinde nitrat ve nitrite alternatif doğal kütleme maddeleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(3): 46-58.
- Parvez, M.K., Tabish Rehman, M., Alam, P., Al-Dosari, M.S., Alqasoumi, S.I., Alajmi, M.F. (2019). Plant-derived antiviral drugs as novel hepatitis B virus inhibitors: Cell culture and molecular docking study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(3): 389-400.
- Pathan, R.A., Bhandari, U. (2010). Preparation & characterization of embelin–phospholipid complex as effective drug delivery tool. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 69: 139-147.

- Perumal, S., Langeswaran, K., Selvaraj, J., Ponnulakshmi, R., Shyamaladevi, B., Balasubramanian, M.P. (2018). Effect of diosmin on apoptotic signaling molecules in N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma in experimental rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 449(1-2): 27-37.
- Pfeffer, C.M., Singh, A.T.K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 448.
- Podolak, I., Galanty, A., Janeczko, Z. (2005). Cytotoxic activity of embelin from *Lysimachia punctata*. *Fitoterapia*, 76: 333-335.
- Podolak, I., Strzałka, M. (2008). Qualitative and quantitative LC profile of embelin and rapanone in selected *Lysimachia* species. *Chromatographia*, 67: 471-475.
- Poojari, R., Gupta, S., Maru, G., Khade, B., Bhagwat, S. (2010). Chemopreventive and hepatoprotective effects of embelin on N-nitrosodiethylamine and carbon tetrachloride induced preneoplasia and toxicity in rat liver. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(4): 1015-1020.
- Poojari, R. (2014). Embelin - a drug of antiquity: shifting the paradigm towards modern medicine. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(3): 427-444.
- Rajewsky, M. F., Dauber, W., Frankenberg, H. (1966). Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 152(3718): 83-85.
- Prakash, A. O. (1994). Short Term Toxicity of Embelin in Female Rats. *Phytotherapyresearch*, 8(5): 257-264.
- Prasad, S., Chetty, A.A. (2008). Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. *Food Chemistry*, 106(2): 772-780.
- Purohit, A., Vyas, K.B., Vyas, S.K. (2008). Hypoglycaemic activity of *Embelia ribes* berries (50% etoh) extract in alloxan induced diabetic rats. *Ancient Science of Life*, 27(4): 41-44.
- Qin, X., Meghana, K., Sowjanya, N.L., Sushma, K.R., Krishna, C.G., Manasa, J., Sita, G.J.A., Gowthami, M., Honeyshmitha, D., Srikanth, G., SreeHarsha, N. (2019). Embelin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity: Involving inhibition of oxidative stress and inflammation in addition with activation of Nrf-2/Ho-1 pathway. *BioFactors (Oxford, England)*, 45(3): 471-478.
- Radhakrishnan, N., Gnanamani, A. (2014). 2,5-dihidroksi-3-undesil-1,4-benzokinon (Embelin)-Hindistan'ın ikinci katı altını-A Review. *International Journal Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 6(6): 23-30.
- Ramakrishnan, G., Augustine, T.A., Jagan, S., Vinodkumar, R., Devaki, T. (2007). Effect of silymarin on N-Nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Oncol*, 29: 39-44
- Rathinam, K., Santhakumari, G., Ramiah, N. (1976). Studies on the antifertility activity of embelin. *J Res Ind Med*, 11: 84-90.
- Rezaie, A., Pashmforosh, M., Haghi Karamallah, M., Fazlara, A., Haghighat, N., Shahriari, A. (2014). Hepatoprotective effect of caffeine on Diethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 17(3): 183-190.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 402-412.
- Rimkus, T.K., Carpenter, R.L., Qasem, S., Chan, M., Lo, H.W. (2016). Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothened and GLI inhibitors. *Cancers*, 8(2): 22.

- Rodriguez, M.J., Herrera, F., Donoso, W., Castillo, I., Orrego, R., Gonzalez, D.R. (2020). Pro-resolving lipid mediator resolvin E1 mitigates the progress of diethylnitrosamine-induced liver fibrosis in sprague-dawley rats by attenuating fibrogenesis and restricting proliferation. *Int J Mol Sci*, 21: 8827.
- Rondevaldova, J., Leuner, O., Teka, A., Lulekal, E., Havlik, J., Van Damme, P., Kokoska, L. (2015). In Vitro Antistaphylococcal Effects of Embelia schimperi Extracts and Their Component Embelin with Oxacillin and Tetracycline. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 175983.
- Rostkowska, K., Zwierz, K., Rozanski, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., Roszczenko, A. (1998). Formation and metabolism of n-nitrosamines. *Pol J Environ Stud*, 7: 321-325.
- Ruch, J.M., Kim, E.J. (2013). Hedgehog signaling pathway and cancer therapeutics: progress to date. *Drugs*, 73: 613-23.
- Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I.A.M., Saber, H., Attia, E.Z., Abdelraheem, W. M., Madkour, H.A., Abdelmohsen, U.R. (2021). The genus Turbinaria: chemical and pharmacological diversity. *Natural Product Research*, 35(22): 4560-4578.
- Sadik, N.A.H., EL-Maraghy, S.A., Ismail, M.F. (2008). Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: Possible chemoprevention by blueberries. *Afr J Biochem Res*, 2: 081-087.
- Said Abasse, K., Essien, E. E., Abbas, M., Yu, X., Xie, W., Sun, J., Akter, L., Cote, A. (2022). Association between Dietary Nitrate, Nitrite Intake, and Site-Specific Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(3): 666.
- Samatha, S., Vasudevan, T.N. (1996). Embelia ribes Burm as a source of red colorant. *J Sci Ind Res*, 55: 888-889.
- Schafer, K.A. (1998). Cell cycle review. *Vet Pathology*, 35: 461-478.
- Schreiber, I.M., Mitch, W.A. (2006). Occurrence and fate of nitrosamines and nitrosamine precursors in wastewater-impacted surface waters using boron as a conservative tracer. *Environ Sci Technol*, 40: 3203e3210.
- Sen, C.K. (1995). Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Int J Physiol Pharmacol*, 39: 177-196.
- Seth, S.D., Nera, J., Sundaram, K.R. (1982). Antispermatic effect of Embelin from Embelia ribes. *Indian J Pharmacol*, 14(2): 207.
- Sharma, V.K., Yang, X., Cizmas, L., McDonald, T.J., Luque, R., Sayes, C.M., Yuan, B., Dionysiou, D.D. (2017). Impact of metal ions, metal oxides, and nanoparticles on the formation of disinfection byproducts during chlorination. *Chemical Engineering Journal*, 317: 777-792.
- Sharma, V., Gautam, D.N.S., Radu, A.F., Behl, T., Bungau, S.G., Vesa, C.M. (2022). Reviewing the Traditional/Modern Uses, Phytochemistry, Essential Oils/Extracts and Pharmacology of Embelia ribes Burm. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(7): 1359.
- Sheng, Z., Ge, S., Gao, M., Jian, R., Chen, X., Xu, X., Li, D., Zhang, K., Chen, W. H. (2020). Synthesis and Biological Activity of Embelin and its Derivatives: An Overview. *In Medicinal Chemistry*, 20(5): 396-407.
- Sheweita, S.A., El Banna, Y.Y., Balbaa, M., Abdullah, I.A., Hassan, H.E. (2017). Nnitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environ Toxicol*, 32: 2212-2220.

- Singh, D., Singh, R., Singh, P., Gupta, R.S. (2009). Effects of embelin on lipid peroxidation and free radical scavenging activity against liver damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 105: 243-248.
- Singh, B., Guru, S.K., Sharma, R., Bharate, S.S., Khan, I. A., Bhushan, S., Bharate, S.B., Vishwakarma, R.A. (2014). Synthesis and anti-proliferative activities of new derivatives of embelin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(20): 4865-4870.
- Souliotis, V.L., Henneman, J.R., Reed, C.D., Chhabra, S.K., Diwan, B.A., Anderson, L.M., Kyrtpoulos, S.A. (2002). DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis. *Mutat Res*, 500(1–2): 75-87.
- Spinardi-Barbisan, A.L., Kaneno, R., Barbisan, L.F., Viana de Camargo, J.L., Rodrigues, M.A. (2004). Chemically induced immunotoxicity in a medium-term multiorgan bioassay for carcinogenesis with Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 194: 132-140.
- Sreepriya, M., Bali, G. (2005). Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Fitoterapia*, 76: 549-555.
- Sreepriya, M., Bali, G. (2006). Effects of administration of Embelin and Curcumin on lipid peroxidation, hepatic glutathione antioxidant defense and hematopoietic system during N-nitrosodiethylamine/Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Mol Cell Biochem*, 284: 49-55.
- Srivastava, S., Bhowmick, K., Chatterjee, S., Basha, J., Kundu, T.K., Dhar, S.K. (2014). Histone H3K9 acetylation level modulates gene expression and may affect parasite growth in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The FEBS Journal*, 281(23): 5265-5278.
- Stoner, G.D., Shimkin, M.B. (1982). Strain A mouse lung tumor bioassay. *Journal of the American College of Toxicology*, 1: 145-169.
- Subramaniam, N., Kannan, P., Thiruvengadam, D. (2019). Hepatoprotective effect of boldine against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in wistar rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(12): e22404.
- Sun, M., Shen, W., Guo, X., Liao, Y., Huang, Y., Hu, M., Ye, P., Liu, R. (2024). A critical review of advances in tumor metabolism abnormalities induced by nitrosamine disinfection by-products in drinking water. *Toxicological Sciences*, 199(1): 12-28.
- Taghiyev, A., Sun, D., Gao, Z. M., Liang, R., Wang, L. (2012). Embelin-induced apoptosis of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and blockade of HepG2 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4): 649-654.
- Tajtaková, M., Semanová, Z., Tomková, Z., Szökeová, E., Majoros, J., Rádiková, Z., Seböková, E., Klimes, I., & Langer, P. (2006). Increased thyroid volume and frequency of thyroid disorders signs in schoolchildren from nitrate polluted area. *Chemosphere*, 62(4): 559-564.
- Tang, H., Choy, P.C., Chen, H. (1992). Changes in lipid content and composition during the development of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 109(1): 83-87.
- Tapiero, H., Ba, G.N., Couvreur, P., Tew, K.D. (2002). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5): 215-222.

- Thippeswamy, B.S., Mahendran, S., Biradar, M.I., Raj, P., Srivastava, K., Badami, S., Veerapur, V.P. (2011a). Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 654(1): 100-105.
- Thippeswamy, B.S., Nagakannan, P., Shivasharan, B. D., Mahendran, S., Veerapur, V.P., Badami, S. (2011b). Protective effect of embelin from *Embelia ribes* Burm. against transient global ischemia-induced brain damage in rats. *Neurotoxicity Research*, 20(4): 379-386.
- Thirunavukkarasu, C., Sakthisekaran, D. (2001). Effect of selenium on N-nitrosodiethyl-amine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants. *Cell Biochem Funct*, 19(1): 27-35.
- Thota, S.P., Sarma, N.S., Murthy, Y.L.N., Kanthimreddi, V., Wright, C.W. (2016). A new embelin from themangrove *Aegiceras corniculatum*. *Indian J Chem Sect*, 55: 123-127.
- Tricker, A.R., Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3-4): 277-289.
- Tricker, A.R. (1997). N-nitroso compounds and man: Sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*, 6: 226-268.
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory animals*, 49(1): 59-69.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S.K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Research*, 68(9): 3421-3428.
- Turp, G.Y., Sucu, C. (2016). Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler. *Celal Bayar University Journal of Science*, 12(2): 231-242.
- Ünlü, D., Bayır, A.G. (2022). Koruyucu gıda katkı maddeleri ve sağlığa etkisi. *Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi*, (4): 55-68.
- van Maanen, J.M., van Dijk, A., Mulder, K., de Baets, M.H., Menheere, P.C., van der Heide, D., Mertens, P.L., Kleinjans, J.C. (1994). Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicology Letters*, 72(1-3): 365-374.
- Varier, P.S. (2006). *Embelia ribes*, Indian medicinal plants. Chennai, p: 368-371.
- Varjosalo, M., Li, S.P., Taipale, J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between drosophila and mammals. *Dev Cell*, 10: 177-86.
- Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual Review of Immunology*, 10, 411-452.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caruso, M. L., Serviddio, G., Valentini, A. M., Pirrelli, M., Altomare, E. (2001). Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(2): 130-139.
- Wang, D.G., Sun, Y.B., Ye, F., Li, W., Kharbuja, P., Gao, L., Zhang, D.Y., Suo, J. (2014). Anti-tumor activity of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin in gastric cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 386(1-2): 143-152.
- Wang, B., Chen, X., Zhou, T., Wang, X. (2018). Antidepressant-like effects of embelin and its possible mechanisms of action in chronic unpredictable stress-induced mice. *Neurological Research*, 40(8): 666-676.

- Wang, H., Zhang, H., Wang, Y., Yang, L., Wang, D. (2019). Embelin can protect mice from thioacetamide-induced acute liver injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118: 109360.
- Wang, D., Yang, Y., Wang, Y., Proulle, V., Andreasen, P.A., Hong, W., Chen, Z., Huang, M., Xu, P. (2020). Embelin ameliorated sepsis-induced disseminated intravascular coagulation intensities by simultaneously suppressing inflammation and thrombosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130: 110528.
- Ward, M.H. (2009). Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. *Reviews on Environmental Health*, 24(4): 357-363.
- Wehrkamp, C.J., Gutwein, A.R., Natarajan, S.K., Phillippi, M.A., Mott, J.L. (2014). XIAP antagonist embelin inhibited proliferation of cholangiocarcinoma cells. *PloS One*, 9(3): e90238.
- Wei, Y., Yang, J., Kishore Sakharkar, M., Wang, X., Liu, Q., Du, J., Zhang, J.J. (2020). Evaluating the inhibitory effect of eight compounds from *Daphne papyracea* against the NS3/4A protease of hepatitis C virus. *Natural Product Research*, 34(11): 1607-1610.
- Weitzberg, E., Lundberg, J.O. (2013). Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annual Review of Nutrition*, 33: 129-159.
- WHO, 2011. Guidelines for Drinking Water Quality, WHO IV. Baskı, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2016. Nitrate and Nitrite in Drinking Water, WHO I. Baskı, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2019. Update On Nitrosamine Impurities, WHO Information Note, Geneva, Switzerland.
- Witt, O.N. (1878). XXIII. don aromatic nitrosamines. *J Chem Soc Trans*, 33, 202e211.
- Woreta, T.A., Alqahtani, S.A. (2014). Evaluation of abnormal liver tests. *The Medical clinics of North America*, 98(1): 1-16.
- Wu, T., Dai, Y., Wang, W., Teng, G., Jiao, H., Shuai, X., Zhang, R., Zhao, P., Qiao, L. (2016). Macrophage targeting contributes to the inhibitory effects of embelin on colitis-associated cancer. *Oncotarget*, 7(15): 19548-19558.
- Xiang, D.M., Sun, W., Ning, B.F., Zhou, T.F., Li, X.F., Zhong, W., Cheng, Z., Xia, M.Y., Wang, X., Deng, X., Wang, W., Li, H.Y., Cui, X.L., Li, S.C., Wu, B., Xie, W.F., Wang, H.Y., Ding, J. (2018). The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. *Gut*, 67(9): 1704-1715.
- Xu, C.L., Zheng, B., Pei, J.H., Shen, S.J., Wang, J.Z. (2016). Embelin induces apoptosis of human gastric carcinoma through inhibition of p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*, 14(1): 307-312.
- Xue, Z., Ge, Z., Zhang, K., Sun, R., Yang, J., Han, R., Peng, M., Li, Y., Li, W., Zhang, D., Hao, J., Da, Y., Yao, Z., Zhang, R. (2014). Embelin suppresses dendritic cell functions and limits autoimmune encephalomyelitis through the TGF- β / β -catenin and STAT3 signaling pathways. *Molecular Neurobiology*, 49(2): 1087-1101.
- Yamada, K., Yamamiya, I., Utsumi, H. (2006). In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(11): 2040-2046.
- Yılmaz, S., Karahan, İ., Kandemir, F.M. (2008). Bazı nitrozaminlerin ratlarda doku pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(3). 163-168.

- You, Y., Zhu, F., Li, Z., Zhang, L., Xie, Y., Chinnathambi, A., Alahmadi, T.A., Lu, B. (2021). Phyllanthin prevents diethylnitrosamine (DEN) induced liver carcinogenesis in rats and induces apoptotic cell death in HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137: 111335.
- Yu, W., Zhao, J., Li, W., Zheng, Y., Zhu, J., Liu, J., Liu, R., Wang, Z., Wang, X., Hai, C. (2020). 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -d-glucoside alleviated the acute hepatotoxicity and DNA damage in diethylnitrosamine-contaminated mice. *Life Sciences*, 243: 117274.
- Zaid, O.I., Majid, R.A., Hasidah, M.S., Sabariah, M.N., Al-Zihiry, K., Rahi, S., Basir, R. (2017). Anti-plasmodial and Chloroquine Resistance Suppressive Effects of Embelin. *Pharmacognosy Magazine*, 13(1): 48-55.
- Zeng, T., Mitch, W.A. (2015). Contribution of N-nitrosamines and their precursors to domestic sewage by greywaters and blackwaters. *Environ Sci Technol*, 49: 13158e131.
- Zhang, T.Y., Lin, Y.L., Xu, B., Cheng, T., Xia, S.J., Chu, W.H., Gao, N.Y. (2016). Formation of organic chloramines during chlor(am)ination and UV/chlor(am)ination of algae organic matter in drinking water. *Water Research*, 103: 189-196.
- Zhao, Z. G., Tang, Z.Z., Zhang, W.K., Li, J.G. (2015). Protective effects of embelin on myocardial ischemia-reperfusion injury following cardiac arrest in a rabbit model. *Inflammation*, 38(2): 527-533.
- Zhu, Q.Q. (2015). Research on the Law of Nitrosamine Formation and Control in the Process of Bacon Processing. Tianjin University, Science and Technology, Master Dissertation, Chinese.
- Zutshi, U., Sharma, S.C., Kaul, J.L., Atal, C.K. (1990). Kinetic fate of potassium embelate, a non-narcotic centrally acting analgesic after oral and intravenous administration. *Pharmacology*, 40(3): 179-184.