



## Kazlarda Nigella Sativa (Çörek Otu) Tohumu Uygulamasının Plazma Nitrik Oksit, Malondialdehit ve Tam Kan Glutatyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Mahmut KARAPEHLİVAN<sup>1</sup>✉

Asım KART<sup>2</sup>

Hilmi YAMAN<sup>3</sup>

Emine ATAKİŞİ<sup>1</sup>

Kürşad YAPAR<sup>4</sup>

1. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars.

2. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars.

3. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kars.

4. Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Giresun.

**Özet:** Bu çalışmada, çörek otu olarak bilinen Nigella sativa (N.sativa) tohumlarının kazlarda plazma malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve tam kan glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 8 adet Anser anser ırkı kaz 6 hafta boyunca % 5 öğütülmüş N. sativa tohumu içeren yemle beslendi. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta başında olmak üzere 6 hafta boyunca kazların V. subcutanea ulnarisinden kan örnekleri usulüne uygun olarak alındı. Plazma MDA ve tam kan GSH düzeylerinin ölçümü sırasıyla Yoshioka ve ark ile Beutler ve ark'nın bildirdiği yöntemle göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Plazma NO düzeyleri ise Miranda ve ark'nın bildirdiği yöntemle göre mikroyayın okuyucuda ölçüldü. Haftalara göre MDA, GSH ve NO düzeylerinde değişiklikler tespit edildi. Yapılan çalışmada elde edilen veriler 1. hafta ile kıyaslandığında N. sativa ilave edilen yemle beslenen kazlarda 2. haftadan itibaren plazma MDA düzeylerinin azaldığı, tam kan GSH düzeylerinin ise yükseldiği belirlenmiştir. Buna karşın haftalara göre plazma NO düzeylerinde bir fark tespit edilememiştir. Sonuç olarak, kazlara 6 hafta süreyle uygulanan N. sativa'nın oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Glutatyon, Kaz, Nigella sativa, Nitrik oksit, Malondialdehit

### The Effects of Nigella Sativa (Corek Otu) Seeds on Plasma Nitric Oxide, Malondialdehyde and Whole Blood Glutathione Concentrations in Geese

**Abstract:** In this study, the effects of Nigella sativa seeds on plasma malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and whole blood glutathione (GSH) concentrations were investigated in geese. For this purpose, 8 Anser anser breed geese were fed with a diet containing 5 % ground Nigella sativa seeds for 6 weeks. Blood samples were properly collected from V. subcutanea ulnaris at the beginning and every week of the study for 6 weeks. Biochemical analysis of plasma MDA and blood GSH concentrations were spectrophotometrically measured on a weekly basis according to the methods of Yoshioka et al. and Beutler et al. respectively. Plasma NO concentration was measured by the method of Miranda et al. with a microplate reader. Alterations in measured parameters were determined with respect to the weeks of study. While MDA concentration was significantly decreased at the 2<sup>nd</sup> week and continued to be decreased compared to 1<sup>st</sup> week, blood GSH level was significantly increased and remained high compared to 1<sup>st</sup> week of study. However, no alteration was found in plasma NO concentration among weeks. In conclusion, Nigella sativa administration for 6 weeks resulted in significant decrease in MDA levels and significant increase in GSH levels of geese implying that Nigella sativa could be protective against oxidative stress.

**Key words:** Glutathione, Goose, Nigella sativa, Nitric oxide, Malondialdehyde

✉ Mahmut KARAPEHLİVAN, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars.  
E-posta: mkarapehlivan@hotmail.com

## GİRİŞ

**N**igella sativa (çörek otu) Ranunculaceae familyasından olup, sıklıkla Akdeniz'e kıyısı olan bölgelerde yetişen bir bitki türüdür. Tohumları, genellikle gıdalarda doğal tat ve koku verici etkilerinden dolayı katkı maddesi yada tıbbi amaçlarla astım, hipertansiyon, diyabet, öksürük, ateş düşürücü, yangı ve ekzema gibi bir çok hastalığa karşı koruyucu ve sağaltım amacı ile kullanılmaktadır (Salem, 2005; Cheikh-Rouhou ve ark., 2007). Farmakolojik etkilerinden dolayı çörek otu tohumlarından ve yağından karminatif, diüretik, laktagog ve vermifuj olarak yararlanılmaktadır (Ali ve Blunden, 2003). Cheikh-Rouhou ve ark. (2007) N. sativa tohumlarının terapötik olarak bazı hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özelliğinin bünyesinde bulunan bir takım aktif bileşiklerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

N. sativa yağının High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile yapılan analizinde biyolojik olarak dört adet aktif bileşiği (thymoquinone, dithymoquinone, thymohydro-quinone ve thymol) tespit edilmiştir (Salem, 2005). Bu bileşiklerin en aktif formunun thymoquinone olduğu ve lipit peroksidasyon ürünleri ile yangı belirteçlerinin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Houghton ve ark., 1995; Salem, 2005). N. sativa ekstraktının anti-inflamatuar ve analjezik etkileri de *in vivo* olarak ratlarda gösterilmiştir (Al-Ghamdi, 2001). N. sativa yağının karaciğerde glukoneojenezi azaltarak anti-diabetik etkiye ve makrofajların fagositik aktivitesini artırarak immunstimulan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Fararh ve ark., 2004). Ayrıca N. sativa'nın anti-tümöral, anti-mikrobiyel, anti-histaminik, anti-helmentik ve anti-viral etkilerinin olduğu da rapor edilmektedir (Salem, 2005). Özellikle oksidatif stres ve serbest radikal kaynaklı toksik hasarlara karşı çörek otunun antioksidan özellikleri tespit edilmiştir (Nagi ve Mansour, 2000; Kanter ve ark., 2003; Soleimani ve ark., 2008). Bunun yanında N. sativa'nın yüksek dozlarının karaciğer, böbrek ve kalp glutatyon (GSH) seviyele-

rini düşürdüğü ve bu organlarda toksik olabileceği de ileri sürülmektedir (Ali ve Blunden, 2003).

GSH, tripeptid tiyol yapıda karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında sentezlenen enzimatik olmayan antioksidan bir maddedir. GSH ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, hücrelerde serbest radikaller sonucu oluşan oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizmasını oluşturmaktadır (Vina ve ark., 1980). Bu etkilerini doğrudan oksidantlara karşı hidrojen transfer ederek veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi aracılığında hidrojen peroksit'in ( $H_2O_2$ ) suya ve oksijene dönüşümünde koenzim olarak yapmaktadır. GSH düzeylerindeki azalma hücrelerde serbest radikal hasarına karşı hassasiyeti artırmaktadır (Wu ve ark., 2004). Antioksidan kapasitedeki azalmaya yada çeşitli sebeplerle fazla miktarda oluşan serbest radikallere bağlı olarak hücrelerde lipit peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan malondialdehit (MDA) ise sıklıkla lipit peroksidasyonunun belirlenmesinde bir indikatör olarak kullanılmaktadır (De Zwart ve ark., 1999). Hücrede reaktif oksijen türlerinin doymamış yağ asitleri ile tepkimesi sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerinin yıkımı sırasında aldehitler (başlıca MDA), pentan, konjüge dienler gibi bir takım son ürünler oluşmaktadır (Slater, 1984). Açığa çıkan MDA biyolojik olarak aktif bir molekül olup hücrede DNA, proteinler ve membran bileşenleri ile çapraz bağ oluşturarak buralarda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yol açmaktadır (De Zwart ve ark., 1999). Nitrik oksit dokularda fizyolojik ve patolojik birçok olayda değişik biyolojik etkilere sahip aktif bir molekül olup superoksit radikali ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit radikalinin oluşumuna yol açarak oksidatif strese rol aldığı ileri sürülmektedir (Rubbo ve ark., 1994).

Yapılan bu çalışmada, N.sativa uygulamasının kazlarda 6 haftalık sürede antioksidan/prooksidan denge üzerine etkilerini saptamak üzere plazma MDA, NO ve tam kan GSH düzeylerindeki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmada Kafkas Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinden temin edilen 8 adet 4 aylık Anser anser ırkı dişi kaz kullanıldı. Lokal marketlerden temin edilen N. sativa tohumları öğütüldükten sonra günlük olarak taze hazırlanmak kaydıyla % 5 oranında yeme (Tablo 1) homojen bir şekilde karıştırılarak 6 hafta boyunca kazlara *ad libitum* olarak uygulandı.

Her hafta başlangıcında olmak üzere kan örnekleri V. subcutanea ulnaris'den EDTA'lı tüplere alındı. MDA ve NO tayini için, kan örnekleri oda ısısında 3000x g de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve ayrılan plazmalar -25 °C' de saklandı. Plazma MDA düzeyleri Yoshioka ve ark.'nın (1979) bildirdiği yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kısaca, Lipit içerik, düşük pH ve Tiyobarbütirik asit (TBA)'li ortamda ısıtıldığında MDA ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu 535 nm'de absorbans veren stabil kırmızı pembe renkli madde oluşmaktadır. Kalibrasyon için 2,5-5-10 ve 20 µmol/L derişimlerinde olacak şekilde, etil alkolde çözülmüş 1.1.3.3-tetraetoksipropan kullanıldı. Tam kan GSH düzeyleri Beutler ve ark.'nın (1963)

**Tablo 1.** Yem Kompozisyonu.

**Table 1.** Feed Composition.

İçindekiler	%	Kompozisyon	%
Mısır	60.50	Kuru Madde	90.07
Soya Unu	29.50	Ham Protein	21.75
Balık Unu	4.00	Ham Yağ	5.98
Bitkisel Yağ	3.30	Ham Selüloz	3.25
Mermer Tozu	1.20	Ham Kül	3.22
Dikalsiyum Fosfat	0.50	N'siz Öz Madde Miktarı	55.87
Sodyum Klorür	0.30	Metabolik Enerji ( kcal/kg)	30.43
DL-Metiyonin	0.10		
Lizin	0.10		
Vitamin – Mineral Premiks	0.50		

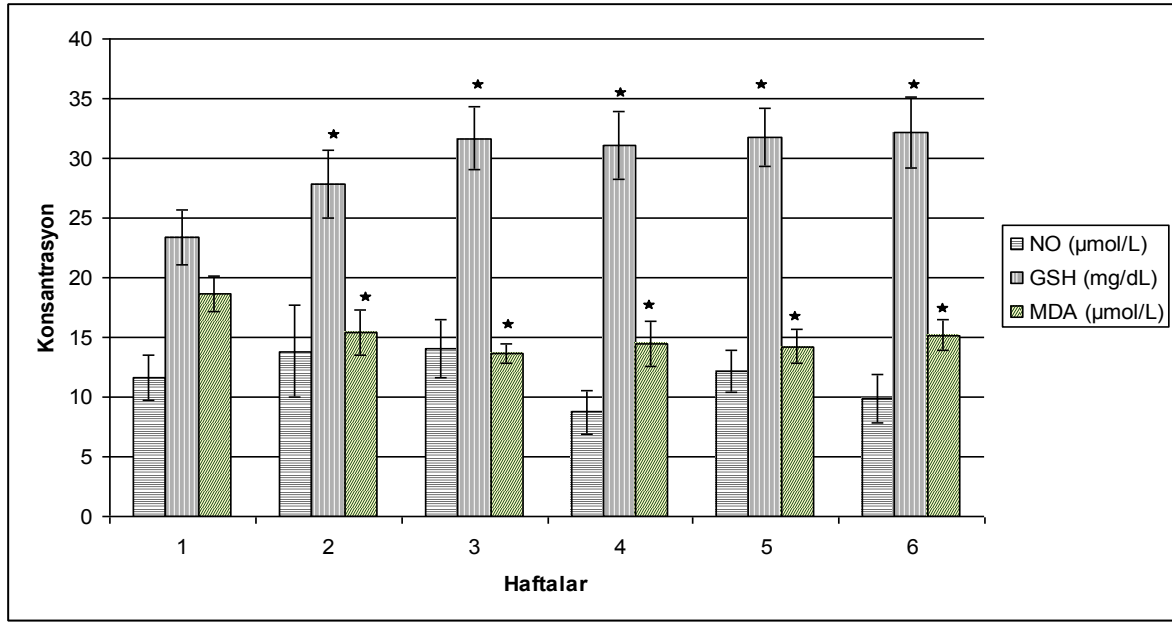
## BULGULAR

Anser anser ırkı kazların yemlerine % 5 oranında ilave edilen N. sativa'nın haftalara göre plazma MDA, NO ve tam kan GSH düzeylerine etkileri Şekil 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Çalışmada, 1. haftaya göre 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda MDA düzeylerinin

bildirdiği yöntemle göre ölçüldü. EDTA'lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, -SH taşımayan tüm proteinler çöktürüldü ve elde edilen berrak sıvıda SH gruplarının 5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçüldü. Plazma NO düzeyleri ise Miranda ve ark. (2001)'nin bildirdiği yöntemle göre mikroyayıt okuyucuda ölçüldü. Uygulanan yöntemin temelinde nitrat,  $VaCl_3$  ile nitrit'e dönüştürülmektedir. Nitrit ile sulfanilamidin asidik ortamda N(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu renkli diazonyum bileşiği meydana gelmektedir. Oluşan renkli kompleks 540 nm'de kolorimetrik olarak ölçüldü. Kalibrasyon için 1000 µM stok nitrit ve nitrat çözeltisinden 200, 100, 50, 12.5, 6.25, 3.125 µM'lik derişimde çözeltiler kullanıldı.

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS Windows 10.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir parametre, Analysis of Repeated Measures Metodu ile test edildikten sonra post-hoc testler (haftalar arası karşılaştırmalar, pairwise comparisons) Bonferoni düzeltmesi kullanılmış paired samples t-testi ile yapıldı.

anlamli derecede düşük olduğu tespit edildi. 2., 3., 4., 5. ve 6. haftalarda MDA düzeylerinde bir fark tespit edilemedi. Tam kan GSH düzeylerinde ise 1. haftaya göre 2., 3., 4., 5., ve 6. haftalarda anlamli derece artışların olduğu gözlemlendi. Plazma NO düzeylerinde haftalara göre istatistiksel bir fark tespit edilemedi.



**Şekil 1.** Anser anser ırkı kazlarda N. sativa tohumu uygulamasının haftalara göre plazma nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve tam kan glutatyon (GSH) düzeylerine etkileri.

**Figure 1.** The effects of N. sativa seeds application on plasma nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and whole blood glutathione (GSH) levels of Anser anser Geese with respect to the weeks.

\* 1. hafta ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılığı gösterir, \* Value is significantly different from that of week-1

**Tablo 2.** Anser anser ırkı kazlarda N. sativa tohumu uygulamasının haftalara göre plazma nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve tam kan glutatyon (GSH) düzeylerine etkileri.

**Table 2.** The effects of N. sativa seeds application on plasma nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and whole blood glutathione (GSH) levels of Anser anser Geese with respect to the weeks.

Haftalar	NO (µmol/L)	GSH (mg/dl)	MDA (µmol/L)
1. Hafta	11.68±1.89 <sup>a</sup>	23.38±2.32 <sup>a</sup>	18.64±1.44 <sup>a</sup>
2. Hafta	13.81±3.87 <sup>a</sup>	27.88±2.82 <sup>b</sup>	15.41±1.83 <sup>b</sup>
3. Hafta	14.07±2.46 <sup>a</sup>	31.68±2.65 <sup>b</sup>	13.67±0.78 <sup>b</sup>
4. Hafta	8.75±1.80 <sup>a</sup>	31.05±2.81 <sup>b</sup>	14.46±1.84 <sup>b</sup>
5. Hafta	12.16±1.75 <sup>a</sup>	31.80±2.43 <sup>b</sup>	14.20±1.42 <sup>b</sup>
6. Hafta	9.85±2.05 <sup>a</sup>	32.17±2.98 <sup>b</sup>	15.17±1.31 <sup>b</sup>

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Values with different letters within the same column indicates significant differences (p<0.05).

## TARTIŞMA

Lipit peroksidasyonu, dokularda serbest radikal veya ROS olarak adlandırılan moleküllerin, hücrelerdeki fosfolipitlerin yapısında bulunan poliansature yağ asitleri ile etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkan bir

dizi reaksiyondur (Valko ve ark., 2007). Hücre membranlarındaki bu dejeneratif reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan yan ürünler 'lipit peroksidasyon ürünleri' olarak adlandırılmaktadır. MDA dokularda lipit peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ve lipit peroksidasyonunun tespitinde sıklıkla

yararlanılan bir parametredir (De Zwart ve ark., 1999). Reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller, fizyolojik koşullarda endojen olarak sürekli üretilen moleküllerdir. Serbest radikaller organizmada antioksidan sistemler tarafından etkisiz hale getirilerek ya da sürekli dengede tutularak meydana gelebilecek zararlar önlenmektedir. N. sativa yağının diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radikaline hidrojen ve elektron vererek bu radikali indirgemesi sonucu antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Burits ve Bucar, 2000). Zaher ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada, aynı şekilde *in vitro* olarak N. sativa'nın DPPH radikalini indirgeyerek C vitamininden daha etkili bir antioksidan olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir *in vivo* deneyde ise aynı şekilde antioksidan etkisine bağlı olarak doksorubisin kaynaklı ROS üretimini ve oksidatif strese bağlı kardiyotoksikiteyi önlediği ileri sürülmüştür (Nagi ve Mansour, 2000). Çalışmada 1. haftaya göre diğer haftalarda düşük tespit edilen MDA düzeyleri N. sativa'nın güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğunu bildiren diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

N. sativa'nın NO radikalini inhibe ettiği ve non-enzimatik lipid peroksidasyon testinde de lipid peroksidasyonuna karşı etkili bir şekilde koruyucu rol oynadığı bildirilmektedir (Zaher ve ark., 2008). Mahmood ve ark. (2003) yaptıkları *in vitro* bir çalışmada N. sativa'nın murin (rodent) peritoneal makrofajlarında NO sentezini inhibe ederek yangısal öncül maddelerin oluşumunu engellediğini ileri sürmüşlerdir. Ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) uygulaması sonucu nitrosatif strese bağlı olarak oluşan plazma NO seviyesindeki artışın, oral yolla verilen N. sativa ekstratı ve yağı ile inhibe edildiği tespit edilmiştir. Uygulanan CCl<sub>4</sub>'ün, plazma tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) seviyesini artırarak bu tip sitokinlerin indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) vasıtası ile plazma NO seviyesinde artışa yol açtığı ve N. sativa'nın NO ile TNF- $\alpha$  seviyesindeki artışı önlediği rapor edilmektedir (Soleimani ve ark., 2008). Yapılan çalışmada plazma NO düzeylerinde 6 hafta

boyunca istatistiksel bir fark tespit edilememiştir. NO düzeylerinde her hangi bir değişimin tespit edilememiş olması, NO sentezinde rol alan iNOS'un sentezini indükleyici maddelerin ortamda bulunmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, sitokinler, lipopolisakkaritler, bazı toksik ürünler ve hipoksiye bağlı olarak oluşan maddeler iNOS'un transkripsiyonu ve sentezini uyararak NO'ni sentezi artırmaktadır (Moncada ve ark., 1991; Marletta, 1993). Belirtilen çalışmalarda uygulanan ksenebiyotiklerden dolayı NO üretiminin iNOS enzimi aracılığında artmasına bağlı olabileceği ve bu artışların uygulanan N. sativa ile azaltılabileceği düşünülmektedir.

Dokularda oluşan endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemlerin koruyucu etkileri bulunmaktadır. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimatik antioksidanlar iken GSH ise hücrelerde antioksidan etkili non-enzimatik bir moleküldür. GSH'in doğrudan hidroksil radikallerini (OH<sup>•</sup>) ve singlet oksijeni (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) etkisiz hale getirmesinin yanında GSH-Px'in kofaktörü olup, oksidatif stresin önlenmesinde önemli rol aldığı kaydedilmektedir (Valko ve ark., 2006; Valko ve ark., 2007). Farklı çalışmalarda, gentamisin ve ifosfamidin'in neden olduğu böbrek hasarlarında, N. sativa'nın ve dört aktif ekstratından biri olan thymoquinon'un azalan doku GSH seviyelerini yükselterek normalize ettiği bildirilmektedir (Salem, 2005). Yine başka bir çalışmada ratlarda N. sativa'nın thymoquinonca zengin fraksiyonunun plazma antioksidan enzimlerini ve bu enzimlerin gen ekspresyonlarını artırdığı tespit edilmiştir (Ismail ve ark., 2009). Yapılan bu çalışmada N. sativa'nın birinci haftaya göre diğer haftalarda artan GSH düzeyleri yukarıda belirtilen çalışmalarla uyum göstermektedir.

Sonuç olarak, kaz yemine 6 hafta süreyle ilave edilen N. sativa'nın plazma MDA düzeylerinde bir düşüş, GSH düzeylerinde ise anlamlı bir artış sağlayarak oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği kanaatine varılmıştır.

**KAYNAKLAR**

- Al-Ghamdi MS., 2001. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharmacol.*, 76, 45-48.
- Ali BH., Blunden G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.*, 17, 299-305.
- Beutler E., Duron O., Kelly BM., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-888.
- Burits M., Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.*, 14, 323-328.
- Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H., 2007. *Nigella sativa* L.: chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem.*, 101, 673-681.
- De Zwart LL., Meerman JH., Commandeur JN., Vermeulen NP., 1999. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 202-226.
- Fararh KM., Atoji Y., Shimizu Y., Shiina T., Nikami H., Takewaki T., 2004. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res. Vet. Sci.*, 77, 123-129.
- Houghton PJ., Zarka R., de las Heras B., Houtl JR., 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.*, 61, 33-36.
- Ismail M., Al-Naqeep G., Chan KW., 2010. *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 48, 664-672.
- Kanter M., Meral I., Dede S., Gunduz H., Cemek M., Ozbek H., Uygan I., 2003. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 50, 264-268.
- Mahmood MS., Gilani AH., Khwaja A., Rashid A., Ashfaq MK., 2003. The in vitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytother. Res.* 17, 921-924.
- Marletta MA., 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 268, 12231-12234.
- Miranda KM., Espey MG., Wink DA., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.*, 5, 62-71.
- Moncada S., Palmer RM., Higgs EA., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43, 109-142.
- Nagi MN., Mansour MA., 2000. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol. Res.*, 41, 283-289.
- Rubbo H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M., Freeman B.A., 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, 269, 26066-26075.
- Salem ML., 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacol.*, 5, 1749-1770.
- Slater TF., 1984. Free-Radical Mechanisms in Tissue-Injury. *Biochem. J.*, 222, 1-15.
- Soleimani H., Ranjbar A., Baeri M., Mohammadirad A., Khorasani R., Yasa N., Abdollahi M., 2008.

- Rat plasma oxidation status after nigella Sativa L. botanical treatment in CCL(4)- treated rats. *Toxicol. Mech. Methods.*, 18, 725-731.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1-40.
- Vina J., Estrela JM., Guerri C., Romero FJ., 1980. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, 188, 549-552.
- Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton Jr., Turner N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 134, 489-492.
- Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M., 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135, 372-376.
- Zaher KS., Ahmed WM., Zerizer SN., 2008. Observations on the biological effects of black cumin seed (*Nigella sativa*) and green tea (*Camellia sinensis*). *Global Veterinaria.*, 2, 198-204.