



doi: 10.33188/vetheder.1086458

Araştırma Makalesi / Research Article

Timokinonun akciğerler üzerine immünomodülatör etkisi

Mustafa GÖZÜOĞLU^{1,a}, Şerife TÜTÜNCÜ^{2,b*}

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Atakum, Samsun, Türkiye

ORCID: 0000-0002-9908-9978^a ; 0000-0001-6834-7244^b

MAKALE BİLGİSİ /

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

11 Mart 22
11 March 22

Revizyon/Revised:

31 Mart 22
31 Mart 22

Kabul / Accepted:

18 Nisan 22
18 April 22

Anahtar Sözcükler:

Akciğer
Çörek otu (*Nigella sativa*) yağı
İmmünomodülasyon
İmmunhistokimya
Timokinon

Keywords:

immunomodulatory
immunohistochemistry
lung
Nigella sativa oil
timokinon

ÖZET:

Son zamanlarda bitki antioksidanları, yan etkilerinin az olması ve iyi bir besin takviyesi olmaları nedeni ile oldukça önem kazanmıştır. Timokinon, *Nigella sativa* tohumunun uçucu yağından elde edilen ana aktif fenolik bir bileşik olup yüksek antioksidan özellikleri nedeni ile birçok hastalıkta geleneksel olarak kullanılmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışmalarda, timokinonun antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser gibi birçok faydalı etkilere sahip olabildiği bildirilmiştir. Mevcut çalışmada timokinonun farklı dozlarının ve farklı uygulama şekillerinin akciğerler üzerine yaptığı olası immünomodülatör etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ratlar rastgele 5 gruba ayrıldı ve her grup 7'şer rattan oluştu. Gruplar; 1mg/kg (ip), 2 mg/kg (ip), 10mg/kg (gavaj), 20 mg/kg (gavaj) ve kontrol olarak düzenlendi. Çalışma sonunda ketamin+ ksilazin uygulaması sonrası uyutulan ratlar sakrifiye edildi ve akciğerler alınarak %10'luk Tamponlu Formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin histolojik doku takibi prosedürleri uygulanarak elde edilen kesitlerde normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği kullanıldı. İnterleukin 2 (IL-2) ve interferon gama (IFN- γ)'nın ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanıldı. Sonuç olarak yapılan çalışma ile hem gavaj hem de intraperitoneal yollarla farklı dozlarda uygulanmış timokinonun akciğerler üzerine immünomodülatör etkileri, IL-2 ve IFN- γ 'nın lokalizasyonu ve ekspresyonu gösterildi. IL-2 ve IFN- γ 'nın lokalizasyonu tüm gruplarda bronş ve bronşiyol epitellerinde, bronş ve bronşiyol duvarlarında, alveol duvarındaki hücrelerde gösterildi. Tüm gruplarda farklı şiddetlerde immün pozitif reaksiyonların gözlenmesi, timokinon uygulamasının IL-2 ve IFN- γ salgılanmasını inaktive etmediğini göstermiştir. Bununla birlikte timokinon uygulanan deney gruplarında IFN- γ ve IL-2 reaksiyonlarında azalmaların gözlenmesi, timokinonun akciğerler ve immünomodülasyon mekanizma üzerine olumlu etkiler yaptığını akla getirmektedir.

Immunomodulatory effect of thymoquinone on lungs

ABSTRACT:

Recently, plant antioxidants have gained a lot of importance due to their minimal side effects and being a good nutritional supplement. Thymoquinone is the main active phenolic compound obtained from the essential oil of *Nigella sativa* seed and is traditionally used in many diseases due to its high antioxidant properties. In vitro and in vivo studies have reported that thymoquinone can have many beneficial effects such as anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer. In the present study, it was aimed to investigate the possible immunomodulatory effects of different doses and different administration forms of thymoquinone on the lungs. Rats were randomly divided into 5 groups and each group consisted of 7 rats. The first group was 1mg/kg (ip) group, the second was 2 mg/kg (ip) group, the third was 10mg/kg (gavage) group, the fourth was 20mg/kg (gavage) thymoquinone administration group, the fifth was control group. At the end of the study, anesthetized rats after ketamine + xylazine administration were sacrificed and their lung tissues were removed and fixed in 10% Buffered Formaldehyde solution. Crossmon's triple staining technique was used to examine the normal histological structure in sections obtained by applying routine histological tissue follow-up procedures. One of the immunohistochemical methods, streptavidin-biotin-complex method was used to show the expression of interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- γ). In conclusion, the immunomodulatory effects, localization and expression of IL-2 and IFN- γ on the lungs of thymoquinone administered at different doses by both gavage and intraperitoneal routes were demonstrated. The localization of IL-2 and IFN- γ was demonstrated in bronchial and bronchiolar epithelium, bronchial and bronchiolar walls, and cells in the alveolar wall in all groups. Observation of different intensities of immune positive reactions in all groups showed that thymoquinone administration did not inactivate IL-2 and IFN- γ secretion. However, the decrease in IFN- γ and IL-2 reactions in the experimental groups administered thymoquinone suggests that thymoquinone has positive effects on the lungs and immunomodulation mechanism.

How to cite this article: Gözüoğlu M, Tütüncü Ş. Timokinonun akciğerler üzerine immünomodülatör etkisi. Vet Hekim Der Derg 2022; 93(2): 105-114
DOI: 10.33188/vetheder.1086458

* Sorumlu Yazar e-posta adresi / Corresponding Author e-mail address: serifeonen77@hotmail.com; serife.tutuncu@omu.edu.tr

1. Giriş

Bitkiler uzun yıllardan beri lezzet verici özelliklerinin dışında, hastalıkların tedavilerinde kullanılmıştır. Günümüzde bitkilerle tedavi, diğer bir deyiş ile fitoterapi alternatif tıp uygulamalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fitoterapi amaçlı olarak kullanılan bitkiler oldukça fazla sayıdadır. Bu bitkilerden en yaygın kullanılanlarından biri de çörek otu (*Nigella sativa*, N.sativa)'dur. Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) ailesinde yer alan *Nigella sativa*'nın tohumları baharat olarak ve geleneksel tıpta astım, ateş, ağrı, baş dönmesi, sindirim sistemi problemleri, sinir sistemi hastalıkları, diyabet gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (1, 2).

Bitkinin en sık kullanılan etken maddesi thymoquinone (timokinon)'dur. Timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon) (%18,4-24), çörek otu tohumu uçucu yağının ana biyolojik aktif bileşenidir (1, 3). Timokinonun intravenöz (iv), intraperitoneal (ip), oral, subakut ve subkronik olarak farklı uygulamalarının olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (2). Timokinonun farmakokinetik özellikleri iv ve oral uygulamalar ile tavşanlarda incelenmiştir. Oral uygulamadan sonra görülen klerens değeri 12,30 mL/dk/kg ve Vss 5109,46 mL/kg'dır. Timokinonun patofizyolojik durumlarda birden fazla faktörü hedef aldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Başlıca etkileri; hücre döngüsü ve çoğalması, anjiyogenez, apoptoz, migrasyon, invazyon, metastaz, inflamasyon ve oksidatif stres üzerinedir (1, 2, 4, 5).

Çörek otu tohumları astım ve dispne dâhil solunum yolu problemlerine karşı terapötik etkilere sahiptir. Timokinonun sıçanlarda akut respiratuar sendromu tedavisinde faydalı olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (6). Timokinonun, antiapoptotik etki göstererek sıçanlarda kronik tolüen maruziyeti kaynaklı akciğer hasarını azalttığı ve siklofosamid kaynaklı pulmoner hasara karşı koruyucu etki yaptığı bildirilmiştir (7, 8). El-Khouly ve ark. (9) timokinon ile yaptıkları çalışmalarında; sıçanlarda bleomisin indüklediği pulmoner fibrözisi azalttığı, akciğer alveollerinde amfizemi, antienflamatuar hücre infiltrasyonunu, bronş etrafındaki lenfoid hiperplastik hücre aktivasyonunu ve bleomisin kaynaklı akciğer dokusunda NF-κB'nin aktif form over-ekspresyonunu önlediği, glutatyon S-transferaz ve SOD antioksidan enzim aktivitesini normal değerlere getirdiği bildirilmektedir (9). Timokinonun ip enjeksiyonlarının ovalbümin (OVA) duyarlı farelerde allerjik havayolu inflamasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, timokinonun lökotrien biyosentezinde ana enzim olan 5-lipoksijenaz ekspresyonunu inhibe ederek Lökotrien-B4 ve Lökotrien-C4 seviyelerini düzenlediği bildirilmiştir (10, 11).

Sitokinler, immün ve inflamatuvar olaylara katılan hücrelerin etkinliklerinin artışı veya azalışını sağlayan, uyarılan T, B lenfositler, monositler, makrofajlar ve diğer hücrelerden salınan hormon benzeri etkileri olan moleküller olarak tanımlanabilmektedirler (12). İmmün yanıtın tüm evreleri boyunca üretilen düşük molekül ağırlıklı düzenleyici proteinlerdir. Sitokinler yanıtın hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlerine bağlanarak meydana getirmektedirler. Bir grup sitokin fagositleri çekip onları aktive ederek ateş ve akut-faz yanıtı oluşturarak inflamasyona aracılık ederken diğerleri beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin hematopoezine yönelik olgunlaşma faktörleri olarak işlev görürler. Sitokinler, organizmada immün sisteminin regülasyonunda ve inflamatuvar olaylarda önemli rol oynayan moleküllerdir (12). Timokinon ve akciğerler üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda timokinonun akciğerler üzerine koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (10, 13). Güzelsoy ve ark. (13) yaptıkları çalışmalarında; timokinonun siklofosamid, tolüen ve bleomisin kaynaklı akciğer hasarını azalttığını, benzopiren kaynaklı mide tümörlerini engellediğini ve gentamisin ototoksitesini engelleyerek koruyucu rol aldığını bildirilmektedir (13). Timokinonun uzun süreli tolüene maruziyeti sonrası oluşturulan hipokampal nörodejenerasyon modelinde ise antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (13). Ayrıca Güzel ve ark.(13)'ları yaptıkları çalışmalarında, çörek otu ve timokinonun, radyasyona maruziyetle oluşturulan sıçan beyin dokusundaki nitrosatif strese karşı antioksidan etki gösterdiğini bildirilmiştir (13).

Planlanan bu çalışmanın amacı; timokinon'un farklı dozlarının hem ağız yoluyla hem de intraperitoneal yolla uygulamaları sonrasında akciğer üzerine olan olası immunomodülasyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Kısaca amacımız, timokinon uygulamalarının akciğerler üzerindeki etkin uygulama şeklini belirlemektir.

2. Gereç ve Yöntem

Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. Çalışma materyali olarak 35 adet Sprague Dawley ırkı erişkin dişi rat kullanıldı. Ratlar, Deneysel 1 (1mg/kg timokinon ip), Deneysel 2 (2 mg/kg timokinon ip), Deneysel 3 (10 mg/kg gavaj), Deneysel 4 (20 mg/kg gavaj) ve Kontrol (herhangi bir uygulama yapılmayan) olarak 5 gruba ayrıldı ve her grup 7'şer rattan oluştu. Ratlar ad libitum, pelet şeklinde standart rat yemi ile beslenerek, içme suyunu serbest olarak tüketerek ve 12 saat aydınlık /12 saat karanlık periyodunda, 21-23 °C sıcaklık ve %50-60 nem içeren ortamda bakıldı. 42 gün devam eden çalışmada ratların her timokinon uygulaması öncesinde canlı ağırlıkları tartıldı ve uygulanacak olan timokinon miktarı belirlendi. (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneysel Yönel Etik Kurulu, Deneysel Onay No: 2015/51).

Çalışma sonunda ketamin+ ksilazin uygulaması sonrası uyutulan ratlar sakrifiye edildi. Ardından ratlara ait akciğer dokuları alınarak %10'luk Tamponlu Formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin histolojik doku takibi prosedürleri uygulanarak elde edilen kesitlerde normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği kullanıldı (14). Ayrıca interleukin 2 (IL-2) ve interferon gama (IFN- γ)'nın ekspresyonunu göstermek için immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanıldı. Elde edilen preparatlar Nikon E-80İ araştırma mikroskopu altında ve Nikondigital-sight görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı. İmmunohistokimyasal değerlendirmeler boyanmama(-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı (15).

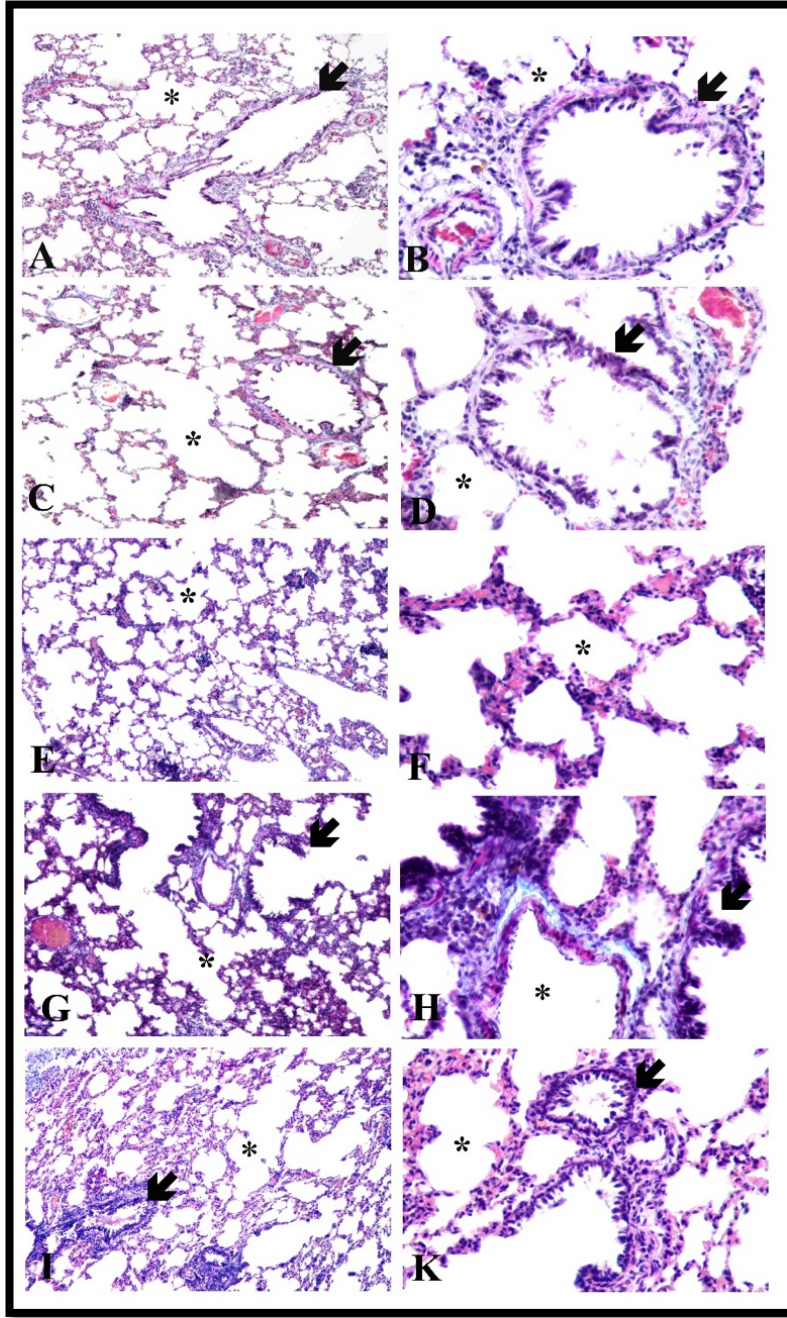
İmmunohistokimyasal boyama:

Parafin bloklardan alınan 5 μ 'luk akciğer kesitlerinde IL-2 ve IFN- γ 'nın varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi (15). İmmunohistokimyasal boyamada rabbit poliklonal IL-2 (Biont, YID5405) ve IFN γ (Biont, 2791) primer antikoları, sekonder antikor olarak da Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab64264) kullanıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra proteoliz için Sitrat Buffer (pH:6) solüsyonu içerisinde, 700 watt'lık devirde, 3x5dk mikrodalga fırında ısıtma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda inkübe edildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla, kit içerisindeki bloking serum damlatıldı. Daha sonra kesitlere 1/750 (IL-2) ve 1/500 (IFN- γ) dilüsyonlarındaki primer antikolar damlatılarak +4 °C'de 1 gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu dokuları üzerine sadece PBS solüsyonu damlatıldı. Kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı (10dk) yıkama işleminden sonra streptavidin-HRP komplekste (10 dk) inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme; akciğerlerdeki bronşlar ve bronşiyollerin epitel hücreleri, bronş ve bronşiyollerin duvar yapısı ve alveol epitel hücrelerinin boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Değerlendirme bağımsız gözlemciler tarafından, boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı.

3. Bulgular

Histolojik bulgular:

Akciğer dokusu incelendiğinde; organın dıştan fibröz bir kapsülle sarılı olduğu belirlendi. Organa özgü alveoler yapı, bronş, bronşiyol ve damarlar net olarak belirlendi. Organ; bronş, bronşiyol ve alveoller yönünden incelendiğinde gruplar arasında bazı morfolojik farklılıklar tespit edildi. Tüm gruplardaki akciğerler incelendiğinde, Akciğerlerdeki lenfosit infiltrasyonlarının, dejenerasyonların ve alveolar yapının tüm deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla düzelmiş olduğu belirlendi (Şekil 1).



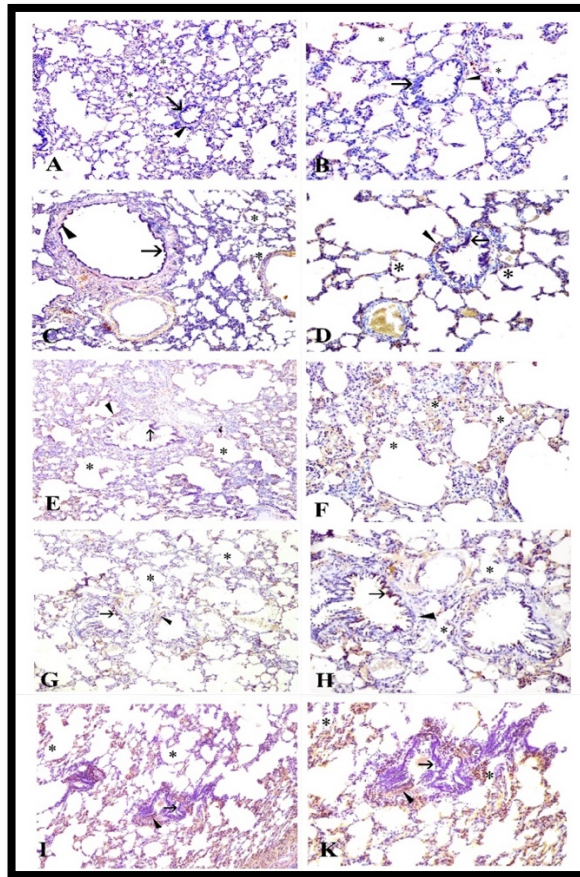
Şekil 1: Tüm gruplara ait akciğerin histolojik görüntüsü, Crossman trichrome boyaması; A. 1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B. 1mg/kg ip (thymoquinone) x40, C. 2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D. 2mg/kg ip (thymoquinone) x10, E. 10mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, F. 10mg/kg gavaj (thymoquinone) x40, G. 20mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, H. 20mg/kg gavaj (thymoquinone) x40, I. kontrol grubu x10, K. kontrol grubu x40

Figure 1: Histological image of the lungs of all groups, Crossman trichrome staining; A. 1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B. 1mg/kg ip (thymoquinone) x40, C. 2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D. 2mg/kg ip (thymoquinone) x10, E. 10mg/kg gavage (thymoquinone) x10, F. 10mg/kg gavage (thymoquinone) x40, G. 20mg/kg gavage (thymoquinone) x10, H. 20mg/kg gavage (thymoquinone) x40, I. control group x10, K. control group x40

İmmunohistokimyasal bulgular:

Akciğerler bronş ve bronşiyollerindeki epitel hücrelerinde, bronş ve bronşiyol duvarındaki hücrelerde ve alveol duvarında bulunan hücrelerde farklı şiddetlerde immun pozitif reaksiyonlar tespit edildi (Şekil 2,4). Negatif kontrol preparatlarında herhangi bir boyanma gözlenmedi (Şekil 3).

IL-2; İmmun pozitif reaksiyonların genellikle bronş ve bronşiyollerin epitel hücrelerinde, bronş ve bronşiyol duvarındaki hücrelerde ve alveol duvarlarında farklı şiddetlerde olduğu gözlemlendi. En yoğun reaksiyonların kontrol grubunda olduğu, diğer gruplarda ise daha hafif immun reaksiyonlar olduğu belirlendi. Bronş ve bronşiyol epitelinde kontrol grubunda çok hafif şiddette immun reaksiyonlar gözlenirken, diğer tüm deney gruplarında reaksiyonun belirgin derecede azaldığı tespit edildi. Bronş ve bronşiyol duvarlarına baktığımızda ise kontrol grubunda orta şiddette reaksiyonlar gözlenirken, ilk iki deney grubunda reaksiyon şiddetinin zayıf olduğu, gavaj uygulanan gruplarda ise birbirine benzer olarak çok zayıfladığı gözlemlendi. Alveol duvarlarındaki reaksiyonlara baktığımızda ise, kontrol grubunda orta şiddette reaksiyonlar gözlenirken, diğer tüm deney gruplarında reaksiyonların azalarak zayıfladığı tespit edildi (Şekil 2, Tablo 1).



Şekil 2: IL-2, immunohistokimyasal boyaması; A.1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B.1mg/kg ip (thymoquinone) x20, C.2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D.2mg/kg ip (thymoquinone) x20, E.10mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, F.10mg/kg gavaj (thymoquinone) x20, G.20mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, H.20mg/kg gavaj (thymoquinone) x20, I.kontrol grubu x10, K.kontrol grubu x20

Figure 2: IL-2, immunohistochemical staining; A.1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B.1mg/kg ip (thymoquinone) x20, C.2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D.2mg/kg ip (thymoquinone) x20, E.10mg/kg gavage (thymoquinone) x10, F.10mg/kg gavage (thymoquinone) x20, G.20mg/kg gavage (thymoquinone) x10, H.20mg/kg gavage (thymoquinone) x20, I. control group x10, K. control group x20

Tablo 1: IL-2'nin ortalama immunohistokimyasal reaksiyon şiddetleri**Table 1:** Mean immunohistochemical intensities of IL-2

Grup	Bronş ve bronşiyol epiteli	Bronş ve bronşiyol duvarı	Alveol Duvarı
Kontrol Grubu	±	++	+++
1.Grup (1mg/kg,ip)	-	+	++
2.Grup (2mg/kg,ip)	-	+	+
3.Grup (10mg/kg,gavaj)	-	±	+
4.Grup (20mg/kg,gavaj)	++	+	+

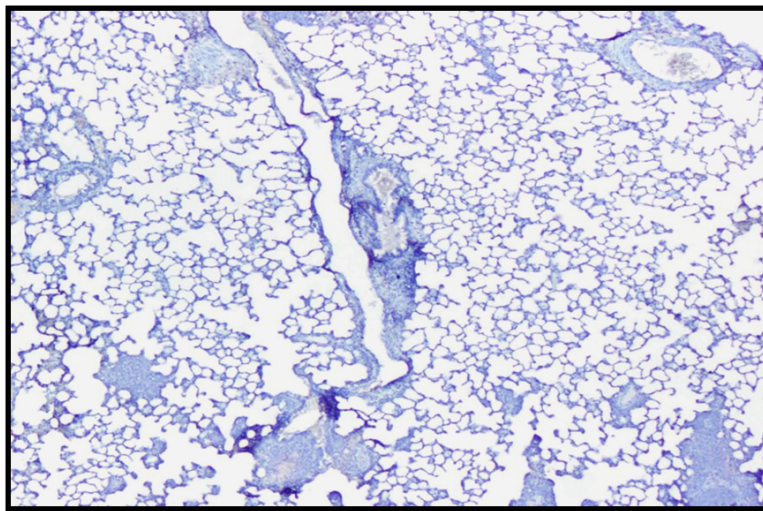
Boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++)

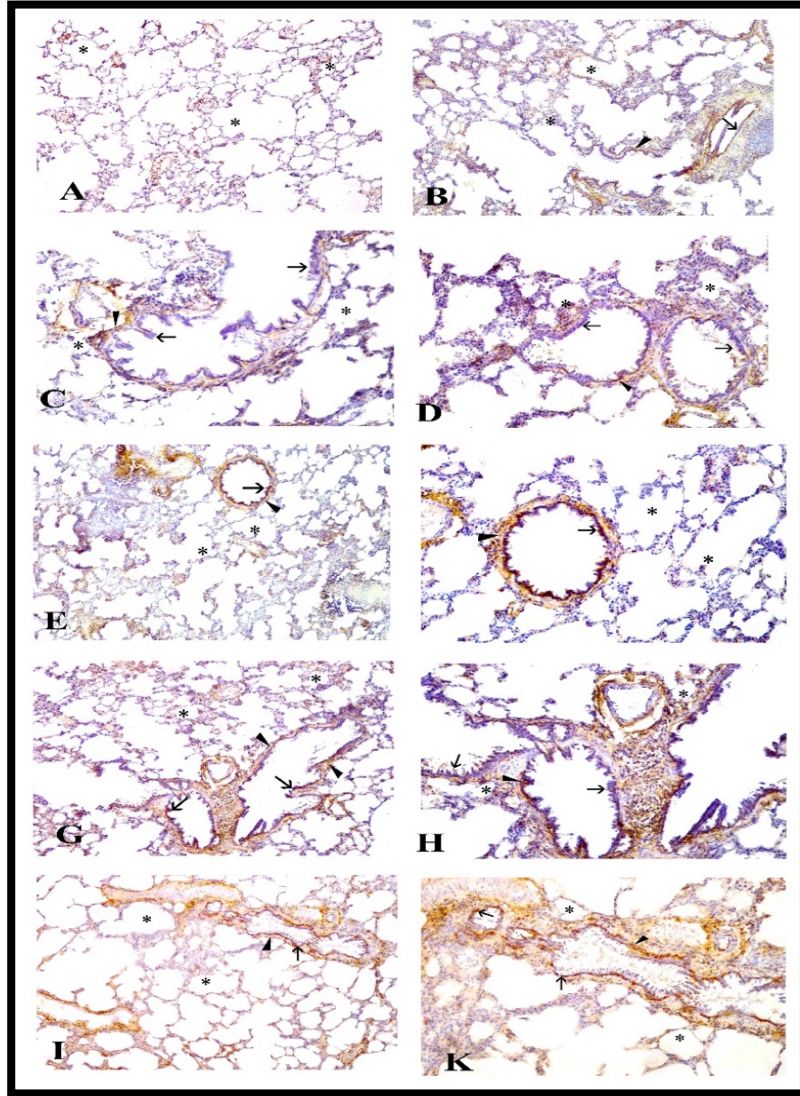
IFN- γ ; Tüm gruplar ayrıntılı olarak incelendiğinde bronş ve bronşiyol epitellerinde en şiddetli boyanmanın kontrol, en zayıf boyanmanın ise ikinci deney grubunda olduğu gözlemlendi. Diğer üç grupta ise birbirine benzer olarak orta şiddette immun pozitif reaksiyonlar tespit edildi. Bronş ve bronşiyol duvarlarında en yoğun boyanmanın kontrol ve üçüncü deney grubunda olduğu gözlenirken diğer üç grupta ise birbirine benzer olarak zayıf reaksiyonlar belirlendi. Alveollerin duvarlarına baktığımızda ise, kontrol grubunda orta şiddette reaksiyonların varlığı gözlenirken deney gruplarında birbirlerine benzer şekilde zayıf reaksiyonların varlığı tespit edildi (Şekil 4, Tablo 2).

Tablo 2: IFN- γ 'nın ortalama immunohistokimyasal reaksiyon şiddetleri**Table 2:** Mean immunohistochemical reaction intensities of IFN- γ

Boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++)

Grup	Bronş ve bronşiyol epiteli	Bronş ve bronşiyol duvarı	Alveol Duvarı
Kontrol Grubu	+++	++	++
1.Grup (1mg/kg ,ip)	++	+	++
2.Grup (2mg/kg ,ip)	+	+	+
3.Grup (10mg/kg,gavaj)	++	++	+
4.Grup (20mg/kg,gavaj)	++	++	+

**Şekil 3:** Negatif kontrol preparatı x10**Figure 3:** Negative control preparation x10



Şekil 4: IFN- γ , immunohistokimyasal boyaması; A.1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B.1mg/kg ip (thymoquinone) x20, C.2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D.2mg/kg ip (thymoquinone) x20, E.10mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, F. 10mg/kg gavaj (thymoquinone) x20, G. 20mg/kg gavaj (thymoquinone) x10, H. 20mg/kg gavaj (thymoquinone) x20, I. kontrol grubu x10, K. kontrol grubu x20

Figure 4: IFN- γ , immunohistochemical staining; A.1mg/kg ip (thymoquinone) x10, B.1mg/kg ip (thymoquinone) x20, C.2 mg/kg ip (thymoquinone) x10, D.2mg/kg ip (thymoquinone) x20, E.10mg/kg gavage (thymoquinone) x10, F.10mg/kg gavage (thymoquinone) x20, G.20mg/kg gavage (thymoquinone) x10, H.20mg/kg gavage (thymoquinone) x20, I. control group x10, K. control group x20

4. Tartışma ve Sonuç

N. sativa tohumunun uçucu yağından elde edilen timokinonun içerdiği fenolik bileşiklerden ve faydalı farmakolojik etkileri nedeni ile geleneksel olarak ve tıpta tedaviye destek olarak yaygın kullanımı söz konusudur. Timokinon yüksek antioksidan özelliğe sahip ana aktif fenolik bir bileşik içermesinden dolayı birçok çalışmada antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanserojen gibi faydalı etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Timokinonun oksidatif hasara karşı böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğunu gösteren birçok makale mevcuttur (16).

Timokinon ve akciğerler üzerine yapılan çalışmalarda; timokinonun siklofosfamid, toluen ve bleomisin kaynaklı akciğer hasarını azalttığı, benzopiren kaynaklı mide tümörlerini engellediği ve gentamisin ototoksitesini engelleyerek koruyucu rol aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (13). El Gazzar ve ark. (10) timokinonun akciğerdeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, Th2 sitokinleri ve akciğer eozinofilisini azaltarak alerjik astımda pulmoner inflamasyonu azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, serumdaki yükselmiş IgG1 ve OVA spesifik IgE seviyelerini de azalttığı tespit edilmiştir (10). Bronkoalveoler lavaj sıvısında IFN- γ üretimini indüklediği ve IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimini azalttığı gösterilmiştir. Timokinonun LT-C4 ve LT-B4 üretimini ve 5-LO ekspresyonunu azaltarak hava yolundaki inflamasyonu düzelttiğini bildirilmişlerdir. Çalışmamızda deney gruplarımızda genel olarak IFN- γ düzeylerinin bronş, bronşiyol epitelleri ve duvarlarında ve alveollerdeki immün pozitif reaksiyonlarda azalma olduğu gözlemlenmiştir. Gazar ve ark. (10) bulgularının aksine çalışmamızda tüm deney gruplarında IFN- γ düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın sebebinin ise doz, uygulama şekli ve mevcut inflamasyon durumundan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan bir in vivo çalışmada *N. sativa* yağı ile dört hafta tedavi gören deneklerin çoğunda CD4/CD8'de %55 oranında artış ve NK hücre fonksiyonlarında %30 artış olduğu gösterilmiştir (17, 18). İnsan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılarak *N. sativa* tohum proteinlerinin sitokin üretimi üzerine etkileri araştırılarak proteinlerin allojenik hücreler varlığında ya da olmaksızın kültüre alındığında lenfositler tarafından IL-3 ve IL-1'in üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (19). Bu *N. sativa* proteinlerinin saf hücrelerinin kendisi üzerinde stimülatör etki oluşturduğunu göstermektedir. Yine de aynı üretim şartları altında *N. sativa* tohumlarının saf ekstresi ya da çözünebilir fraksiyonları IL-2 ve IL-4'ün üretimi üzerine hiçbir etki göstermemiştir (19). Mevcut çalışmamızda timokinonun intraperitoneal ve gavaj yoluyla verilip akciğer dokuları üzerindeki immünmodülatör etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. Haq ve ark.'nın (19) bulgularının aksine, akciğer bronşiyollerinde ve alveollerinde IL-2 seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızın bulguları değerlendirildiğinde, IL-2 ve IFN- γ ekspresyonun; akciğerlerde bronş ve bronşiyollerin epitel hücrelerinde, bronş ve bronşiyol duvarındaki hücrelerde ve alveol duvarında bulunan hücrelerde farklı şiddette reaksiyon gösterdiği belirlendi. Ancak bu farklılıkların sebeplerinin daha iyi anlaşılabilmesi için çeşitli metabolik yollar üzerindeki etkilerinin araştırılması ve farklı yöntemler kullanılan daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca, çörek otu tohumu ve etkin bileşenlerinin ilaç olarak kullanılabilmesi için yapısındaki etkin bileşiklerinin belirlenerek ve standardize edilerek, klinik ve toksikolojik çalışmaları da kapsayacak şekilde ileri araştırma aşamalarından geçmesi ve kalite, etkililik ve güvenilirlik açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Timokinonun akciğer dokuları üzerinde yapılan incelemelerde özellikle gavaj yoluyla verilen gruplarda bronş ve bronşiyol epiteli ile bronş ve bronşiyol duvarlarında birbirine benzer ve kontrol grubuna kıyasla daha hafif immün reaksiyonlar gözlemlenmiştir. İntraperitoneal olarak verilen gruplarda bronş ve bronşiyol duvarı ile alveol duvarında zayıf şiddette immün pozitif reaksiyon gözlemlendi. Özellikle IFN- γ ekspresyonunun azalmasına bakılırsa; timokinonun akciğer doku hasarı ve rahatsızlıklarında tedaviyi desteklemesi ve geleneksel tıpa destekleyici tedavi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Daha kapsamlı çalışma yapılması daha kapsamlı sonuçlar elde edebileceğimize ışık tutmaktadır. Timokinonun akciğer hastalıkları tedavisine destek ve yardımcı olarak kullanılabilmesi yapılan çalışmamızla desteklenmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışma ile hem gavaj hem de intraperitoneal yollarla farklı dozlarda uygulanmış timokinonun akciğerler üzerine immünmodülatör etkileri, IL-2 ve IFN- γ 'nın lokalizasyonu ve ekspresyonu gösterildi. IL-2 ve IFN- γ 'nın lokalizasyonu tüm gruplarda bronş ve bronşiyol epitellerinde, bronş ve bronşiyol duvarlarında, alveol duvarındaki hücrelerde gösterilmiştir. Tüm gruplarda farklı şiddetlerde immün pozitif reaksiyonların gözlenmesi, timokinon uygulamasının IL-2 ve IFN- γ salgılanmasını inaktive etmediğini göstermiştir. Uygulama şekillerini karşılaştırdığımızda en belirgin azalmanın ikinci deney (2mg/kg ip) grubunda olması intraperitoneal uygulamanın, gavaj uygulamasına göre daha etkili olduğunu düşünmemizi sağlamıştır. Bununla birlikte timokinon uygulanan tüm deney gruplarında IFN- γ ve IL-2 reaksiyonlarında azalmaların gözlenmesi, timokinonun akciğerler ve immünmodülasyon mekanizma üzerine olumlu etkiler yaptığını akla getirmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların çalışma kapsamında herhangi bir kişisel ve finansal çıkar çatışması yoktur.

Finansal Kaynak Beyanı

Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri bünyesinde yürütülmüş olan PYO.VET.1901.18.001 numaralı projenin bütçesinden desteklenmiştir.

Yazar Katkısı Beyanı

Fikir/kavram: Şerife TÜTÜNCÜ

Deney tasarımı: Şerife TÜTÜNCÜ

Denetleme/Danışmanlık: Şerife TÜTÜNCÜ

Veri toplama: Şerife TÜTÜNCÜ, Mustafa GÖZÜOĞLU

Veri analizi ve yorum: Şerife TÜTÜNCÜ, Mustafa GÖZÜOĞLU

Kaynak taraması: Şerife TÜTÜNCÜ, Mustafa GÖZÜOĞLU

Makalenin yazımı: Şerife TÜTÜNCÜ, Mustafa GÖZÜOĞLU

Eleştirel inceleme: Şerife TÜTÜNCÜ

Etik Onay

Çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alınmıştır. (Deneysel Onay Tarih ve Sayı: 2015/51)

Kaynaklar

1. Khader M, Eckl PM. Timokinin: an emerging natural drug with a widerange of Medical applications Iranian. Iran J Basic Med Sci 2014;17(12):950-7.
2. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Timokinin and its therapeutic potentials. Pharmacol Res 2015; 95-96:138-58.
3. Forouzanfar F, Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black cummin (Nigellasativa) and its constituent (timokinin): a review on antimicrobial effects. Iran J Basic Med Sci 2014;17(12):929-38.
4. Gerige SJ, Gerige MKY, Rao M. GC-MS analysis of Nigella sativa Sedds and antimicrobial activitiy of its volatile oil. Braz Arch Biol Technol 2009; 52(5):1189-92.
5. Shafiq H, Ahmad A, Masud T, Kalem M. Cardio-protective and anti-cancer Therapeutic potential of Nigella sativa. Iran J Basic Med Sci 2014;17(12):967-79.
6. Isik AF, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A newagentfortreatment of acuterespiratory distresssyndrome: timokinin. An experimentalstudy in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg 2005; 28(2):301-5.
7. Kanter M. Timokinin attenuates lung injury induced by chronic tolüene exposure in rats. Toxicology and Health 2011; 27(5):387-95.
8. Suddek GM, Ashry NA, Gameil NM. Timokinin attenuates Cyclo phosphamide induced pulmonary injury in rats. Inflammopharmacology 2013;21(6):427-35.
9. El-Khouly D, El-Bakly WM, Awad AS, El Mesallamy HO, El-Demerdash E. Timokinin blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor KappaB in rats. Toxicology 2012; 302(2-3):106- 13.
10. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of timokinin in a mouse model of allergic lung inflammation. Int Immunopharmacol 2006; 6(7):1135-42.

11. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N. Ameliorative effect of timokinon on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. *Curr Eye Res* 2011; 36(7):591-8
12. Tunalı Y. İmmünoloji. Bursa: Dora Yayınları: 2018.
13. Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek otunun (*NigelleSativa L.*) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *J Lit Pharm Sci* 2018;7(2):118-35
14. Crossmon G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomic Rec* 1937; 69: 33-38.
15. True LD. Principles of Immunohistochemistry. 2nd ed. New York, NY, USA: Gower Medical Publishing: 1990.
16. Khan RU, Rashid A and Khan A. Effect of cutting chickpea at different dates on green fodder and seed yield under rainfed condition. *Pak J Biol Sci* 1999; 2(2): 347-349.DOI: 10.3923/pjbs.1999.347.349
17. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ionex change chromatography. *Int Immunopharmacol* 1999; 21: 283–295.
18. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* seed. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1749-1770.
19. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, al- Sedairy ST. *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacol* 1995; 30: 147– 155.