

## RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2024; 43 (1) 15-21  
DOI:10.30782/jrv.1349746

# Timokinon Uygulanan Rat Midesinde IL-2 ve IL-4'ün İmmunohistokimyasal Ekspresyonları ile Antienflamatuar Etkisi

Şerife TÛTÛNCÛ<sup>1\*</sup>, Tuğrul ERTUĞRUL<sup>1</sup>,  
Nurcan DELİCE<sup>1</sup>, Bengül ÖZDEMİR<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> University of Ondokuz Mayıs, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Samsun, Turkey

<sup>2</sup> University of Kafkas, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Kars, Turkey

Received 25-08-2023 Accepted 15-02-2024

## Özet

*Nigella sativa* (*N. Sativa*), eski Mısır ve Yunan hekimleri tarafından çeşitli ağrılar ve hastalıklarda kullanılan, uzun tıbbi geçmişe sahip olan bir bitkidir. Bitkinin asıl etken maddesi ise thymoquinone adı verilen bir maddedir. Çalışmamız, farklı hastalıklar üzerine etkileri olan timokinonun, oral gavaj yoluyla farklı dozlarda uygulanmasının ardından mideye olası etkilerini *in vivo* olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu değerlendirme histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilecektir. Çalışma materyali olarak Sprague Dawley soyundan 21 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar, deney grubu 1 (10 mg/kg gavaj), deney grubu 2 (20 mg/kg gavaj) ve kontrol grubu olmak üzere yedi sıçandan oluşan üçer gruba ayrıldı. Deney gruplarına kırk iki gün boyunca her gün 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında timokinon oral gavaj ile uygulanmıştır. Mevcut çalışma sonucunda immun sistemde etkili olan antienflamatuar sitokinlerden IL-2 ve IL-4'ün midedeki ekspresyonları *in vivo* olarak gösterilmiştir. Tüm gruplardaki sıçanların mide mukozalarında farklı şiddetlerde immun reaksiyonlar gözlenmiştir. Böylelikle timokinonun farklı dozlarının sitokinleri inaktive etmediği ancak sitokin türüne ve doza bağlı olarak farklılıklar olduğu sonucuna varılmıştır. Anahtar kelimeler: İmmunohistokimya, İnflamasyon, Mide, Sıçan, Sitokin, Timokinon

## Immunohistochemical Expression of IL-2 and IL-4 in Thymoquinone Treated Rat Stomach and Anti-inflammatory Effect Abstract

*N. Sativa*, a botanical specimen with an extensive medical history, has been historically employed by ancient Egyptian and Greek medical doctors to alleviate diverse afflictions and maladies. The plant contains a key bioactive component referred to as thymoquinone. Our study aims to assess the potential effects of thymoquinone, which impacts various diseases, on the stomach following oral gavage administration at different dosages. This assessment will be conducted *in vivo* and employ histochemical and immunohistochemical methods. A total of 21 rats of the Sprague-Dawley strain were used as the study material. The rats were divided into three groups: Experimental Group 1 (10 mg/kg gavage), Experimental Group 2 (20 mg/kg gavage), and the control group, each consisting of seven rats. Thymoquinone was administered to the experimental groups via oral gavage at 10 mg/kg and 20 mg/kg daily for forty-two days. As a result of this study demonstrated the expression of anti-inflammatory cytokines such as IL-2 and IL-4, which are effective in the immune system in the stomach *in vivo*. Distinct levels of immune reactions have been observed in the gastric mucosae of all groups of rats. Thus, it has been concluded that different doses of thymoquinone do not render cytokines inactive; however, variations are contingent upon the type and dosage of cytokine.

Keywords: Cytokine, Immunohistochemistry, Inflammation, Rat, Stomach, Thymoquinone

\* Corresponding author: Serife Tutuncu, Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun,55200, Turkey.Tel: 0 533 4770384 serife.tutuncu@omu.edu.tr

## Giriş

Son yıllarda tedavi ve destek amaçlı kullanılan bitkisel kökenli besin ürünlerinin ve gıda takviyelerinin kullanımını artmıştır. Eski dönemlerden beri çeşitli bitkiler hastalıkların tedavilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1). Günümüzde de bu tür bitkilerin hala aktif bir şekilde kullanılmasının sebebi kimyasal ilaçlara göre bitkisel tedavilerin daha etkili, güvenli, daha az toksik, kolayca kullanılabilen ve uygun fiyatlı olmasıdır (2). Bu nedenle tıpta bitkilerin tedavi potansiyelleri ve tıbbi kullanımları konusunda ciddi araştırmalar yapılmaktadır. Çörek otu (*N. Sativa*) bu amaçla kullanılan bitkiler arasında yer almaktadır. *N. Sativa* tohumları Ranunculaceae familyasına ait, yaygın olarak baharat şeklinde tüketilen bir bitkidir. Klinik bulgular ile farmasötik etkinlikleri bilimsel olarak kanıtlanan çörek otu aynı zamanda tedavi amacı ile tercih edilmektedir (3, 4). Geleneksel tıpta öksürük, astım, mide ağrısı, karın ağrısı, romatizma, diyabet, karaciğer ve deri hastalıklarında kullanılmaktadır (3-5). Aynı zamanda anti-inflamatuar, immunomodulator, antioksidan olarak da kullanıldığı bildirilmiştir (5-7). Yapılan bilimsel araştırmalarda *N. Sativa* tohumu yapısında bulunan vitaminler, etken maddeler ve yağ asitleri nedeni ile tüketilmesi faydalı olabilecek ürünlerin başında gelmektedir. Çörek otunun biyolojik aktif bileşikleri arasında timokinon, timohidrokinon, ditimokinon yer almaktadır (8, 9). Tohumlardaki nitrosötik maddenin ise timokinon olduğu bildirilmektedir (5, 6, 10, 11). Koshak ve ark. (2017) yapmış oldukları çalışmalarında *N. Sativa* ve aktif bileşeni olan timokinonun anti-histaminik, anti-eozinofilik, anti-immunoglobulin özellikleri olduğunu ve proinflamatuar sitokinleri azalttığını rapor etmiştir (3). Alkhatabi ve ark. (2022) ise timokinon uygulamalarının makrofaj aktivitelerini ve interferon gama (IFN $\gamma$ ) konsantrasyonlarını arttırdığını bildirmiştir (6).

Günümüzde gastrointestinal sistem problemleri oldukça yaygındır ve çoğu hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar *N. Sativa* ve timokinonun artan mide asiditesini azaltarak, mide mukoza hasarını önlemede önemli bir rol oynadığını göstermiştir (13). Çörek otu ve timokinonun inflamasyon üzerine etkilerini göstermek için yapılan çalışmalar sonucunda etken maddenin inflamasyonda etkili olan sitokinler üzerine baskılayıcı ya da harekete geçirici etkileri olduğu gösterilmiştir (14).

Çalışmamız, farklı hastalıklar üzerine etkileri olan timokinonun, oral gavaj yoluyla farklı dozlarda uygulanmasının ardından mideye olası etkilerini *in vivo* olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

## Materyal ve Metod

Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütüldü. Çalışma materyali olarak Sprague Dawley soyundan 21 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar, deney grubu 1 (10 mg/kg gavaj), deney grubu 2 (20 mg/kg gavaj) ve kontrol grubu olmak üzere yedi sıçandan oluşan üçer gruba ayrıldı. Deney gruplarına kırk iki gün boyunca her gün 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında timokinon oral gavaj ile uygulandı. Çalışma boyunca, sıçanlar standart sıçan yemi şeklindeki peletlerle ad libitum beslendi, içme suyunu serbestçe tükettiler ve 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık periyodunda, 21-23 °C sıcaklık ve %50-60 nem içeren bir ortamda tutuldu. Her timokinon uygulamasından önce sıçanların canlı ağırlıkları ölçüldü ve uygulanacak timokinon miktarı belirlendi.

### Organların Alınması, Tespit ve Takip

Çalışmanın sonunda, sıçanlar canlı vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra ketamin-ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek mideleri alındı. Alınan dokular 24 saat süre ile %10'luk tamponlu formaldehit tespit solüsyonunda tespit edildi. Rutin histolojik doku takibi prosedürleri uygulanarak dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan LEICA RM 2235 döner mikrotom kullanılarak 5  $\mu$ 'luk kesitler alındı. Parafin bloklardan alınan 5  $\mu$ 'luk kesitlere histolojik yapının incelenmesi için Crossman'ın üçlü boyama tekniği uygulandı (15). Ayrıca parafin bloklardan alınan doku kesitlerinde IL-2 ve IL-4'ün varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi.

### İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan 5  $\mu$ 'luk kesitlerde IL-2 ve IL-4'ün varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi (16). İmmunohistokimyasal boyamada tavşan poliklonal IL-2 (Biont, YID5405) ve IL-4 (Biont, YID2904) primer antikoları kullanıldı. Sekonder antikor olarak fare ve tavşana özgü HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab64264) kullanıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra proteoliz için Sitrat Buffer (pH:6) solüsyonu içerisinde 700 watt'lık devirde 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 kesitlerde spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla, kit içerisindeki serum damlatıldı. Daha sonra kesitlere IL-2 ve IL-4 primer antikoları 1/750 dilüsyonlarında damlatılarak +4 0C'de 1 gece bırakıldı. Yıkama işlemini taki-

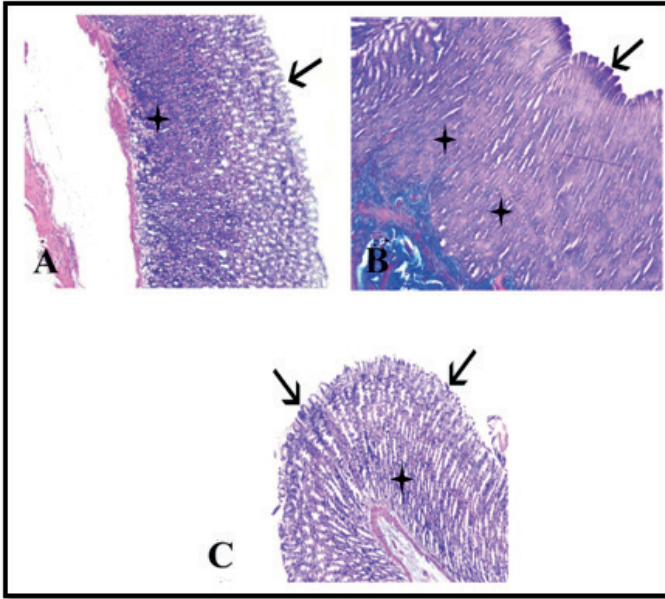
ben kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra streptavidin-HRP komplekste inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon E-50İ araştırma mikroskobu altında ve Nikon digital-sight DS-U3 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.

## Bulgular

### Histolojik Bulgular

Tüm gruplara ait mide kesitleri Crossman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi. Midenin fundus bölgesi ayrıntılı olarak incelendi. Mide mukozasının tek katlı prizmatik epitel ile döşeli olduğu, epitelin altındaki propriya bölgesinde fundus bezlerini oluşturan hücrelerin varlığı tespit edildi. Tüm gruplardaki mide preparatları incelendiğinde, histolojik yapının normal olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edilmedi (Şekil-1).



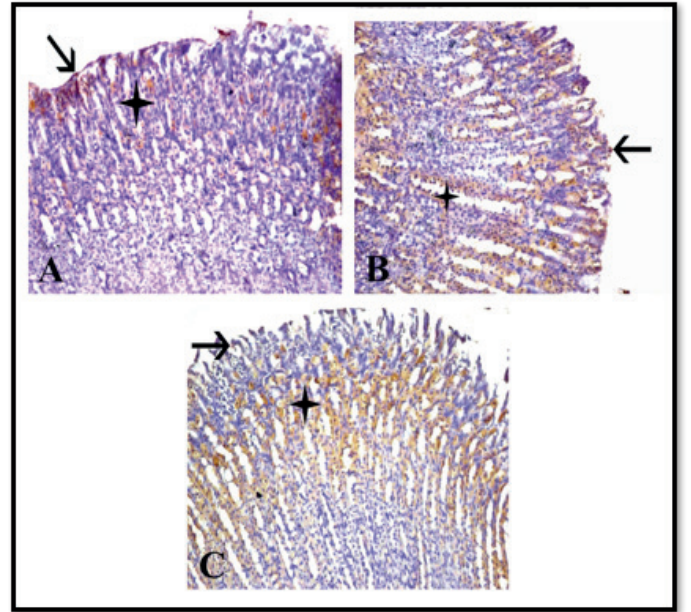
Şekil-1: Mide trikrom (üçlü) boyama; A: 10mg/kg timokinin (gavaj); B: 20mg/kg timokinin (gavaj); C: kontrol grubu mide, \*: lamina propriya, Ok: mide epitel, x10

### İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal olarak IL-2 ve IL-4 ekspresyonları midede gösterildi.

### IL-2

Yapılan değerlendirmeler sonucunda farklı gruplardaki ratlara ait mide kesitlerinde farklı şiddetlerde immun pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. 10 mg/kg (gavaj) grubundaki sıçanların mide epitelindeki immun reaksiyon şiddetinin 20 mg/kg (gavaj) uygulama yapılan gruba göre daha yoğun olduğu belirlendi. Kontrol grubunda ise epitel hücrelerinde deney gruplarına göre zayıf şiddette reaksiyonlar tespit edildi. Lamina propriyalardaki boyanmalara baktığımızda ise 10 mg/kg (gavaj) uygulanan birinci deney grubundaki immun reaksiyon yoğunluğunun orta şiddette olduğu gözlemlendi. 20mg/kg (gavaj) timokinin uygulanan ikinci deney grubunda ise zayıf şiddette immun reaksiyonlar tespit edildi. Kontrol grubunda ise immun reaksiyon yoğunluğu birinci deney grubuna benzer şekilde orta şiddette olduğu belirlendi. (Şekil-2 Tablo-1).



Şekil-2: A: 10 mg/kg timokinin (gavaj); B: 20 mg/kg timokinin (gavaj); C: kontrol grubu mide, \*: lamina propriya, ok: mide epitel, IL-2 ekspresyonu, x20.

Tablo-1: IL-2'nin midedeki ortalama immunohistokimyasal reaksiyon şiddetleri

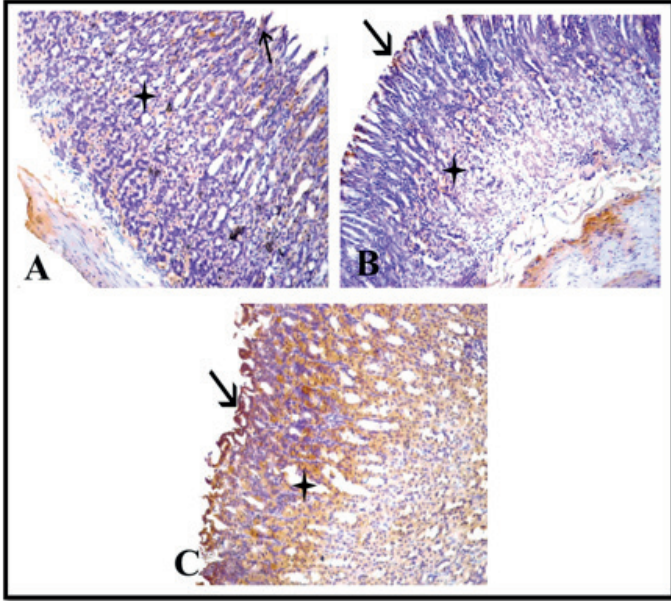
Boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şiddetli boyanma (+++)

| Mide                                 | Epitel hücresi | Lamina propria |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| I. Deney grubu (10mg/kg timokinin)   | +++            | +++            |
| II. Deney grubu (20 mg/kg timokinin) | ++             | ++             |
| Kontrol grubu                        | ±              | +              |



#### IL-4

Yapılan değerlendirmeler sonucunda sıçanlara ait midele-  
rde farklı şiddetlerde immün pozitif reaksiyonlar gözle-  
ndi. Mide epitelinde en şiddetli immün reaksiyonların kontrol  
grubunda olduğu gözlemlendi. 10 mg/kg (gavaj) ve 20 mg/  
kg (gavaj) gruplarında ise immün reaksiyon şiddetlerinin  
birbirine benzer olarak orta şiddette olduğu tespit edildi.  
Lamina propriyadaki bezlerin boyanma şiddetlerine bak-  
tığımızda ise en yoğun boyanma şiddetinin kontrol gru-  
bunda ve orta şiddette olduğu belirlendi. Diğer iki deney  
grubunda ise immün reaksiyonların birbirine benzer  
olarak zayıf şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil-3, Tablo-2).



Şekil-3: A: 10mg/kg timokinin (gavaj); B: 20mg/kg timokinin (gavaj);  
C: kontrol grubu mide, \*: lamina propriya, Ok: mide epiteli, IL-4 ek-  
spresyonu, x20.

Tablo-2: IL-4'ün midedeki ortalama immunohistokimyasal reaksiyon  
şiddetleri

Boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) ve şid-  
detli boyanma (+++)

| Mide                                 | Epitel hücresi | Lamina propria |
|--------------------------------------|----------------|----------------|
| I.Deney grubu (10mg/kg timokinin)    | ++             | +              |
| II. Deney grubu (20 mg/kg timokinin) | ++             | +              |
| Kontrol                              | +++            | ++             |

#### Tartışma ve Sonuç

İmmünomodülatör etkileri ve düşük sitotoksitesi ned-  
eniyle *N. Sativa* astım, alerji, enfeksiyöz ve metabolik sen-  
drom gibi bir çok hastalıkta kullanılmaktadır. Yaptığımız  
çalışmamızda, *N. Sativa*'nın en yaygın kullanılan etken  
maddelerinden olan timokininin farklı dozlarının gavaj  
yolu ile uygulanması sonrasında sıçan midesi üzerine olası  
antiinflamatuvar etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda mide dokuları ayrıntılı olarak değeri-  
lendirildi. Timokinin'in farklı dozlarının oral gavaj ile uygu-  
lamasının midede histolojik olarak belirgin bir yapısal  
farklılık oluşturmadığı tespit edildi. Çalışmamızın bulgu-  
ları, Hartavi'nin (2019) yılında sıçan pankreasında timok-  
inin ile yapmış olduğu çalışmanın bulguları ile paralellik  
göstermektedir (17).

Çalışmamızda yapılan immunohistokimyasal boyamalar  
sonucunda, timokinin'in gavaj uygulamaları sonucunda  
mide epitelinde IL-2 ekspresyonlarının kontrol grubu-  
na göre arttığı, lamina propriyada ki bezlerde ise ekspre-  
syonda azalma olduğu gözlemlenmiştir. Mide bezlerindeki  
bulgularımız Koshak ve ark.'nın (2018) timokinin uygu-  
lamaları sonrasında IL-2 seviyelerinin azaldığını bildirdi-  
ikleri çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir (12). Mide  
epitelindeki tespit ettiğimiz reaksiyon azalmaları ise Co-  
bourne-Duval ve ark.'nın (2018) mikrogliya hücrelerinde  
yaptıkları çalışmalarının bulguları ile farklılık göster-  
mektedir (18). Metabolik sendromlu hastalar ile yapılan  
çalışmada, timokinin uygulamalarının IL-10 seviyeleri-  
ni arttırdığı bildirilmiştir (7). Çalışmamızda timokinin  
uygulanan gruplarda IL-2 seviyelerindeki artışlar Akrom  
ve ark.'nın (2021) çalışmalarının bulguları ile paralellik  
göstermektedir (7). Hadi ve ark. (2018) yaptıkları başka  
bir çalışmada ise timokininin IL-1B, IL-6 ve Tnf alfa gibi  
inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını azalttığı, IL-10  
gibi antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını arttırdığını  
bildirmiştir (4). Çalışmamızda IL-2 seviyelerindeki artışlar  
Hadi ve ark.'nın (2018) çalışmaları ile uyumluluk göster-  
mektedir(4).

Timokininin 10 mg/kg ve 20 mg/kg gavaj uygulamaları  
sonucunda mide epitelinde ve bezlerinde IL-4 ekspre-  
syonunları kontrol grubuna göre azalmıştır. IL-4 ekspre-  
syonunun azalması, Günel ve ark.'nın (2017) solunum  
siteminde yapmış oldukları çalışmalarının bulguları ile  
paralellik göstermektedir (19). Alkhattabi ve ark. (2022)  
timokininin monosit kökenli hücre yüzey molekül ek-  
spresyonu ve fagositozis üzerine etkilerini araştırdıkları  
çalışmalarında, timokinin uygulamalarının makrofaj  
aktivitesini arttırdığını bildirmişler (6). Çalışmamızın  
bulguları Alkhattabi ve ark.'nın (2022) yaptıkları çalışma-  
larının bulguları ile benzerlik göstermektedir. Akrom ve  
ark. (2021) çörek otu yağı uygulamasının antiinflamatuvar  
sitokinlerden biri olan IL-10 seviyelerinde artış olduğunu  
tespit etmişlerdir (7). Mevcut çalışmamızda ise IL-4 seviye-  
lerinde deney gruplarında azalmalar olduğu tespit edil-  
miştir. Çalışmamızın bulguları Akrom ve ark.'nın (2021)  
çalışmalarının bulguları ile farklılık göstermektedir. Bu

farklılığın sebebinin uygulanan timokinon miktarı, süresi, şekli ve sitokin türü ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

Timokinon Th1 ve Th2 dengesinde rol oynayan önemli bir immunmodülatör maddedir. Timokinon'un Th1/Th2 bağımsız dengesini değiştirerek Th1'in baskın olmasına yol açtığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Benzer şekilde timokinonun IL-4 üretimini baskılayabildiğini bildiren çalışmalarda mevcuttur (20). Yapılan bir çalışmada timokinon uygulamasının hücrelerdeki IL-1 $\beta$ 'nin inhibisyonu yoluyla IL-4 seviyelerini azaltabileceğini bildirilmiştir. Bu sayede Th1 dengesinin yeniden kurulduğu belirtilmiştir (21). Çalışmamızda mide epitelinde IL-2 ekspresyonundaki artışlar ve IL-4 ekspresyonundaki azalmalar belirtilen çalışmanın bulguları ile uyumluluk göstermektedir.

Sonuç olarak sunulan bu çalışma ile timokinon'un farklı dozlarının gavaj yoluyla uygulamaları sonrasında mide üzerine olan olası antiinflamatuar etkileri incelenmiştir. İnflamasyonda etkili olan sitokinlerden IL-2 ve IL-4'ün mide epiteli ve bezlerindeki lokalizasyon ve ekspresyonları *in vivo* olarak gösterilmiş ve timokinonun midedeki antiinflamatuar etkileri gösterilmiştir. IL-2 ve IL-4 ekspresyonları tüm gruplarda; mide mukozasını oluşturan epitel ve bezlerdeki hücrelerde gösterilmiştir. Tüm gruplarda farklı şiddette immun reaksiyonların gözlenmesi, timokinonun farklı uygulama şekillerinin sitokinleri inaktive etmediğini göstermiştir. Ancak ekspresyon şiddetleri sitokin türüne ve doza göre değişiklik göstermektedir. Timokinonun gavaj uygulamaları sonucunda mide epitelinde IL-2 ekspresyonlarının artmasının, IL-4 seviyelerinin azalmasının Th1 ve Th2 dengesinin korunmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu bulgularımız timokinon uygulamasının antiinflamatuar etkileri olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak timokinon, IL-2 ve IL-4 arasındaki korelasyonun iyi bir şekilde açıklanabilmesi için moleküler düzeyde daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

**Açıklama:** Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.VET.1901.18.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

1. Paarakh PM. *Nigella sativa* Linn. A comprehensive review. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2010; 1(4): 409-429.
2. Mills S, Bone K. *Principles and practice of phytotherapy. Modern herbal medicine.* Churchill Livingstone; 2000.
3. Koshak AE, Yousif NM, Fiebich BL, Koshak EA, Heinrich M. Comparative immunomodulatory activity of *Nigella sativa* L. preparations on proinflammatory mediators: A focus on asthma. *Frontiers in Pharmacology* 2018;9:1075.
4. Hadi S, Mirmiran P, Daryabeygikhotbehsara R, Hadi V. Effect of *Nigella sativa* oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress among people with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Progress in Nutrition* 2018;20(1)127-133.
5. Shaterzadeh-Yazdi H, Noorbakhsh M-F, Hayati F, Samarghandian S, Farkhondeh T. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of thymoquinone. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2018;18(1):52-60.
6. Alkhattabi NA, Hussein SA, Tarbiah NI, Alzahri RY, Khalifa R. Thymoquinone Effect on Monocyte-Derived Macrophages, Cell-Surface Molecule Expression, and Phagocytosis. *Nutrients* 2022;14(24):5240.
7. Akrom A, Darmawan E, Maulida N, Syuhada S. Antioxidants and immunomodulatory effect of black cum-in seed oil in at-risk metabolic syndrome. *Bali Medical Journal* 2021;10(3):1042-1047.
8. Randhawa MA, Alghamdi MS. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed)-a review. *The American Journal of Chinese Medicine* 2011;39(06):1075-1091.
9. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999;19(5):757-762.
10. Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, et al. Thymoquinone protects against myocardial ischemic injury by mitigating oxidative stress and inflammation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015;2015.
11. Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi* 2018;7(2):118-135.
12. Koshak A, Koshak E, Heinrich M. Medicinal benefits of *Nigella sativa* in bronchial asthma: A literature review. *The Saudi Pharmaceutical Journal* 2017;25(8):1130-1136.
13. Mohammed SS, Naim MM, Mahmoud SH. Possible protective effect of *nigella sativa* oil against piroxicam-induced gastric mucosal damage in adult male albino rats (Light and Scanning Electron Microscopic Study). *Egyptian Journal of Histology* 2010;33(1):127-139.
14. Kanaç S, Keskin E, Uluşık D. Effects of thymoquinone on some cytokine levels in cerulein-induced acute pancreatitis. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques* 2022;7(2):194-201.
15. Crossmon G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *The Anatomical Record* 1937;69(1):33-38.
16. True L. *Principles of Immunohistochemistry.* In: True L, ed. *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology.* New York: Gower Medical Publishing; 1990:16-22.
17. Hartavi B. Atipik asinar hücre odaklı sıçan pankreasında timokinonun histolojik etkileri, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2019
18. Cobourne-Duval MK, Taka E, Mendonca P, Soliman KF. Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NFκB pathway signaling targets in LPS/IFNγ-activated BV-2 microglia cells. *The Journal of Neuroimmunology* 2018;320:87-97.
19. Günel C, Demirci B, Meteöglü İ, Yılmaz M, Ömürlü İK, Kocatürk T. The anti-inflammatory effects of thymoquinone in a rat model of allergic rhinitis. *The Turkish*

Journal of Ear Nose and Throat 2017;27(5):226-232.

20. Keyhanmanesh R, Boskabady MH, Khamneh S, Doo-star Y. Effect of thymoquinone on the lung pathology and cytokine levels of ovalbumin-sensitized guinea pigs. *Pharmacological Reports* 2010;62(5):910-916.
21. Olivianto E, Endharti AT, Kusuma HC, Santoso S, Handono K. Effect of Thymoquinone on Th1 and Th2 Balance in Rats Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 2021;9(A):688-692.