

## RESEARCH ARTICLE

### Timokuinonun sığır periferal kan monükleer hücre proliferasyonuna etkisi

Uçkun Sait Uçan<sup>1\*</sup>, Zafer Sayın<sup>1</sup>, Aslı Sakmanoğlu<sup>1</sup>, Ali Uslu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, 42250, Konya, Türkiye.

Geliş:24.04.2017, Kabul: 07.07.2017

\*usucan@selcuk.edu.tr

### Effect of thymoquinone on proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells

Eurasian J Vet Sci, 2018, 34, 1, 1-6  
DOI:10.15312/EurasianJVetSci.2018.172

#### Öz

**Amaç:** Timokuinon (Tq), *Nigella sativa*'nın en önemli bileşeni olup memelilerin çeşitli hücreleri üzerinde olumlu biyolojik etkilere sahiptir. Bu çalışmada, sığırların periferal kan dolaşımı mononükleer hücreleri üzerine Tq'nin *in vitro* şartlarda etkisi araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** Farklı Tq yoğunluklarının sığır periferal kan dolaşımı mononükleer hücrelerinin yaşamına ve proliferasyonuna etkileri hücre kültürü (BrdU) ve ELISA metotları ile ve iki mitojenin (Concanavalin A; Con A ve Pokeweed Mitogen; PWM) varlığında ve yokluğunda araştırıldı. Bununla birlikte fenil boronik asit (FBA)'in muhtemel etkisi benzer şekilde ölçüldü.

**Bulgular:** Tq, sığır kan dolaşımında bulunan mononükleer hücreler, kültür sıvısına 50 µg/mL miktarında eklendiğinde blastojenik etki gösterdi. 5 günlük 10<sup>7</sup>/mL yoğunluğunda hücre bulunan kültürlerde 50 µg/mL Tq, 0.485±0.06 düzeyinde blastojenik cevaba sebep oldu (P<0,01). Con A ve PWM için mitojenik cevaplar ise sırası ile 0,399±0,084 ve 0,397±0,049 olarak belirlendi. Tq'nun her iki mitojen (Con A veya PWM) ile kombinasyonu blastojenik yanıtta artışa yol açmadı. Ancak, Tq'nun immün hücreler üzerindeki bu mitojenik etkisinin mekanizması aydınlatılmaya muhtaçtır. FBA de, kültüre 2.5 µg/mL son konsantrasyonunda eklendiğinde anlamlı miktarda (0,425±0,058) mitojenik etki gösterdi (P<0,01).

**Öneri:** Tq'nun, gelecekte adjuvan bileşimine girebilecek aday bir madde olduğu fikrimizi, ayrıca doğrudan ve *in vivo* olarak immün uyarıcı olarak da kullanılabilmesi hipotezimizi desteklemektedir. Diğer taraftan, FBA'nın da, sığırdan benzer potansiyele sahip olabileceği değerlendirilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Timokuinon, Fenil boronik asit, inek, mononükleer hücreler, proliferasyon.

#### Abstract

**Aim:** Thymoquinone (Tq) is the most important component of *Nigella sativa* and has positive biological effects on various cells of the mammals. At present study, a possible effect of Tq on the large ruminant immune system was investigated by *in vitro* assays.

**Materials and Methods:** Thus, the effects of different Tq concentrations on both survival and proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells were investigated by cell culture and ELISA methods in the presence or absence of two mitogens (Con A and PWM). In addition, phenyl boronic acid (PBA) was evaluated similarly.

**Results:** Tq showed a blastogenic effect on peripheral mononuclear cells of cows when Tq was added to culture medium at a final concentration of 50 µg/mL. Following 5 days of proliferation of cells with 10<sup>7</sup> cell/mL density in presence of 50 µg/mL Tq caused 0.485 ± 0.06 OD degree of blastogenesis (P <0.01). The mitogenic responses for Con A and PWM were 0,399 ± 0,084 and 0,397 ± 0,049, respectively. The combination of Tq with either of both mitogens (Con A or PWM) did not lead to a further increase in the proliferation. Mechanism of Tq's mitogenic effect on bovine immune cells is completely in dark at present. Additionally, PBA is present in cell culture medium at a final concentration of 2.5 µg/mL a significant degree of proliferation was measured (0,425±0,058) (P<0,01).

**Conclusion:** These results support our hypothesis that Tq would be a candidate for being a component of a novel adjuvant or even a promising immunostimulant for therapeutic purposes in future. Moreover, PBA is concluded as another potential compound for mitogenesis of bovine immune cells.

**Keywords:** Thymoquinone, phenyl boronic acid, cattle, mononuclear cells, proliferation.

## Giriş

Tıbbi bitkiler yüzyıllardır pek çok hastalığın tedavisinde kullanım alanı bulmuş, günümüz modern tıbbında bazı ilaçlara ham madde kaynağı olan ve giderek daha fazla ilgi çeken, tıbbi ve tarımsal ürünlerdir. Bu bitkiler içerisinde Ranunculaceae familyasından *Nigella sativa* (*N.sativa*) özellikle dikkat çekmektedir. Bu bitkinin temel bileşenleri; timokuinon (%30 - 48), p-cimen (%7 - 15), karvarol (%6 - 12), 4-terpinol (%2 - 7), t-anetetol (%1 - 4) ve seskuiterpen longifolen (%1 - 8)'dir (Burits ve Bucar 2000). Bitkinin en önemli bileşeni timokuinon (Tq)'nun, özellikle fare ve insanlarda yapılan çalışmalar sonucunda; bu türlerde antibakteriyel, antifungal, antischistosomiasis, antioksidan, antidiyabetik, antikanser, antiyangısal (antienflamatuvar), analjezik, immünomodülatör, gastro-protektif, nefroprotektif ve diğer etkileri olmak üzere pek çok olumlu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ahmad ve ark 2013). *N.sativa*'nın immünomodülatör etkilerine yönelik çalışmalarda; farelerde splenositlerin doza bağlı olarak proliferasyon yeteneğinde artış gösterilmiştir. Bu çalışmada *N.sativa* özütünün dalaktan izole edilen lenfoid hücrelerin sitokin sentezini Th2 yönünde artırdığı, buna karşın IL-6 ve TNF- $\alpha$  sentezini ise baskıladığı bildirilmiştir. Üstelik söz konusu özütün NK hücreler üzerinde uyarıcı etkisi tespit edilmiştir (Majdalawieh ve ark 2010; Ahmad ve ark 2013). Tq'nun, antijen spesifik CD8+ lenfositler üzerindeki etkisi, IFN- $\gamma$  sentezini uyularak gerçekleşir. Araştırmacılar bu etki sayesinde T lenfositlerin *in vitro* aktivitesinin artırılmasında yararlı olabileceğini ve adoptif bağışıklık ve kanser tedavisinde umut verdiğini bildirmişlerdir (Salem ve ark 2011). Diğer taraftan Long evans ratlarda yapılan bir çalışmada spesifik antijene (Tifo aşısı) karşı gelişen sıvısal immün cevapta *N.sativa* yağı ile muamelenin antikör üretiminde 2 kat düşüşe sebep olduğu ancak splenosit ve nötrofil sayılarında artışa yol açtığı bildirilmiştir (Torres ve ark 2010).

Etkilenen hücre tipine göre, sitotoksik ya da anti-sitotoksik etkileri üzerinde yapılan çalışmalar daha ziyade kanser hücreleri üzerinde ve kanser hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalardır. Bu çalışmalarda *N.sativa*'nın bütününe ya da bazı bileşenlerinin çeşitli kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili olduğu (Swamy ve Tan 2000), hücrel aktivasyonu ve tümöre özel antikörlerin üretimini artırdığı ayrıca, *N.sativa* özütünün sağlıklı hücreler için sitotoksik etkili olmadığı, aksine hücre canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğuna ilişkin bulgular da bildirilmiştir (Medenica ve ark 1993). Aynı araştırmacılar *N.sativa* tohum özütünün immün sistem ile ilgili hücrelerin sayılarında artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Üstelik *N.sativa* protein ekstraktlarının allojenik lenfositler ile veya herhangi bir stimülatör bulunmayan kültürde insan lenfositlerinden interlökin-3'ün üretimini artırdığı görülmektedir. *N. sativa* proteinlerinin interlökin-1b'yi artırdığının bildirilmesi ile söz konusu ekstraktın ve dolayısı ile etken madde Tq'nun makrofajlar üzerinde de etkisinin olabileceği fikri doğmuştur (Haq ve ark 1995, Haq ve ark 1999). Türkiye'de insanda yapılan bir çalışmada, 4 hafta süre ile 30mg/kg dozda oral yol ile verilen *N.sativa*'nın T lenfo-

sit alt grupları ve toplam lökosit sayısı üzerindeki etkileri araştırılmış ve CD3+ lenfositler ve toplam lökosit değerlerinde önemli artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Kaya ve ark 2003).

Bu çalışmada sığır kan lenfosit kültürü sıvısına çeşitli yoğunluklarda eklenen Tq'nun mitojenik potansiyelinin ölçülmesi amaçlandı. Ayrıca, Tq bilinen mitojenler (Con A ve PWM) ile kombine edildiğinde mitojenlerin blastojenik potansiyeli üzerine etkileri incelendi.

## Gereç ve Yöntem

Altı adet en az 1.gebeliğini tamamlamış Holstein ırkı inek kullanıldı. Tq'nun periferik kan hücrelerinin canlılığına etkisinin belirlenmesi ve daha sonra proliferasyon için olmak üzere her bir inekten 2 kez ve her birinde 30'ar mL kan örneği alındı. Örneklemeye, Vena jugularis'ten asepsi ve antiseptiye uyularak, Fakülte Çiftliğindeki hayvanlardan yapıldı.

Timokuinon (Santa Cruz Biotechnology, sc-215986) 100 mg/mL yoğunluğunda Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMSO; Sigma-Aldrich, D8418)'da sulandırıldı ve stok solüsyon olarak +4°C de, falcon tüplerinde, alüminyum folyo içerisinde sarılaşarak muhafaza edildi. Kullanma solüsyonları (0.04  $\mu$ g/mL, 0.2  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL 25  $\mu$ g/mL, 150  $\mu$ g/mL ve 2175  $\mu$ g/mL) olacak şekilde, modifiye RPMI 1640 kullanılarak hazırlandı. FBA, 0.01 mg/mL stok solüsyon olarak ve distile suda çözdürülerek hazırlandı.

### Modifiye RPMI 1640 (MKV) besi yeri

100 mL modifiye RPMI 1640 için; 87,5 mL RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R8758), 10 mL Fötal Buzağı Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F9665), 2,5 mL 1M'lık HEPES (Sigma-Aldrich, H0887), 100'er  $\mu$ L Penisilin (Sigma-Aldrich, P3032) (100.000 IU/mL) ve Streptomisin (Sigma-Aldrich, S9137) (100.000  $\mu$ g/mL) karıştırılarak hazırlandı.

### Proliferasyon testleri

Lacetera ve ark (2005)'in bildirdiği me-toda göre yapıldı; Density gradient santrifüj tekniği ile periferik dolaşım mononükleer hücreleri (PDMH) izole edildi; Öncelikle heparinli kan örneğinden 4 ml alındı ve 6 ml Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare, 17-1440-02) ile tabakalandırma yapılarak karıştırıldı. Daha sonra 700 g'de 30 dk, 20°C'da santrifüj edildi. Mononükleer hücre bandı pipet yardımıyla toplandı ve 1x Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich H4641) ile 400  $\times$  g'de, 10 dk, 4°C'de 2 kez yıkandı. RPMI-1640 (25 mM HEPES'li) vasatında sulandırıldı Hücre sayısı ve canlılık oranları, tripan mavisi, (Sigma-Aldrich, T6146) boyaması kullanılarak hemositometri ile belirlendi. Ardından MKV (25 mM HEPES, %10 ısı-inaktive fötal bovine serum, 2mM L-glutamin, 100U penisilin, 100  $\mu$ g streptomisin ve 0,25  $\mu$ g amfoterisin-B/mL) ile 1x10<sup>7</sup> hücre/mL yoğunluğunda sulandırıldı. Çukurlara 100  $\mu$ g/mL oranında Tq içeren stok solüsyondan, son konsantrasyonları 0,02  $\mu$ g/mL, 0,1  $\mu$ g/mL, 2,5  $\mu$ g/mL, 12,5  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 72,5  $\mu$ g/mL ve 1087,5  $\mu$ g/mL olacak şekilde dağıtıldı. Her bir sulandırma mikrop-lağın üç çukurunda paralel olarak yapıldı. Mikrop-

laklar, 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Bu çukurlardan 24. ve 48. saatlerde canlılık ölçümleri hemositometrik olarak ve tripan mavisi boyaması kullanılarak belirlendi. Bu aşama toplam 6 hayvandan alınacak kan örneklerinde yapıldı. Canlılığın en yüksek olduğu Tq sulandırması ve inkübasyon süresi temel alınarak aynı hayvanlardan alınacak kan örneklerinde bu kez 2 farklı mitojenin belirli yoğunluklarındaki mitojenik aktiviteleri üzerine Tq'nun etkisi belirlendi. Bu amaçla; proliferasyon deneyleri 2 farklı hücre sayısı ve farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi. (10<sup>7</sup> veya 10<sup>6</sup> hücre/mL; 2 veya 4 gün inkübasyon). 96 çukurlu plaklarda ve her bir çukur 100 µL MKV içerisinde 1x10<sup>6</sup> mononükleer hücre içerecek şekilde yapıldı. Kontrol çukurları mitojen, Tq ve BrdU için düzenlendi. Kullanılacak mitojenler ve son konsantrasyonları; pokeweed mitojen (PWM) için, 1 µg/mL ve concanavalin A (Con A) için 2.5 µg/mL olarak ayarlandı. Ayrıca 3 çukurda Fenil Boronik Asit (FBA) de son konsantrasyonu 2.5 µg/mL olacak şekilde ilgili kültür ortamlarına eklendi. Mikroplaklar, 2 saat BrdU inkübasyonu, 10<sup>6</sup> hücre/mL hücre yoğunluğu ve 4 gün son inkübasyon veya 16 saat BrdU inkübasyonu, 10<sup>7</sup> hücre/mL hücre yoğunluğu ve 5 gün kültür inkübasyon olmak üzere farklı şartlarda proliferasyona tabii tutuldu. Her durumda ortamın CO<sub>2</sub> yoğunluğu, %5 idi. Proliferasyon, Lacetera ve ark (2002)'nin bildirdiği şekilde ELISA ile ölçüldü. ELISA (Roche, 11647221001) ticari firmanın önerilerine uygun olarak yapıldı.

#### Etik kurul onayı

Bu araştırma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (SÜVDAMEK)'nin 29.03.2016 tarih ve 2016/31 sayılı kararı ile araştırma etiği yönünden uygun bulunmuştur.

#### Bulgular

Çalışmada 0,02 µg/mL, 0,1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 12,5 µg/mL, 50 µg/mL, 72,5 µg/mL ve 1087,5 µg/mL son konsantrasyonlarında kullanılan Tq yoğunluklarının hiç biri 24 veya 38 saatlik PKMH kültürlerinde sitotoksik bulunmadı (Tablo 1). Tq'nun 50 µg/mL son konsantrasyonda kullanıldığı ve çeşitli şartlarda blastojenik etkisinin ölçüldüğü proliferasyon sonuçları ise Tablo 2 ve 3'de sunuldu. Tq yalnız (50 µg/mL) veya mitojen ile beraber bulunduğu tüm kültürlerde kontrole göre anlamlı ölçüde fazla mitojenik etkiye sahip idi (P<0.01). FBA, 5 günlük inkübasyon sonrasında kontrole (0,299±0,02) göre önemli miktarda daha fazla proliferasyona (0,425±0,058) sebep oldu (P<0.01) (Tablo 3).

#### Tartışma

*N.sativa* özütünün, kanser hücrelerinin aksine sağlıklı hücreler için sitotoksik etkili olmadığı, aksine hücre canlılığı üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Medenica ve ark 1993). Araştırmacılar, bu etkilerin temel olarak, *N.sativa* tohum özütü-

Tablo 1 Timokuinonun farklı son yoğunluklarının 2 farklı süreli inkübasyon sonrasında PKMH canlılık oranlarına etkisi

İnkübasyon Süresi (saat)	K	FBA (µg/mL)							
		2.5	0.02	0.1	2.5	12.5	50	72.5	1087.5
24.saate canlılık (%)	92	91	90	92	90	92	93	90	90
48.saate canlılık (%)	87	90	91	92	90	93	91	91	89

K: Kontrol, Modifiye RPMI 1640+hücre.

Tablo 2 PKMH proliferasyonu (4 gün ve 2 saat BrdU inkübasyonu, 10<sup>6</sup> hücre/mL)

Hayvan No*	Kontrol**	FBA	PM	ConA	TQ	TQ+FBA	TQ+PM	TQ+ConA
1	0,339±0,016	0,31±0,01	0,387±0,047	0,499±0,142	0,384±0,07	0,422±0,071	0,373±0,061	0,433±0,078
2	0,354±0,03	0,282±0,05	0,26±0,05	0,29±0,05	0,264±0,05	0,417±0,09	0,253±0,06	0,358±0,01
3	0,264±0,017	0,723±0,231	0,524±0,06	0,386±0,018	0,324±0,07	0,38±0,052	0,301± 0,039	0,443±0,221
4	0,276±0,043	0,572±0,189	0,45±0,033	0,401±0,038	0,34±0,08	0,413±0,119	0,443±0,235	0,348±0,034
5	0,277±0,022	0,651±0,322	0,435±0,069	0,399±0,099	0,263±0,147	0,351±0,062	0,273±0,078	0,433±0,226
6	0,27±0,081	0,507±0,395	0,328±0,033	0,423±0,157	0,478±0,044	0,335±0,155	0,283±0,128	0,37±0,094
Ort±ss	0,297±0,035a	0,508±0,197	0,397±0,049	0,399±0,084	0,342±0,077	0,386±0,092	0,321±0,100	0,398±0,111b

\*Her bir hayvandan alınan kanların 3'er kez kültürünün ortalamalarıdır. \*\* Hücre + vasat. P<0,01. Tq: 50 µg/mL. PWM, 1 µg/mL. ConA 2.5 µg/mL son yoğunlukta kullanıldı.

Tablo 3 PKMH proliferasyonu (5 gün ve 16 saat BrdU inkübasyonu, 10<sup>7</sup> hücre/mL)

Hayvan No*	Kontrol**	FBA	PM	ConA	TQ	TQ+FBA	TQ+PM	TQ+ConA
1	0,295±0,03	0,402 ±0,103	0,436±0,126	0,612±0,086	0,433±0,12	0,686±0,08	0,608±0,05	0,627±0,09
2	0,303±0,01	0,593±0,09	0,525±0,06	0,558±0,215	0,592±0,06	0,692±0,08	0,674±0,07	0,647±0,04
3	0,29±0,03	0,409±0,06	0,63±0,04	0,557±0,115	0,457±0,09	0,654±0,1	0,518±0,09	0,617±0,08
4	0,312±0,03	0,354±0,041	0,473±0,12	0,41±0,05	0,427±0,07	0,469±0,03	0,431±0,01	0,441±0,06
5	0,307±0,02	0,379±0,02	0,448±0,06	0,448±0,06	0,511±0,01	0,506±0,08	0,512±0,08	0,352±0,03
6	0,29±0,01	0,414±0,031	0,367±0,025	0,411±0,01	0,491±0,01	0,437±0,02	0,458±0,02	0,409±0,01
Ort±ss	0,299±0,02 <sup>a</sup>	0,425±0,058 <sup>b</sup>	0,479±0,072 <sup>b</sup>	0,499±0,11 <sup>b</sup>	0,485±0,06 <sup>b</sup>	0,574±0,06 <sup>b</sup>	0,534±0,05 <sup>b</sup>	0,516±0,05 <sup>b</sup>

\*Her bir hayvandan alınan kanların 3'er kez kültürünün ortalamalarıdır. \*\*Hücre + vasat. P<0,01. Tq: 50 µg/mL. PWM, 1 µg/mL. ConA 2.5 µg/mL son yoğunlukta

nün immün sistem ile ilgili hücrelerin sayılarında artışa yol açması sonucu olduğunu bildirmişlerdir. Bu seçicilik *N.sativa*'nın bileşenlerinin araştırılarak mevcut etkinin daha detaylandırılmasını teşvik etmektedir.

Hüresel immüitenin spesifik olmayan ölçümünde, perifer kan dolaşımında bulunan mononükleer hücrelerin mitojen kökenli blastojenik cevabının tespiti geniş kullanım alanı bulmuştur. Lenfosit blastogenezinde, 3H-Timidinin kullanıldığı metot radyoaktiftir ve pahalı ekipmana ihtiyaç duyar (Ucan 1997).

Bu sebeple daha ekonomik ve radyoaktivite yönünden tehlikesi olmayan metotlar kullanıma girmeye başlamıştır. Bunlar arasında BrdU işaretlemenin kullanıldığı metot hızlı ve pratik olup, gerçekleşen blastogenez ELISA okuyucusu ile ölçülebilmektedir (Chiderstone ve ark 1999). Bu çalışmada da non-radyoaktif metot kullanılmış ve sonuçlar OD değeri olarak sunulmuştur.

Lenfositlerin poliklonal aktivatörleri olarak da bilinen mitojenlerden Con A ve PWM, lektin temelli özütlerdir (Wimer 1996, Ucan 1997). Lektinler, hücrelerin membran glükoproteinlerinde bulunan karbonhidratlara bağlanarak, hücrede adenilat siklazın aktivasyonuna ve ardından nükleusa ilgili sinyalin iletimine ve mitozu sebep olurlar. Böylece lenfositlerin poliklonal artışı sağlanır (Ucan 1997, Uchimura 2001). Çalışmamızda bu amaçla adı geçen iki mitojen kullanıldı.

Tq, *N.sativa*'nın esansiyel yağlarının % 30-48'ini oluşturan en temel bileşendir (Buritz ve Bucar 2000). *N.sativa*'nın bu ekstraktlarının, çeşitli türlerde immün hücreleri aktive ettiği bilinmektedir. Ancak farklı coğrafik bölge veya hasattan elde edilen *N.sativa* içeriğinin değişkenlik göstermesi bu değerli bitki özütünün Tıpta geniş ve ticarileşmiş kullanımını engellemektedir.

Dolayısıyla *N.sativa* esansiyel yağlarının bileşimindeki maddelerin bu yönden incelenmesi ve bu etki mekanizmasının aydınlatılması ile söz konusu etken maddelerin hekimliğin hizmetine etkin sunulması mümkün olacaktır. Bu çalışmada temel bileşen Tq'nun olası immün hücre poliklonal aktivatörü potansiyelinin sığır lenfositleri ile proliferasyon testi kullanılarak belirlenmesi amaçlandı.

Sığırdaki MTT assay ile PKMH'lerin mitojenik cevabının ölçüldüğü bir çalışmada (Norian ve ark 2015) Con A, PHA ve PM için tespit edilen optimal konsantrasyonlar sırasıyla 5, 2.5 ve 2.5 µg/mL olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada da Con A ve PWM mitojenler aynı son konsantrasyon oranlarında kullanıldı. Çalışmamızda ölçülen hücre proliferasyonu düzeylerinin genel olarak Norian ve ark (2015) bildirdiklerinden daha düşük olması, kullanılan ölçüm metotlarının farklılığından kaynaklanabilir. Ayrıca her iki çalışmada kültüre edilen hücre (mikroplağın çukurlarında) sayısının farklı olmasının benzer sonuca yol açabileceği düşünülmektedir.

Tripan mavisi testi, izole edilen PKMH için sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Ilavarasi ve ark 2011). Çalışmamızda 24 ve 48 saat süreler ile kültüre ilave edilen Tq'nun çeşitli ve FBA'in denenen yoğunluklarının hiç birinde sitotoksik etki göstermediği belirlendi (Tablo 1).

Salem ve ark (2011) hücre kültürüne ekledikleri Tq'nun antijen spesifik CD8+ T lenfositlerinin canlılık oranlarını ve aktivitelelerini (*in vitro* koşullarda) artırdığını bildirmişlerdir. Böylece hem enfeksiyonların hem de kanserin tedavisinde adoptif T lenfositlerin modülasyonu için yardımcı bir madde olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada sığırlarda *in vitro* şartlarda Tq ile zenginleştirilen hücre kültüründe lenfosit sayısında anlamlı artış tespit edilmiş (Tablo 3) ancak hangi hücre popülasyonunun ya da alt tiplerinin ne derecede proliferasyon olduğu belirlenmemiştir. Yüzey antijen yoğunluklarının ölçümü ile etkilenen hücre tipi ve dönemi belirlenebilecektir. Öte yandan NK aktivitesi üzerine olumlu etkinin belirlendiği bir çalışmada makrofajlar ve dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunan hücreler üzerine de etkinin araştırılması gerektiği işaret edilmiştir (Salem 2005). Sığırdaki da solid dokularda bulunan bu immün hücreler üzerine Tq'nun etkilerinin araştırılması ile Tq'nun etkilediği hücre tipleri daha detaylı belirlenebilecektir.

Diğer taraftan, Tq'nun hücreler üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar büyük çoğunlukla kanser araştırmaları ile sınırlıdır. Örneğin son zamanlarda yapılan ve MCF-7 hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada Tq'nun p53 genini aktive ederek apoptozisi uyardığı ve böylece kanser hücresinin ölümünü sağladığı tespit

edilmiştir (Dastjerdi ve ark 2016). Tq'nun immün hücreler üzerine etkisinin mekanizması hakkında yapılan bir çalışmada (Waters ve ark 2002), aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilen Nitrik Oksit (NO)'in dokudaki Mycobacterilerin öldürülmesinde potansiyel rolü olduğu ve memelilerde, türden türe değişmekle beraber, makrofajların ürettiği NO'in antijen spesifik cevabın oluşturulmasında önemli bir mekanizma sunduğu bildirilmiştir. Henüz yayınlanan bir çalışmada (Hossen ve ark 2017) ise, Tq'nun antiyangısal etkisi araştırılmış ve bu etken maddenin, lipopolisakkaritle uyarılmış fare makrofaj like RAW264.7 hücrelerinde NO üretimi ve N sentetaz enzimini baskıladığı ayrıca TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  sentezlerini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Tq'nun lenfositleri hangi mekanizma ile proliferasyona uğrattığı yeni araştırmaların konusudur. Ancak, Tq'nun bu çalışma ile tespit edilen aktivatör etkisinin sığırdaki *in vivo* olarak ölçülmesi gerekmektedir. *In vitro* etkiye benzer etkinin *in vivo* denemelerden alınması, etkilenen hücre tip ve düzeylerinin belirlenmesi ve Tq'nun toksik olmayan dozlarının *in vivo* olarak da teyit edilmesi durumunda Veteriner Hekimlik için non spesifik (poliklonal) bir immün stimulan madde adayı olacaktır.

Ayrıca, gelecekte Tq'nun doğrudan tedavide kullanımı da değerlendirilmesi gereken bir diğer seçenektir; Romatoid artritide, sinovyal fibroblastların TNF- $\alpha$  ile aktivasyonu ile eklem dokusunda hasar oluşmaktadır. Sinovyal fibroblast kültürüne 1-5  $\mu$ M miktarlarında eklenen Tq'nun TNF- $\alpha$  sinyal iletimini bozduğu ve sonuçta IL-6 ve IL-8 üretiminin arttığı ve böylece Tq'nun tedavi potansiyeli ortaya konmuştur (Umar ve ark 2015). Veteriner Hekimlikte de bu etken maddenin immün hücre uyarıcı etkisinin yanı sıra sinovyal veya diğer dokularda benzer etkilerinin belirlenmesi ile yeni tedavi seçenekleri için farklı kullanım alanları doğabilecektir.

FBA'nın ise, kontrol kültürüne göre anlamlı ölçüde blastogeneze yol açması bu çalışmanın bir diğer dikkat çeken bulgusudur. Fare kan hücreleri üzerinde FBA'nın mitojenik etkisi uzun süre önce ileri sürülmüştü (Uchimura ve ark 2001). Grubumuzun, köpek kan hücreleri ile yaptığı çalışmalarda her ne kadar faredekine benzer sonuçlar alınmamış ise de bu çalışma FBA'nın sığır periferik kan hücreleri üzerinde mitojenik etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu etkinin farklı FBA yoğunluklarında da belirlenmesi ve *in vivo* etkileşiminin tespit edilmesi ile mekanizmanın aydınlanması gerekmektedir.

### Öneriler

- Tq ve FBA sığır immün hücreleri üzerinde *in vitro* şartlarda sitotoksik değildir.
- İnek kan lenfosit kültüründe 50  $\mu$ g/mL yoğunluğunda bulunan Tq'nun mitojenik etkisi, nonspesifik poliklonal blastojenik etki şeklinde olmalıdır.
- Bu Tq blastojenik etkisi, Con A ve PWM mevcudiyetinde artış göstermediği için bunlar arasında sinerjistik veya additif mitojeniden bahsedilemez.

- Tq'nun immün hücreler üzerindeki mitojenik etkisinin mekanizması aydınlatılmaya muhtaç olmakla birlikte; fare kan dolaşımını mononükleer hücrelerinin boronik asit ile uyarımına benzer bir uyarıma sebep olabileceği olasıdır.
- FBA, kültüre 2.5  $\mu$ g/mL son konsantrasyonunda eklendiğinde anlamlı miktarda (0,425 $\pm$ 0,058) mitojenik etki göstermesi (P<0,01), bu bileşiğin ruminantlarda ilk kez tespit edilen immün potansiyel yönünü ortaya koymaktadır.
- Bu sonuçlar, Tq'nun ve FBA'nın, gelecekte yeni bir adjuvanın geliştirilmesinde adjuvan bileşimine girebilecek bir aday madde olabileceği fikrimizi, ayrıca doğrudan ve *in vivo* olarak immün uyarıcı amaçlı kullanılabileceği hipotezimizi desteklemektedir.

### Teşekkür

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi tarafından desteklenmiştir (BAP No: 16401107).

### Kaynaklar

- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi Ak, Siddique NA, Damanhour ZA, Anwar F, 2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3, 337-352.
- Burits M, Bucar F, 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res*, 14, 323-328.
- Childerstone AJ, Cedillo-Baron L, Foster-Cuevas M, Parkhouse RM, 1999. Demonstration of bovine CD8+ T cell responses to foot-and mouth disease virus. *J Gen Virol*, 80, 663-669.
- Dastjerdi MN, Mehdiabady EM, Iranpur FG, Bahramian H, 2016. Effect of thymoquinone on P53 gene expression and consequence apoptosis in breast cancer cell line. *Int J Prev Med*, 7, 66.
- Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KSA, Sheth KV, Al-Sedairy ST, 1995. *Nigella sativa*: Effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*, 30, 147-55.
- Haq A, Lobo PI, Al-tufail M, Rama NR, Al-sedairy ST, 1999. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Int J Immunopharmacol*, 21, 283-95.
- Hossen MJ, Yang WS, Kim D, Aravinthan A, Kim J-H, Cho JY, 2017. Thymoquinone: An IRAK1 inhibitor with *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activities. *Sci Rep*, 7, 42995. DOI: 10.1038/srep42995
- Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP, 2011. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*, 84, 888-893.
- Kaya MS, Kara M, Özbek H, 2003. Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumunun insan hücresel bağışıklık sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ hücreleri ve toplam lökosit sayısı üzerine etkileri. *Genel Tıp Derg*, 13, 109-112.
- Lacetera N, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Pirazzi D, Nar-

- done A, 2005. Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition. *J Dairy Sci*, 88, 2010-2016.
- Majdalawieh AF, Hmaidan R, Carr RI, 2010. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. *J Ethnopharmacol*, 131, 268-275.
- Medenica R, Mukerjee S, Huschart T, Koffskey J, Corbit W, 1993. *Nigella sativa* plant extract increases number and activity of immune component cell in humans. *Exper Hematol*, 21, 1186.
- Norian R, Delirezh N, Azadmehr A, 2015. Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Res Forum*, 6, 265-271.
- Salem ML, 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol*, 5, 1749-70.
- Salem ML, Alenzi FQ, Attia WY, 2011. Thymoquinone, the active ingredient of *Nigella sativa* seeds, enhances survival and activity of antigen-specific CD8-positive T cells in vitro. *Br J Biomed Sci*, 68, 131-7.
- Swamy SM, Tan BK, 2000. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* seeds. *J Ethnopharmacol*, 2000, 70, 7-8.
- Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, Batra SK, 2010. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Mol Cancer Ther*, 9, 1419-1431.
- Ucan US, 1997. T cells and cytokines in the lamina propria of the pig. PhD Thesis, Bristol University, UK.
- Uchimura E, Otsuka H, Okano H, Sakurai Y, Kataoka K, 2001. Totally Synthetic Polymer with Lectin-Like Function: Induction of Killer Cells by the Copolymer of 3-Acrylamidophenylboronic Acid with N,N -Dimethylacrylamide. *Biootechnol Bioeng*, 72, 307-314.
- Umar S, Hedaya O, Agere S, Ahmet S, 2015. Thymoquinone inhibits TNF- $\alpha$  induced pro-inflammatory mediators in Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts in vitro. *FASEB J*, 29, 393-398.
- Waters WR, Palmer MV, Sacco RE, Whipple DL, 2002. Nitric Oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildlife Dis*, 38, 338-3.
- Wimer BM, 1996. Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by allo-activation data. *Cancer Biother Radiopharm*, 11, 57-7.