



## TİMOKİNONUN RAT KARACİĞERİNDE Ki-67 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

### THE EFFECT OF THYMOQUINONE ON Ki-67 EXPRESSION IN RAT LIVER

Arif AKTURK <sup>1</sup> Serife TUTUNCU <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Turkey

#### ÖZET

Bu çalışmada, ağız (gavaj) yoluyla uygulanan timokinonun rat karaciğerlerindeki, hepatosit proliferasyonu üzerine olası etkilerinin in vivo olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücresel proliferasyonla ilişkili bir nükleer protein olan Ki67'nin immunohistokimyasal lokalizasyonu gösterilmiştir. Çalışmada 14 adet erişkin Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar kontrol ve deney (10 mg/kg timokinon gavaj) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Timokinon uygulaması 42 gün boyunca düzenli olarak yapıldı. Belirtilen süreler sonunda ratlara servikal dislokasyon uygulandı ve karaciğerleri alınarak %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Histolojik doku takibi prosedürleri uygulanarak dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µ'luk kesitler alındıktan sonra Crossmon'ın üçlü boyaması ile karaciğerin histolojik yapısı incelendi. İmmunohistokimyasal yöntemlerden Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulanarak, Ki67'nin immonuhistokimyasal lokalizasyonu gösterildi. Kontrol ve timokinon uygulama gruplarına ait karaciğer preparatları ayrıntılı olarak incelendiğinde; hepatositlerin, damarların ve kanal sisteminin normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Karaciğerde normal lobul yapısı gözlenirken, kontrol ve timokinon uygulama grupları arasında herhangi bir farklılık tespit edilmedi. İmmunohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde, kontrol ve timokinon uygulama gruplarının hepatositlerinde ve damar duvarlarında farklı yoğunlukta immün pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Kontrol grubunda vena sentralise yakın bölgelerdeki hepatositlerin sitoplazmasında yoğun olarak gözlenirken periferde doğru reaksiyonların azaldığı gözlemlendi. Timokinon uygulama grubunda ise immün reaksiyon şiddetinin belirgin derecede azalmış olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, bu çalışma, karaciğer dokularında Ki67'nin lokalizasyonunu ve ekspresyonunu in vivo olarak göstermekte ve timokinon-Ki67 etkileşimini analiz etmektedir. Kontrol ve timokinon uygulama gruplarında Ki67 ekspresyonunun gözlenmesi ancak timokinon uygulama grubunda belirgin şekilde azalması, düşük doz timokinon uygulamasının Ki67'yi inaktive etmediğini ve hücrelerde proliferasyonu durdurduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Immunohistokimya, karaciğer, Ki-67, rat, timokinon.

#### ABSTRACT

The aim of this study, was evaluation of the possible effects of orally administered thymoquinone on hepatocyte proliferation in rat livers as in vivo. For this purpose, immunohistochemical localization of Ki67 which is nuclear protein associated with cellular proliferation, has been demonstrated. In this study, 14 adult Sprague Dawley rats were used. The rats were randomly divided into two groups (n=7 each) as control and experimental (10 mg/kg thymoquinone gavage). Thymoquinone administration was done regularly during 42 days. The rats in all groups were sacrificed after stated time and their livers tissues were excised immediately. The livers fixed in %10 buffered formaldehyde solution for histological examination. Following this, they were blocked in paraffin after undergoing routine tissue tracking procedures. Paraffin sections 5µ thick were prepared and stained with Crossman's trichrome for examination of histological structure of livers. Ki67 immunoreactivity localization was determined in livers by using Streptavidin-Biotin-Peroxidase method. When the liver preparations belonging to both groups were examined in detail, it was determined that the hepatocytes, vessels and duct system had a normal histological structure. While normal lobule structure was observed in the liver, no difference was detected between the groups. When immunohistochemical staining was evaluated, different intensity of immune positive reactions were observed in hepatocytes and vessel walls in each both groups. Peripheral reactions were observed to decrease while the reaction was observed intensively in the cytoplasm of hepatocytes located around the v.centralis in control group. In our study, we were shown the localization and expression of Ki67 as in vivo in liver tissues. We were analyzed the thymoquinone-Ki67 interaction. Ki67 expression was observed in all groups, however its substantially reduce in the experimental group suggests that low-dose thymoquinone administration did not inactivate Ki67 and stopped proliferation in cells. It was found that the severity of the immune reaction was significantly reduced in the experimental group.

**Keywords:** Immunohistochemistry, liver, Ki-67, rat, thymoquinone.

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Arif AKTÜRK, Veteriner Hekim, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Turkey. **E-mail:** akturkk\_arif@hotmail.com

**Bu makaleye atıf yapmak için / Cite this article:** Akturk A, Tutuncu Ş. Timokinonun rat karaciğerinde Ki-67 ekspresyonu üzerine etkisi. *Gevher Nesibe Journal of Medical & Health Sciences*, 7(19), 29-34. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.6974051>

## GİRİŞ

Son zamanlarda sağlık açısından risk taşımayan ve aşırı yan etkisi bulunmayan, tedavi ve destek amaçlı kullanılacak, bitki kökenli besinlerin günlük olarak kullanımı artmıştır. Antik çağlardan beri çeşitli bitkiler değişik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Aynı şekilde günümüzde de bitkilerle tedavi yapılmakta ve bunlara bağlı sanayi yıldan yıla hızla büyümektedir (Paarakh 2010:409-429). Gıda takviyesi olarak kullanılan bitkilerden bir tanesi de halk arasında çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa*'dır. Ranunculacea ailesine ait *Nigella sativa*, gıda katkı maddesinin yanında baharat olarak kullanılmaktadır. Çörek otunun önemli özelliklerinden biri, bileşiminde bulunan maddelerin immunomodülatör (thymoquinone) etkisidir. (Salem 2005:1749-1750; Al-Ali ve ark. 2008:25; Kenawy ve ark. 2014:56-60). Yıllar önce, çörek otunun insanlarda immun cevabı artırabileceğine dair çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda daha kapsamlı yapılan çalışmalar ile çörek otunun tüm ekstraktlarının immunomodülatör etkisi ve protein yapısı in vitro olarak analiz edilmiştir (Guyton-Hall 2001:402-413). Çörek otu taneleri; %36-38 yağlardan, proteinlerden, alkaloidlerden, saponinden ve %0.4 -2.5 yağ asitlerinden oluşmaktadır. Yağların çoğunluğunu doymamış yağ asitleri oluşturur. Yapısında bir çok komponent içermesine rağmen ana etken madde timokinon'dur (%27.8- %57) (Hosseinzadeh-Parvardeh 2004:56-60). Çörek otunun biyolojik aktif bileşikleri arasında timokinon, timohidrokinon, ditimokinon yer almaktadır (Randhawa-Alghamdi 2011:1075 ; Ghosheh ve ark. 1999:757-758). *N.sativa* bitkisinin tohumlarından elde edilen timokinonun yararlı etkileri geçmişten bu yana merak uyandırmaktadır ve bilim dünyasını bu konuya yönlendirmektedir. Timokinonun günümüze kadar antikanserojenik (Kaseb ve ark. 2007:7782), antitümöral (Badary 1999:135-137), antibakteriyel (Halawani 2009:148) , antioksidatif (Badary ve ark. 2000:219) ,hipoglisemik (Badary ve ark. 1998:56, Badary 1999:135-137), analjezik ve antiinflamatuvar (Abdel-Fattah ve ark. 2000:89), karaciğeri koruyucu etkileri (Al-Gharably 1997, Mansour 2000:283, Alsaif 2007:1164, Nagi-Almakki 2009:1295) ve vücudun pek çok sistemine yararlı etkileri, yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda timokinon ve hücre proliferasyonu belirteçleri ile ilgili çok fazla makaleye rastlanılmamıştır.

Ki-67 nükleusta kromatin ve mitoz aşamasında kromatid yapısı ile ilintili olan bir proteindir (Sawhney-Hall 1992:162). Organizmada canlı ve proliferasyon yeteneğine sahip tüm hücrelerde bulunmaktadır. Siklus fazına göre antijen miktarı ve dağılımı değişiklik göstermekte birlikte G0 hariç hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında bulunan nükleer bir proteindir (Dağlı 2006:94). Ki-67 normal ve neoplastik dokularda hücre proliferasyonunu ölçmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Dağlı 2006:94). S fazında Ki67 antijen ekspresyonu artmaya başlamakta G2 ve M fazlarında pik yapmaktadır. G1 fazının geç dönemlerinde perinükleer yerleşime sahipken S fazında nükleoplazma içerisinde homojen olarak dağılmıştır. G2 fazında ise ince granüler tarzda dağınık şekle sahip olup perinükleer yerleşimli boyanma söz konusu olmaktadır. Mitozun profaz ve metafaz fazlarında boyanma perikromozomal olarak bulunmakta; profaz aşamasında nükleoplazmik ve metafaz aşamasında sitoplazmik boyanma izlenmektedir. Anafaz aşaması sonrasında boyanma giderek azalmaktadır (Bozlu 1998:9-11).

Bu çalışmanın amacı, ratlara düşük doz uygulanmış timokinonun, metabolik aktivitesi yüksek olan karaciğerdeki Ki-67 ekspresyonuna olası etkilerinin histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak incelenmesidir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi bünyesinde bulunan Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütüldü. On dört adet Sprague Dawley cinsi yetişkin dişi rat çalışma materyali olarak kullanıldı. Ratlar rastgele yedişerli iki gruba ayrıldı. Deneysel ve kontrol grubundaki ratlar ad libitum, pelet şeklindeki standart rat yemi ile beslenerek, içme suyunu serbest tüketerek ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık periyodunda, 21-23°C sıcaklık ve %50-60 nem içeren ortamda bakıldı. Çalışma kırk iki gün boyunca devam etti. Uygulama öncesi ratların kiloları tartılarak uygulanacak timokinon miktarı belirlendi. (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneysel Yönetim Kurulu, Deneysel Onay No: 2015/51). Deneysel grubundaki ratlara timokinon düzenli olarak her gün 10 mg/kg dozda gavaj sondu yoluyla oral olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmadı. Kırk iki gün sonunda tüm gruplardaki ratlara ketamin+ksilazin anestezi verilerek servikal dislokasyon yöntemi uygulandı. Servikal dislokasyon uygulaması sonrası karaciğerleri çıkarıldı %10 'luk formaldehit solüsyonunda

tespiti edildi. Rutin doku takibi prosedürleri uygulanarak, dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µ'luk kesitler alındıktan sonra normal histolojik yapının incelenmesi için Crossmon'ın üçlü boyama tekniği uygulandı. Ayrıca parafin bloklardan alınan 5 µ'luk doku kesitlerinde Ki67'nin varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi.

Elde edilen preparatlar Nikon E-80İ araştırma mikroskobu altında ve Nikon digital-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.

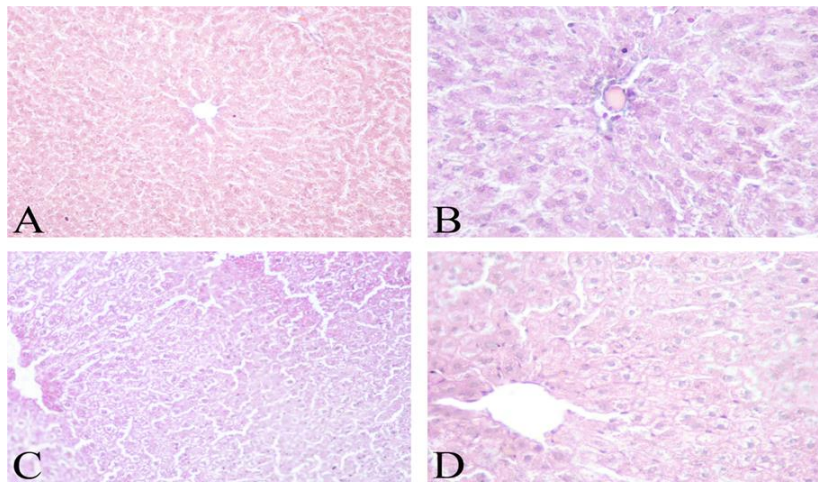
### İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Parafin bloklardan 5 µm 'lik kesitler alındı. Alınan kesitlerde Ki67'nin varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden streptavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterildi. İmmunohistokimyasal boyamada rabbit poliklonal Ki67 primer antikoru (abcam, ab16667) kullanılarak immunohistokimya tekniği ile boyandı. Sekonder antikor olarak 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 peroksidadz 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 dilüsyonunda primer antikor damlatılarak +4 °C'de 1 gece bekletildi. Bu arada negatif kontrol grubu dokuları üzerine sadece PBS solüsyonu damlatıldı. Yıkama işlemi takiben kesitlere biotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı ve yıkama işleminden sonra streptavidin-HRP komplekste inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'- diaminobenzidine (DAB) kullanıldı ve hematoksilen ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme; karaciğer dokusu epitel hücreleri, remark kordonları ve sinuzoid epitel hücrelerinin boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. değerlendirme bağımsız gözlemciler tarafından boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değer verilerek yapıldı.

## BULGULAR

### Histolojik Bulgular

Karaciğer dokusu incelendiğinde; organın dıştan fibröz bir kapsülle sarılı olduğu belirlendi. Karaciğer hepatositlerinde, damarlarında ve kanal sisteminde normal histolojik yapının varlığı belirlendi. Karaciğerde normal lobul yapısı gözlenirken, gruplar arasında herhangi bir farklılık belirlenmedi (Şekil 3).

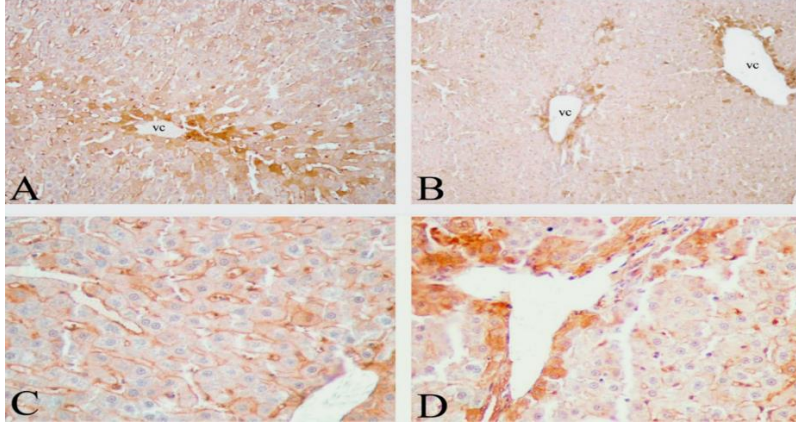


Şekil 1. Tüm Gruplara Ait Karaciğer Dokusu, Crossman trikrom boyaması

A. Kontrol grubu X20, B. Kontrol grubu X40, C. 10 mg/kg oral (timokinon) X20, D. 10 mg/kg oral (timokinon) X40

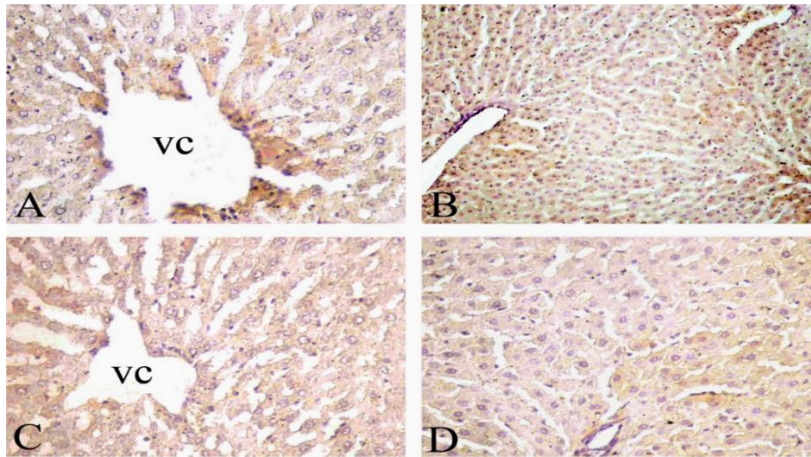
### İmmunohistokimyasal Bulgular

Yapılan değerlendirmeler sonucunda karaciğerde farklı şiddetlerde immün pozitif reaksiyonlar gözlemlendi. İmmünopozitif reaksiyonların hepatositlerde ve sinuzoidlerin çevresinde farklı şiddetlerde olduğu saptandı. Karaciğer dokusunda kontrol grubunda reaksiyon şiddetinin deney grubuna oranla daha yoğun şiddette olduğu tespit edildi. (Şekil 2,3, Tablo 1).



Şekil 2. Ki67 immunohistokimyasal ekspresyon kontrol grubu

A: Kontrol grubu x20, B: Kontrol grubu x10 Ki67/immunohistokimya, C: Kontrol grubu x40, D: Kontrol grubu x40



Şekil 3. Ki67 immunohistokimyasal ekspresyon kontrol grubu

A: Deney grubu x40, B: Deney grubu x20, C: Deney grubu x40, D: Deney grubu x40

**Tablo 1.** Ki-67'nin immunohistokimyasal reaksiyon şiddetleri kontrol ve timokinon uygulama gruplarından elde edilen dokulara ait boyanma düzeyleri\*

	Kontrol grubu (n = 7)	Deney grubu (10 mg/kg) oral timokinon (n = 7)
V.sentralis çevresindeki hepatositler	++	+
Sinuzoid epiteli	++	-

+++ : yoğun düzeyde reaksiyon , ++ : orta düzeyde reaksiyon , + : düşük düzeyde reaksiyon , - : reaksiyon yok

\*Ki-67'nin immunohistokimyasal reaksiyon şiddetleri kontrol ve timokinon uygulama gruplarından elde edilen dokulara ait boyanma düzeyleri yüzdesel olarak belirlenmiştir. Belirlenen boyanma düzeyleri ortalama + / - standart sapma olarak ifade edilmiştir.

## TARTIŞMA

*N. sativa* L. 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. Timokinonun yüksek antioksidan özelliğe sahip ana aktif fenolik bir bileşik içermesinden dolayı birçok çalışmada antienflamatuar, antimikrobiyal ve antikanserojen vb. gibi faydalı etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Timokinon yıllardır geleneksel tıpta kullanılmasının ardından günümüzde alternatif tıpta da yer almaktadır.

Fitoterapi üzerine yapılmış bir çalışmada artan sentetik ilaç kullanımının oluşturduğu yan etkiler sonucu hastaların bir kısmı klasik tıbbi desteğin yanında fitoterapiyi ya da bitkisel kökenli başka bir alternatif tıbbi yöntemeye yönelirken diğer bir kısmı ise klasik tıbbi yaklaşımı reddederek tamamen bitkisel kökenli tedavileri tercih ettikleri bildirilmektedir (Şarışen-Çalışkan 2005:183). Şarışen ve Çalışkan (2005) yapmış oldukları çalışmalarında bitkisel ürünlerin kronik karaciğer hastaları tarafından tercih edilme yüzdesinin %21' lere dayandığını söylemişlerdir (Şarışen-Çalışkan 2005:182). Karbon tetraklorür ile karaciğer fibrozisi oluşturulmuş çalışmada timokinonun antioksidan etkinliği sayesinde karaciğer koruyucu etkinliği gösterilmiştir (Güllü-Gülcan 2013:57). Lee ve ark. (2019) yapmış oldukları çalışmalarında, *Pinus densiflora* ekstraktının uygulandığı erkek Sprague Dawley cinsi ratlarda hepatektomi uygulaması sonrasında karaciğerlerde Ki-67 ekspresyonunda artış olduğunu bildirmişler (Lee ve ark. 2019:34). Mansour ve Nagi'nin karaciğer enzim düzeyleri yüksek olan farelerde yaptıkları bir çalışmada ise içme suyuna katılan 16 mg/kg/gün dozda uygulanan timokinonun iyileştirici etkisi ortaya konulmuştur (Nagi-Mansour 2000:287). Kansere üzerine yapılan başka bir çalışmada ise kanser tedavisinin progresyonu ve tedavinin değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada proliferasyon belirteci olan Ki-67' nin hızla kontrolsüz çoğalan insan kanser hücrelerinde hastalığın teşhisi ve tedavinin seyri ile ilgili bilgi verdiği belirtilmiştir (Scholzen-Gerdes 2000:311). Bu çalışmaya göre Ki-67' nin bölünme yeteneği fazla olan hücrelerde yüksek düzeyde ekspresyonu saptanmaktadır. Çalışmamızda ise, deney gruplarındaki Ki-67 immunoreaksiyonunun azalması belirtilen çalışmalar ile paralellik göstermemektedir (Scholzen-Gerdes, Lee).

## SONUÇ

Çalışmamızda düşük doz timokinon uygulanmış rat karaciğer dokularında *in vivo* olarak Ki-67 lokalizasyonu gösterildi. Ki-67 ekspresyonunun timokinon ile arasındaki etkileşim incelendi. Kontrol ve timokinon uygulama grubunda Ki-67 ekspresyonu gözlemlenirken düşük doz timokinon uygulanan deney grubunda ekspresyonun azalması timokinonun Ki-67 üretimini engellemediğini ancak hücrelerde proliferasyonu azalttığını akla getirmektedir ilaveten çalışmanın sonuçlarını daha doğru veriler ile desteklemek için konu üzerinde ileri yöntemlerin kullanılması ve daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, A. F. M., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (2000). Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*, 400(1), 89-97.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, et al. (2008). Oral and Intraperitoneal LD50 of Thymoquinone, an active Principle of *Nigella Sativa*, in Mice and Rats. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 20(2): 25-27.
- Al-Gharably, N. M., Badary, O. A., Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Al-Sawaf, H. A., Al-Rikabi, A. C., & Al-Bekairi, A. M. (1997). Protective effect of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice.
- Alsaif, M. A. (2007). Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *J Med Sci*, 7(7), 1164-1170.
- Badary, O. A. (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 135-142.
- Badary, O. A., Abdel-Naim, A. B., Abdel-Wahab, M. H., & Hamada, F. M. (2000). The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 143(3), 219-226.
- Badary, O. A., Al-Shabanah, O. A., Nagi, M. N., Al-Bekairi, A. M., & Elmazar, M. (1998). Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Research*, 44(2-3), 56-61.
- Bozlu, M. (1998). Mesane Tümörlü Hastalarda Klinik Progresyonu ve Tedaviye Yanıtı Değerlendirmede Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 ve Nucleolar Organizer Region (AgNOR)'un Değeri, Uzmanlık Tezi. T.C. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ,Ankara

- Dağlı, A. F., & Özercan, M. R. (2006). Endometriumun Benign, Premalign ve Malign Lezyonlarında Glut-1 ile Ki-67'nin Ayırıcı Tanıdaki Yeri. *Fırat Tıp Dergisi*, 11(2), 93-97.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H. E. I. N. Z., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 133(4), 1710-1715.
- Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. (1999). 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*, 19: 757-762.
- Guyton AC, Hall JE. (2001). *Vücudun Enfeksiyona Direnci: II. Bağışıklık ve Allerji Tıbbi Fizyoloji*. Editör: Çavuşoğlu H, Yeğen ÇB, Aydın Z, Alican İ. İstanbul. Nobel Yayıncılık. 402-413.
- Güllü, E. B., & Avcı, G. (2013). Timokinon: *Nigella Sativa*'nın biyoaktif komponenti. *Kocatepe Veterinary Journal*, 6(1), 51-61.
- Halawani, E. (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research*, 3(5-6), 148-152.
- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. (2004). Anticovulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella Sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*, 11: 56-64.
- Imran, M., Rauf, A., Khan, I. A., Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Fatmawati, S., ... & Gondal, T. A. (2018). Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 390-402.
- Kaseb, A. O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejwani, S., Menon, M., ... & Reddy, G. P. V. (2007). Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 67(16), 7782-7788.
- Kenawy SA, El-Sayed ME, Awad AS, et al. (2014). Effect of thymoquinone and omega-3 on intestinal ischemia/reperfusion induced hepatic dysfunction in rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(5):169-176.
- Lee, G. S., Yang, H. G., Kim, J. H., Ahn, Y. M., Han, M. D., & Kim, W. J. (2019). Pine (*Pinus densiflora*) needle extract could promote the expression of PCNA and Ki-67 after partial hepatectomy in rat. *Acta Cirurgica Brasileira*, 34.
- Nagi, M. N., & Almakki, H. A. (2009). Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(9), 1295-1298.
- Nagi, M. N., & Mansour, M. A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin–induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*, 41(3), 283-289. 510.
- Paarakh PM. (2010). *Nigella sativa* Linn.–A comprehensive review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1: 409-429.
- Randhawa MA, Alghamdi MS. (2011). Anti-cancer activity of *Nigella sativa* (black seed) A Review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39: 1075-1091.
- Randhawa, M. A., & Al-Ghamdi, M. S. (2002). A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pak J Med Res*, 41(2), 77-83.
- Salem ML. (2005). Immunomodulatory and Therapeutic of the *Nigella Sativa* L. Seed, *Int Immunopharmacology*, 5: 1749-1770.
- Sawhney, N., & Hall, P. A. (1992). Ki67-structure, function, and new antibodies. *The Journal of Pathology*, 168(2), 161-162.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311-322.
- Şarışen, Ö., & Çalışkan, D. (2005). Fitoterapi: bitkilerle tedaviye dikkat (!). *Sted*, 14(8), 182-187.
- Yang, C., Zhang, J., Ding, M., Xu, K., Li, L., Mao, L., & Zheng, J. (2018). Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 20(5), 570-575.