

Deneyisel astım modelinde çörek otu'nun etkinliği ve vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü

The effectiveness of thymoquinone in experimental model of asthma and role of vascular endothelial growth factor

Serap Cilaker Mıcılı¹, Serdar Kalemci², Tolgahan Acar³, Hüsnü Alper Bağrıyanık⁴, Gonca Kamacı⁵, Gökçen Ömeroğlu Şimşek⁶, Tuncay Şenol⁷, Osman Yılmaz⁸

¹ Öğr.Gör., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Yrd.Doç.Dr., Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye

³ Yrd.Doç.Dr., Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴ Prof.Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵ Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁶ Arş.Gör.Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁷ Uz.Dr., Özel OSM Ortadoğu Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Birimi, Şanlıurfa, Türkiye

⁸ Prof.Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı Nigella sativa tohumlarından elde edilen ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanı sıra birçok farmakolojik etkisi bulunan Thymoquinone (TQ)'in astım üzerine etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla BAB/c dişi fareler 4 gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol (sham) grubu; Grup II: Kronik astım grubu; Grup III: Thymoquinone (TQ) (çörek otu) tedavi grubu; Grup IV: Deksametazon tedavi grubu. Sham grubu hariç tüm gruplara ovalbumin intraperitoneal olarak verildi ve ardından inhalasyon ile duyarlılaştırıldı. İnhalasyondan sonra Grup III ve IV'deki farelere sırasıyla 3 mg/kg TQ ve 1mg/kg deksametazon intraperitoneal olarak 5 gün, günde 1 kez olacak şekilde uygulandı. Denekler son ilaç uygulamasından 24 saat sonra kurban edildiler ve akciğer dokuları histolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Grup II ile karşılaştırıldığında Grup III ve Grup IV deki akciğer histolojisinin kontrole yakın olduğu belirlendi. Grup II'de inflamatuvar hücre infiltrasyonu, subepitelial vaskularizasyon ve epitelial hasar olduğu gözlemlendi. İmmunohistokimyasal olarak, Grup II'de VEGF artışı gözlenirken, Grup III ve Grup IV'de anlamlı azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışmada, TQ kullanımının kronik astımın oluşturduğu histolojik değişiklikleri hafiflettiği gösterilmiştir. Sonuçta, TQ'nin gelecekte astım için umut verici bir tedavi ajanı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Anti-inflamatuvar, fare, kronik astım, thymoquinone, VEGF

Abstract

Objective: The aim of the study is to evaluate the effect of Thymoquinone (TQ), that is obtained from Nigella sativa seeds and has anti-inflammatory effects, as well as many of the pharmacological effect, on asthma.

Material and Method: BALB/c female mice were divided into four groups: Group I: Control; Group II: Chronic asthma; Group III: Thymoquinone (TQ) treated group; Group IV: Dexamethasone treated group. All groups except for the sham group, were sensitized with ovalbumin that firstly with intraperitoneal pathway and then inhalation pathway. After the inhalation, we applied intraperitoneally 3 TQ and 1 dexamethasone respectively to mice in Group 3 and 4, once a day during last 5 days. The sham-operated group received nebulized saline in challenge period. Mice in groups III and IV were administered TQ at a dose of 3 mg/kg and dexamethasone 1 mg/kg, respectively, intraperitoneally once a day for the final 5 days of the challenge period. Animals were sacrificed 24 h after the last drug administration and the airway samples were evaluated histologically.

Results: Lung histology in Group III and Group IV were similar to Group I. Inflammatory cell infiltration, subepithelial vascularization and epithelial damage were observed in Group II. When VEGF was significantly increased in Group II, it was decreased significantly in Group III and Group IV.

Conclusion: As a conclusion, this study demonstrated that TQ administration alleviates the pathological changes of chronic asthma. TQ might be a promising therapy for asthma in the future.

Keywords: Anti-inflammatory, mouse, chronic asthma, thymoquinone, VEGF

Kabul Tarihi: 20 Mayıs 2013

Giriş

Astım dünyada en sık gözlenen kronik hastalıklardan birisidir ve dünya nüfusunun yaklaşık 300 milyonda astım hastalığı olduğu tahmin edilmektedir (1). Astım solunum yollarında gözlenen tıkanma, kronik inflamasyon ve remodeling sonucunda aşırı derecede duyarlılık geliştiği bilinen bir hastalıktır (2). Solunum yollarının yeniden şekillenme sürecinde düz kas hipertrofisi, goblet hücre hiperplazisi, subepitelial fibrozis ve anjiyogenezis gerçekleşir (3). Aynı zamanda, bronşların hiperaktivitesi sonucunda bronş epitelinde hasar gözlenir. Epitel hasarına, eozinofil infiltrasyonu, ardından eozinofillerin degradasyonu ve toksik granüler proteinlerin salınımı neden olmaktadır (4,5). Solunum yollarında gözlenen hücresel ve moleküler değişikliklere eş zamanlı olarak ödem gelişmesi sonucunda da astımın tipik karakteristiği olan bronşların mukoza ödemiyle daralması sonucunda episodik dispne (nefes darlığı) meydana gelir. Uzun dönemde astım semptomlarının kontrolünü sağlayabilmek amacıyla inhale kortikosteroidler ve anti-lökotrinler gibi güçlü anti-inflamatuvarlar tedavinin temelini oluşturmaktadır (6). Bu tedaviler son dönemde en çok kabul gören tedaviler olmasına rağmen istenmeyen yan etkileri ile ilgili problemlerin varlığı yeni tedavi yaklaşımlarına gereksinim ortaya koymaktadır.

Thymoquinone (TQ) (çörek otu) *Nigella sativa* tohumundan elde edilen aktif yağ formunda bir bileşendir (7). Araşidonik asit metabolizmasının, 5-lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolu üzerinden lökotrien B₄, tromboksan B₂ ve inflamatuvar mediatörlerin üretimini baskılayarak etkisini gösterir (8). Antioksidan, immunomodülatör etkinliği gösterilmiştir ve kanser üzerine etkinliğini gösteren hayvan deneyleri vardır (9,10). Literatürde allerjik hastalıklar (alerjik rinit, atopik egzema, astım) üzerine etkinliğini gösteren çalışmalar da yer almaktadır (11). Astım üzerine doku düzeyinde etkinliği gösterilmiş bir adet çalışma bulunmaktadır ve fareleri astımdan koruyucu etkinliği incelenmiştir (12).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) Süper Ailesi'nin üyesidir ve endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir grup büyüme faktörünü içeren anjiyogenetik bir faktördür (13). Astımda hava yollarında gözlenen vasküler şekillenme (remodeling) esas olarak VEGF'in aralı-cılık ettiği artmış anjiyogenez sonucunda meydana gelir (14). Astımlı hastalarda artış gösterdiği ve

mukozal vaskülarite ile paralellik gösterdiği bilinmektedir (14).

Bu çalışmanın amacı deneysel astım modeli oluşturulan farelerde TQ'nun astım üzerindeki olası iyileştirici etkisinin VEGF immunohistokimyası ile değerlendirmektir.

Materyal Metod

Deneysel Modelin Oluşturulması

Tüm deneysel prosedürlerin uygulanması için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan etik onay alınmıştır. Deneysel modelin uygulanması için spesifik patojen içermeyen, 6-8 haftalık, 18-20 gr. ağırlığında, dişi BALB/c türü fareler kullanıldı. Denekler deney süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodunda, ad libitum gıda ve su desteği ile beslendiler. Fareler dört gruba ayrıldı. *Grup I*: Kontrol grubu; *Grup II*: Kronik astım grubu; *Grup III*: Thymoquinone (TQ) tedavi grubu; *Grup IV*: Deksamatazon tedavi grubu.

Deneysel astım modelinin oluşturulması için BALB/c fareler yüksek doz ovalbumine maruz bırakıldı (16). Astım modellerinin uygulandığı gruplar olan grup II, III, IV deneyin 0. ve 14. günlerinde olmak üzere iki kez intraperitoneal olarak 10 µg/0.1 mL tavuk yumurtası albumin ve yardımcı madde olarak alüminyum ile sensitize edildi (ovalbumin, grade V, ≥98% pure; Sigma, St. Louis, MO, USA). Ardından, çalışma grupları olan grup II, III, IV, çalışmanın 21. gününden itibaren 8 hafta boyunca haftada 3 kez günde 30 dk aerosol haline getirilmiş ovalbumine maruz bırakıldı. Grup I'deki deneklere deneyin 0. ve 14. günlerinde olmak üzere iki kez intraperitoneal olarak salin solusyonu uygulandı ve 21. gününden itibaren 8 hafta boyunca haftada 3 kez günde 30 dk aerosol haline getirilmiş ovalbumine maruz bırakıldı. İnhalasyon tüm vücut maruz kalacak şekilde uygulandı ve denekler sensitize edildi. Ortamın sıcaklık ve nem oranı sırasıyla 20-25°C ve %40-60'dı. Normal salin içerisine çözülen %2.5'lik ovalbumin solusyonu homojen bir şekilde jet nebulizatör ile püskürtüldü. Partikül solusyonu 10-20 mg/m³ olacak şekilde akış hız ayarlandı ve denekler nebullandı (16,17).

Deneklere TQ uygulanması

Grup I'e salin solusyonu uygulandı. Grup III ve grup IV'e sırasıyla 3 mg/kg TQ (Sigma Aldrich), 1mg/kg Deksa-metazon intraperitoneal olarak uygulandı.

İnhalasyon süreçlerinden sonra 5 gün boyunca günde bir kez uygulandı. TQ ve dexametazonun intraperitoneal dozları için BALB/c fareler ile yapılmış benzer deneylerden faydalandı (16,17,18).

Histolojik İnceleme

Deney sürelerinin sonunda elde edilen akciğer doku örnekleri rutin ışık mikroskopik doku takibinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Elde edilen bloklardan rotary mikrotom ile 5 mikronluk kesitler alındı ve doku histolojisini incelemek amacıyla HE ile boyandı ve ışık mikroskop ile incelendi.

İmmunohistokimyasal yöntem

İmmunohistokimyasal inceleme için VEGF (MS-350-P1Thermo, Lab Vision, EA) primer antikoru kullanıldı. Bu amaçla, deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. Bloklama solüsyonu ile 1 saat inkübe edilen kesitler yapılmadan primer antikorlar ile 1 gece +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ve enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) ile muamele edildi. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskop ile incelendi.

İmmunohistokimyasal skorlama

Semikantitatif yöntemle yapıldı. 0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta boyanma, 3: şiddetli boyanma olarak değerlendirildi.

Verilerin istatistiksel analizi

Çalışma sürecinde elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, ve standart sapmalar belirlendi. Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis testi ile, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Tüm sonuçlarda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Grupların genel histolojik yapısı değerlendirildiğinde Grup 1, kontrol grubuna ait akciğerlerde normal akciğer histolojisi gözlemlendi. Alveoller normal görünümdeydi, bronş epitelisi tipik solunum epitelisi ile döşeliydi. İnflamasyon gözlenmemekteydi (Şekil 1). Grup 2, astım grubunda bronş ve bronşiol duvarlarının etrafında artmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 1, beyaz ok). İnfiltrasyon eozinofil, nötrofil ve mononükleer hücreleri içermekteydi. Bronşlarda subepitelial düz kas kalınlığının ve epitel hücrelerinin boylarının arttığı, goblet hücrelerinde artış olduğu gözlemlendi. Grup 3 ve Grup 4'de inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığı, bronş epitelinin ve genel dokunun kontrol grubuna yakın özellik gösterdiği belirlendi.

VEGF immünohistokimyası

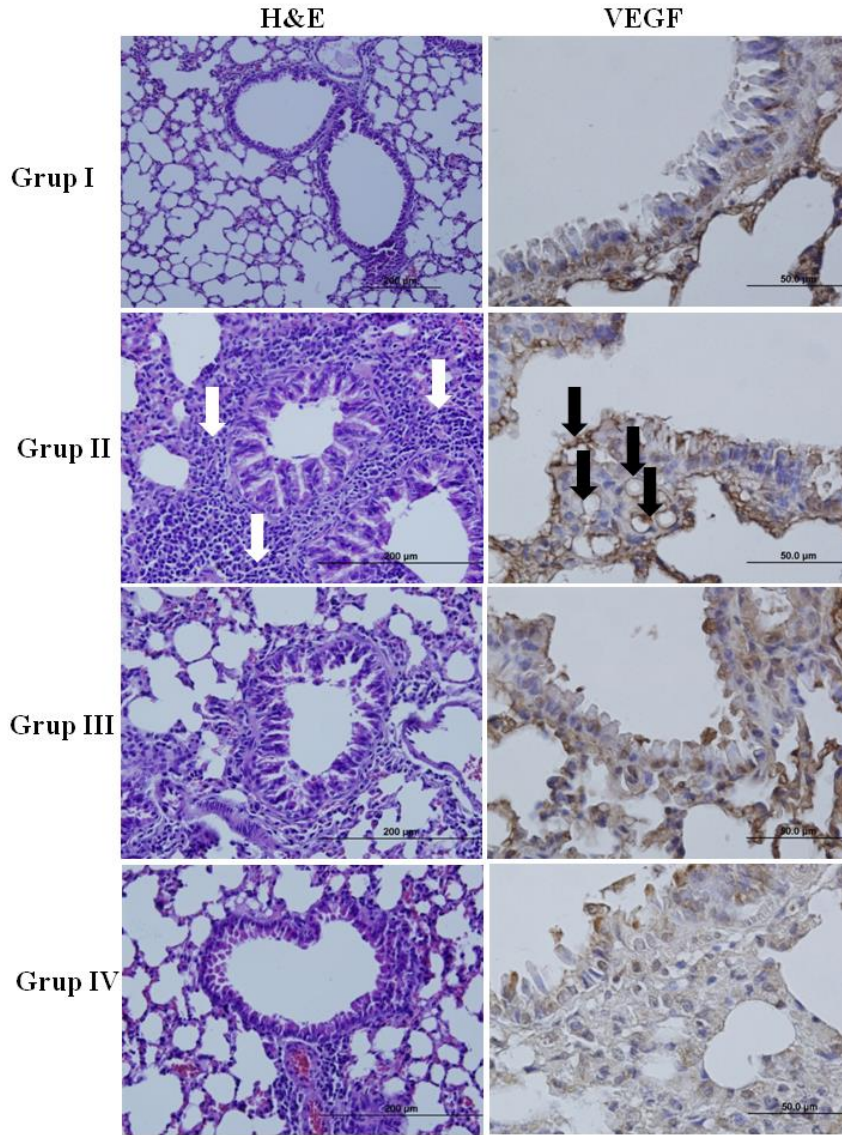
Grup II, kronik astım grubunda Grup I, III ve IV'e göre submukozada immunpozitif damarlar anlamlı olarak artış gösterdi ($p \leq 0.05$) (Tablo 1, Şekil 1). Grup III ve Grup IV'e ait VEGF immunreaksiyonu, Grup II'ye göre anlamlı azalmıştı ($p \leq 0.05$) (Tablo 1, Şekil 1). Grup III ve Grup IV arasında ise anlamlı fark gözlenmedi.

Tablo 1. VEGF immunohistokimyasının semikantitatif olarak değerlendirilmesi.

*: Anlamli artış, **: Anlamli azalma

Gruplar	Grup I Kontrol	Grup II Kronik astım	Grup III Thymoquinone (TQ)	Grup IV Deksamatazon
Submukozal VEGF	+	+++ *	++**	+++
Epitelial VEGF	+	+++ *	++**	+++

Şekil 1. Gruplara ait H&E boyaması ve VEGF immunohistokimyasal boyaması gösterilmekte. Beyaz oklar Grup II (kronik astım)'de inflamasyon alanını göstermekte. Siyah oklar ise VEGF pozitif boyanan ve yeni şekillenen, sayıları artmış submukozal damarları göstermekte.



Tartışma

Astım, solunum yollarında gerçekleşen kronik inflamasyon ve remodeling sonucunda gelişir (19). Günümüzde astım tedavisi ile ilgili kullanılan ilaç tedavileri yapısal değişiklikler üzerinde sınırlı etkilere sahiptir. Bu nedenle daha efektif olabilecek yeni tedavi yaklaşımlarına gerek duyulmaktadır. TQ'nun astım semptomlarını ve inflamatuvar belirteçleri azalttığına dair bilgiler olsa da doku düzeyinde etkileri hakkında bilgi sınırlıdır (20). Bu çalışmanın amacı da astım modeli oluşturulan farelerde TQ'nun tedavi edici etkinliğinin incelenmesi ve VEGF'in olası rolünün araştırılmasıdır.

TQ, (çörek otu) *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağından elde edilen önemli kimyasal bir bileşendir. *Nigella sativa* Orta ve Uzak doğuda geniş etkileri ile geleneksel bir ilaç olarak kullanılan bir maddedir (21). TQ, anti-inflamatuvar, anti-viral, anti-allerjik, nöroprotektif anti-diyabetik ve anti-kanserojen etkileri gözlenmiş olan bir bioflavonoiddir (21,22,23). Astımda solunum yollarının cevabı Ig E aracılı mast hücre degranülasyonu ve histamin ve lökotrien mediatörlerinin ortaya çıkması şeklindedir. TQ'da bu etkilerini lökotrien B4, tromboksan B2'nin üretimini baskılayarak ve arasıdonik asit metabolizmasındaki 5-lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarını inhibe ederek anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir (24). Ayrıca histamin reseptörleri üzerine inhibitör etkileri de olduğu gösterilmiştir (25). Astım tedavisinde kullanılan anti-löko-eritritinler, teofilin ve inhale kortikosteroidler uzun bir süre için kullanıldığında solunum yollarındaki yapısal değişikliklerin azaltılmasında etkili olabilmektedir (7). Bu çalışmada da, altın standart olarak bilinen deksametazonun ve TQ'nun kronik astımda ortaya çıkan yapısal değişikliklerin azaltılmasında etkili olduğunu ortaya konmuştur.

Remodeling tüm organlarda yara iyileşmesi esnasında görülen dinamik bir durumdur matriks yıkımı ve yapımı ile karakterizedir, normal ya da patolojik yeniden yapılanma prosedürlerini içerir. İlk defa 1992 yılında Bousquet ve ark. tarafından astımlı hastalarda akciğerin "yeniden ve ya farklı yeni yapılanma"sını tanımlamak için kullanılmıştır (26). Astımda solunum yollarının yeniden şekillenmesinin yanı sıra vasküler remodeling gerçekleşmektedir. Hafif astımlı hastalarda submukozada gözlenen vaskülarite ve artmış kan damarı sayısı gibi bulgular bu soruyu gündeme getirmiştir (27). Astım hastalığında damar duvarından sağlanan besin desteği kadar, ısının düzenlenmesi, hava yollarının nemlendirilmesine destek gibi birçok nedenden dolayı damarlanmanın önemi ortaya çıkmaktadır. Damar sayısının artışı esas olarak endotelial hücre proliferasyonuna bağlı faktörler aracılığı ile gerçekleşmektedir (27). As

tım sürecinde, endotel hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu ile vasküler permeabilitenin (geçirgenlik) etkisi sonucunda anjiyogenezis gerçekleşir ve VEGF anahtar rol oynamaktadır (3). Salvato ve ark.ları bu faktörlerin astım hastalığındaki önemini göstermişlerdir (28). Bu çalışmada da özellikle solunum epitelindeki VEGF değişiklikleri ve submukozal damarlardaki artış VEGF immuno-histokimyası ile değerlendirilmiştir.

Barbato ve ark.larının yaptıkları çalışmada çocukluk çağındaki astımlı hastalarda epitelial ve vasküler değişiklikler ve havayollarının inflamatuvar cevabını araştırmışlardır. Solunum yolu epitelinde epitel hücre kayıpları, bazal membran kalınlaşması ve subepitelde inflamatuvar hücre artışı ve damar sayısında kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğunu gözlemişlerdir (29). Bu çalışmada da astım grubunda artmış VEGF immunhistokimyası gözlenirken, TQ tedavisi uygulanan grupta damarlanmanın ve buna bağlı olarak VEGF pozitif damar sayısının azalmış olduğu dikkati çekti. Bu da TQ'nun hava yollarında vasküler artışı azalttığını, böylece akciğere inflamasyon ile ilişkili sitokinlerin geçişini azaltarak inflamasyonu azaltıcı etkisinin olabileceğini düşündürdü.

Sonuç olarak; vasküler permeabilite, vazodilatasyon ve artmış kan akımı astım mekanizmasında inflamatuvar cevabı ve solunum yollarının aktivasyonunu etkileyen en önemli faktörlerdendir. VEGF anjiyogenezis yoluyla bu mekanizmaların gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. TQ, anjiyogenezi azaltarak astımda inflamasyonu azaltıcı etkisini göstermiştir. TQ'nun astım tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Kaynaklar

1. Hansel TT, Barnes PJ. Novel drugs for treating asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001;1:164-73.
2. Meyer N, Akdis CA. Vascular Endothelial Growth Factor as a Key Inducer of Angiogenesis in the Asthmatic Airways. *Current Allergy and Asthma Reports* October 2012 (Article in pres).
3. Arm JP, Lee TH. The pathobiology of bronchial asthma. *Adv Immunol* 1992;51:323-82.
4. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986;39:177-253.
5. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 2007;56:341-8.
6. Atta-ur-Rahman, Malik S, Ahmed S, Choudhary MI, Habib-ur-Rehman. Nigellimine-N-oxide A new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles* 1985;23:953-5.
7. El-Dakhkhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HP. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived

- thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol* 2002;81:161-4.
8. Labib Salem M. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int J Immunopharmacol* 2005;5:1749-70.
 9. Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, et al. Effect of *Nigella sativa* (blackseed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. *Phytother Res* 2003;17:1209-14.
 10. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nikolis MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a Mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1135-42.
 11. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid Q A. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1034-8.
 12. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:295-301.
 13. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal* 1999;13:9-22.
 14. Chetta A, Zanini A, Torre O, Olivieri D. Vascular Remodelling and Angiogenesis in Asthma: Morphological Aspects and Pharmacological Modulation. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 2006;6:41-4.
 15. Lee CG, Ma B, Takyar S, Ahangari F, Delacruz C, He CH, et al. Studies of vascular endothelial growth factor in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8(6):512-5.
 16. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 1998;53:849-56.
 17. Olmez D, Babayigit A, Uzuner N, Erbil G, Karaman O, Yilmaz O, et al. Efficacy of sulphasalazine on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Exp Lung Res* 2008;34:501-11.
 18. Karaman M, Fıncı F, Cilaker Mıcılı S, Uysal P, Tuğyan K, Yılmaz O, et al. Anti-Inflammatory Effects Of Curcumin In A Murine Model Of Chronic Asthma. *Allergol Immunopathol* 2011; 40(4):210-4.
 19. Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006;129:1068-87.
 20. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed, *Int. Immunopharmacol* 2005;5(13-14):1749-70.
 21. Ashraf SS, Rao MV, Kaneez FS, Qadri S, Al-Marzouqi AH, Chandranath IS, et al. *Nigella sativa* extract as a potent antioxidant for petrochemical-induced oxidative stress. *J. Chromatogr Sci* 2011;49:321-26.
 22. Badr G, Alwasel S, Ebaid H, Mohany M, Alhazza I. Perinatal supplementation with thymoquinone improves diabetic complications and T cell immune responses in rat offspring. *Cell Immunol* 2011;257:133-40.
 23. Budancamanak M, Kanter M, Demirel A, Ocakci A, Uysal H, Karakaya C. Protective effects of thymoquinone and methotrexate on the renal injury in collagen-induced arthritis. *Arch Toxicol* 2006;80: 768-76.
 24. Houghton PJ, Zerka R, DL-Heras B, Hoult JR. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica* 1995;61:33-6.
 25. Boskabady MH, Sheiravi N. Inhibitory effect of *Nigella sativa* on histamine receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *Pharm Biol* 2002;40:596-602.
 26. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P. Asthma: a disease remodelling the airways? *Allergy* 1992;47:3-11.
 27. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:229-33.
 28. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* 2001;56:902-6.
 29. Wilson JW, Li X. Vessels: new targets for asthma treatment. *Thorax* 2001;56:899-900.

İletişim:

Serap Cilaker Mıcılı

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. İzmir

E-mail: serap.cilaker@deu.edu.tr, cilaker6@yahoo.com

Tel: +90 232 4124567