

DENEYSEL ARAŞTIRMA

Ratlarda Di-İzobütil Fitalatın Bazı Kan Parametreleri Üzerindeki Etkisi ve Timokinonun Koruyucu Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Effects of Di-Isobutyl Phthalate on Some Blood Parameters and Evaluation of the Protective Activity Of Thymoquinone in Rats

Tansu KUŞAT^{1,a}, Emre TAŞMERTEK², Yasemin ÖZNURLU², Abdulkadir KAYA³, Ayşe Gizem YILDIRIM³, Tolga TUTAR⁴

¹Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Karabük, Türkiye

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

³Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Konya, Türkiye

⁴Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

T.K. 0000-0001-7237-1562, E.T. 0009-0008-7308-8839, Y.Ö. 0000-0002-6296-3107,

A.K. 0000-0003-1871-1655, A.G.Y. 0009-0008-2189-5145, T.T. 0000-0002-2413-085X.

^aSorumlu Yazar: Tansu KUŞAT (tansukusat@karabuk.edu.tr)

ÖZET

Amaç: Endüstride sıklıkla kullanılan ve önemli bir çevresel kirletici olan fitalatlara maruz kalmanın, birçok sistemde olduğu gibi immun sistem üzerinde de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada, di-izobütil fitalatın (DIBP) ratlarda perifer kan lökosit sayısı ile lenfosit ve asit fosfataz (ACP-az) pozitif lenfosit oranları üzerindeki etkisi ve timokinonun koruyucu rolünün belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Elli adet 4 haftalık Wistar Albino ırkı erkek ratlar kontrol, taşıyıcı kontrol, 500 mg/kg DIBP, 750 mg/kg DIBP, Timokinon 10 mg/kg, 500 mg/kg DIBP+10 mg/kg timokinon ve 750 mg/kg DIBP+10 mg/kg timokinon olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Otuz günlük uygulama süresinin sonunda hayvanlar kurban edildikleri kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde lökosit sayısı ile lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranları belirlendi.

Bulgular: Perifer kan lökosit sayısı ile lenfosit ve ACP-az (+) lenfosit oranlarının 500 ve 750 mg/kg DIBP uygulanan gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli oranda ($p < 0.05$) düşük olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte 500 mg/kg DIBP + timokinon ve 750 mg/kg DIBP + timokinon gruplarında bu değerlerin sadece DIBP uygulanan gruplara göre artmış olduğu görüldü.

Sonuç: Bu sonuçlar timokinonun DIBP'nin neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: ACP-az, Di-izobütil fitalat, Lenfosit, Timokinon.

ABSTRACT

Objective: Exposure to phthalates, which are frequently used in industry and are significant environmental pollutants, has adverse effects on the immune system as well as on many other systems. This study aimed to determine the effects of di-isobutyl phthalate (DIBP) on peripheral blood leukocyte counts and the proportion of lymphocytes and acid phosphatase (ACP-ase) positive lymphocytes in rats, and to determine the protective role of thymoquinone.

Material and Method: Fifty 4-week-old male Wistar Albino rats were divided into 7 groups: control, vehicle control, 500 mg/kg DIBP, 750 mg/kg DIBP, thymoquinone 10 mg/kg, 500 mg/kg DIBP+10 mg/kg thymoquinone, and 750 mg/kg DIBP+10 mg/kg thymoquinone. At the end of the 30-day administration period, the animals were sacrificed, and blood samples were taken. The leukocyte counts, lymphocyte, and ACP-ase positive lymphocyte proportions were determined in the blood samples.

Results: Peripheral blood leukocyte counts, lymphocyte counts, and ACP-ase (+) lymphocyte ratios were observed to be statistically significantly lower ($p < 0.05$) in the 500 and 750 mg/kg DIBP groups compared to the other groups. However, these values were increased in the 500 mg/kg DIBP + thymoquinone and 750 mg/kg DIBP + thymoquinone groups compared to the DIBP-only groups.

Conclusion: These results suggest that thymoquinone may have a protective effect against DIBP-induced toxicity.

Keywords: ACP-ase, Di-isobutyl phthalate, Lymphocyte, Thymoquinone.

Günümüzde plastik kullanımının önemli derecede artması ile birlikte insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olan çevresel toksik bileşenlerin yayılımı da hızlanmıştır. Bu toksik bileşenlerin biri de fitalat ve fitalat esterleridir (1). Bu bileşenler çevresel endokrin bozucu ajanlar olarak da bilinmektedir (2). Fitalatlar molekül ağırlıklarına göre yüksek ve düşük molekül ağırlıklı olarak iki grupta sınıflandırılır. Yüksek molekül ağırlıklı fitalatlar; di-2-etilheksil fitalat (DEHP), bütıl benzil fitalat (BBzP), di-isononil fitalat (DiNP), di-n-oktil fitalat (DnOP), di-isodesil fitalat (DiDP) iken, düşük molekül ağırlıklı fitalatlar ise; di-bütıl fitalat (DBP), dimetil fitalat (DMP), dietil fitalat (DEP) ve di-izobütıl fitalattır (DIBP) (2).

DIBP, plastik malzemelere esneklik ve dayanıklılık kazandırmak amacıyla kullanılan sentetik bir bileşiktir (3). DIBP'nin plastik polimer matriksine kovalent bağlarla bağlanmadığı için çevreye kolayca salınabildiği ve bu nedenle Amerika Birleşik Devletleri tarafından öncelikli bir çevresel kirlenici olarak tanımlandığı bildirilmiştir (4). Yüz maskesi, oje ve saç spreyi gibi kozmetik ürünler, kan torbaları ve katater gibi tıbbi malzemeler, çatal ve bıçak gibi metal ürünler, eldiven, cüzdan ve ayakkabı gibi deri ürünleri, gıda ambalajları ve saklama kapları DIBP içerirler (3, 5-8).

Geniş kullanım alanlarından dolayı fitalatlara oral, inhalasyon ve dermal yollarla maruz kalılabilmektedir (9). Yapılan çalışmalarda DIBP ve metabolitine (Mono-izobutil fitalat, MiBP) maruziyetin DBP gibi fitalatlara alternatif olarak kullanılması nedeniyle arttığı gösterilmiştir (10). Günümüzde MiBP idrar, anne sütü ve amniyotik sıvı gibi birçok biyolojik sıvıda tespit edilmiştir (11, 12). Birçok sistem üzerine toksik etkisi olan fitalatların en önemli etkisi reproduktif sistem üzerinedir (13). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda fitalatların immün sistem üzerinde de önemli etkileri olabileceği gösterilmiştir. Linghu ve ark. (14), 5-6 haftalık erkek ratlarda 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozunda DEHP'e maruz kalmanın kan total lenfosit, monosit, nötrofil, eozi-nofil ve bazofil sayılarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Pierozan ve ark. (15) sekiz haftalık erkek farelere düşük (10 mg/kg/gün) ve yüksek dozlarda (100 mg/kg/gün) DBP uygulamasının total lökosit sayısı ile birlikte monosit ve yardımcı T lenfosit sayısında azalmaya neden olarak enfeksiyon hastalıkları ve kansere duyarlılığı artırırken aşı etkinliğini de azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Asit fosfataz, asit hidrolazlar grubunda bulunan lizozomal karakterde bir enzimdir. Asit fosfataz enzimi miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulcukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunmaktadır (16, 17). Perifer kan lenfositleri granüler tarzda ACP-az enzim pozitivitesi gösterirken, monositler ise sitoplazmalarında ince granül-

lerden oluşan diffuz pozitiviteye sahiptirler (18). ACP-az enziminin memelilerde T-lenfositlere özgü olduğu ileri sürülürken (19), tavuklarda B-lenfositlere özgü olduğu bildirilmiştir (20).

Günümüzde çörek otu veya siyah kimyon olarak bilinen *Nigella sativa* tohumu birçok kültürde geleneksel olarak çeşitli tıbbi faydaları için kullanılmaktadır (21). *Nigella sativa* tohumlarının biyolojik etkilerinin büyük çoğunluğu ise tohumların %30-48'ini oluşturan yağ bileşenlerine atfedilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA), siyah kimyon yağını "Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilir" olarak etiketlemiştir (22, 23). Timokinon (2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon), *Nigella sativa* yağında ve özütlerinde bulunan önemli bir fitokimyasal biyoaktif bileşendir (24, 25). Terapötik bir ajan olarak kullanıldığı çalışmalarda timokinonun antihistaminik, antiinflamatuvar, antihipertansif, hipoglisemik, antikanser ve bağışıklık güçlendirici etkilerine dikkat çekilmiştir (26-28).

Bu çalışmada, ratlarda DIBP maruziyetinin perifer kan lökosit sayısı ile lenfosit ve ACP-az pozitif lenfositler üzerine etkisi ve timokinonun koruyucu rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Etik Onay

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)'nin 2024/184 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

Hayvan Materyali ve Deney Gruplarının Tasarımı

Çalışmada toplam 50 adet 4 haftalık Wistar Albino erkek ratlar kullanıldı. Ratların bakımı standart laboratuvar hayvanlarının bakım şartlarına (12 saat aydınlık-12 saat karanlık ve 21±1 °C) uygun olarak gerçekleştirildi. Deneyel uygulamalar süresince ratlara standart ticari yem (pelet yem) ve su adlibitum olarak sağlandı.

Hayvanlar rastgele 7 gruba ayrıldı.

1. **Kontrol grubu (n =6):** Bu gruptaki ratlara herhangi bir uygulama yapılmadı.
2. **Taşıyıcı Kontrol grubu (n =6):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile günde bir defa oral gavaj yoluyla mısır yağı verildi.
3. **500 mg/kg DIBP grubu (n =8):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile günde bir defa oral gavaj yoluyla mısır yağı içerisinde 500 mg/kg dozunda DIBP verildi.
4. **750 mg/kg DIBP grubu (n =8):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile günde bir defa oral gavaj yoluyla mısır yağı içerisinde 750 mg/kg dozunda DIBP verildi.
5. **Timokinon grubu (n =6):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile günde bir defa oral gavaj yoluyla

la mısır yağı içerisinde 10 mg/kg dozunda timokinon verildi.

6. **500 mg/kg DIBP + Timokinon grubu (n =8):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile oral gavaj yoluyla günde bir defa mısır yağı içerisinde 500 mg/kg dozda DIBP+10 mg/kg timokinon verildi.
7. **750 mg/kg DIBP + Timokinon grubu (n =8):** Bu gruptaki ratlara 30 gün süre ile oral gavaj yoluyla günde bir defa mısır yağı içerisinde 750 mg/kg dozda DIBP+10 mg/kg timokinon verildi.

Otuz günlük deneme süresinin sonunda bütün hayvanlardan antikoagulanlı tüplere kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden otomatik hücre sayım cihazıyla (Abbot Architech 3700 model analizör) lökosit sayısı ve total lenfosit (%) belirlendi. Ayrıca alınan kan örneklerinden 2'şer adet froti hazırlandı. Ortam sıcaklığında kurutulan frotiler -10 °C' deki glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH:4.8) 3 dakika süreyle tespit edildi. Frotiler ACP-az enzim demonstrasyonu için inkübasyon solüsyonunda inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 3'er defa distile su ile yıkanan preparatlara, asetat tamponunda (pH:4.8) hazırlanmış olan %1' lik methyl- green ile çekirdek boyası uygulandı (29). Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit ışık mikroskopunda (DFC- 320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500) sayılarak

ACP-az pozitif lenfosit oranları yüzde olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 25 (IBM SPSS Statistics for Windows, Sürüm 25.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2017) paket programı kullanıldı. Ölçümlerden elde edilen sayısal veriler One-Way Anova Testi (Tek Yönlü Varyans Analizi) ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. Tüm veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak sunuldu. Testlerin anlamlılık düzeyi p <0.05 olarak belirlendi.

BULGULAR

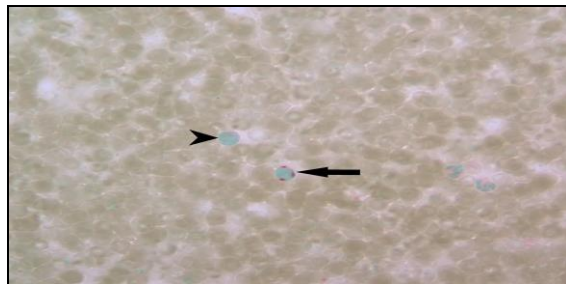
Tablo 1'de tüm gruplara ait perifer kan lökosit sayısı ile lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranları yüzde (%) olarak verilmiştir. Kontrol, taşıyıcı kontrol ve timokinon grubuna göre 500 ve 750 mg/kg DIBP gruplarında lökosit sayısı ile total lenfosit yüzde oranının istatistiksel olarak önemli oranda (p <0.05) azaldığı dikkati çekmiştir. Bununla birlikte DIBP + timokinon verilen gruplarda bu değerlerde belirgin bir artış olduğu görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. Perifer kanda lökosit sayısı, lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranları (%).

Gruplar	Lökosit	Lenfosit	ACP-az Pozitif Lenfosit Oranı (%)
Kontrol	6,13±0,86 ^a	74,78±4,55 ^a	28,00±1,41 ^a
Taşıyıcı kontrol	6,19±0,73 ^a	75,41±7,43 ^a	26,17±2,71 ^a
Timokinon	5,92±0,66 ^a	73,30±3,71 ^{ab}	26,50±1,51 ^a
500 mg/kg DIBP	3,86±0,13 ^{bc}	60,92±11,77 ^c	15,00±1,41 ^c
750 mg/kg DIBP	2,92±1,55 ^c	57,15±14,65 ^c	14,75±1,67 ^c
500 mg/kg DIBP + Timokinon	4,72±1,29 ^b	62,40±14,08 ^b	18,00±1,00 ^b
750 mg/kg DIBP + Timokinon	4,83±0,66 ^b	57,87±9,23 ^c	17,13±1,55 ^{bc}

^{abc} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p <0.05).

Frotiler üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemeler sonucunda lenfositlerdeki ACP-az pozitivitesinin 1-3 adet pembe-kırmızı granül şeklinde olduğu dikkati çekti (Şekil 1).



Şekil 1. Perifer kan frotisinde ACP-az demonstrasyonu. Ok: ACP-az pozitif lenfosit. Ok başı: ACP-az negatif lenfosit. Bar: 20 µm.

Perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranlarının 500 ve 750 mg/kg DIBP gruplarında diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli oranda (p <0.05) düşük olduğu tespit edildi. DIBP ile birlikte timokinon uygulanan gruplarda bu değerlerin sadece DIBP uygulanan gruplara göre bir miktar arttığı görüldü (Tablo 1).

TARTIŞMA

Fitalat ve fitalat esterleri, gıda ambalajları, kozmetik ürünler ve yapı malzemeleri gibi birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan kimyasallardır (30, 31). Yol açtığı sağlık riskleri nedeniyle DBP kullanımı son yıllarda birçok ülkede kısıtlanmıştır (4). DBP' nin dallanmış izomeri olan DIBP ise endüstride DBP' ye uygun bir alternatif olarak kabul edilmiş ve kullanım alanı giderek genişlemiştir (32). Bununla birlikte, DIBP materyallerdeki multimer

matrikse sıkı sıkıya bağlı olmadığından üründen çevreye kolaylıkla sızarak kontaminasyona neden olabilir (32, 33). Yost ve ark. (7) ile Zota ve ark. (34) tarafından yapılan çalışmalarda canlılarda DIBP maruziyetinin arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda organ, doku ve sistemler üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (35, 36). Nitekim yapılan birçok çalışmada, canlılarda DIBP maruziyetinin giderek arttığı (7, 34) ve çeşitli doku, organ ve sistemler üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (35, 36).

İnsan ve hayvanlarda çevresel kimyasallara maruziyetin artış göstermesi ve immun sistemle ilişkili hastalıkların görülme sıklığı arasında önemli bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (35, 37). Endokrin bozucu kimyasallar olarak bilinen fitatların da immun sistemi etkileyeceği düşünülerek çeşitli fitalat türlerinin immun sistem üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır (14, 38). Yetişkin erkek farelerde yapılan bir çalışmada, 5 hafta boyunca 10 ve 100 mg/kg dozlarında oral DBP uygulanmasının lökosit, monosit ve yardımcı T lenfosit popülasyonunu azaltarak immüno-supresyona neden olabileceği rapor edilmiştir (15). Benzer şekilde Linghu ve ark. (14) 5-6 haftalık erkek ratlara 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozunda DEHP uygulamasının total lenfosit, monosit, nötrofil, eozinofil ve bazofil sayısında düşüşe yol açtığını bildirmişlerdir. Dahası bu çalışmada, CD3⁺ ve CD4⁺ yardımcı T lenfositlerin azalmasına bağlı olarak mast hücreleri ve eozinofillerin proliferasyonunu sağlayan sitokinlerin azaldığı ve ayrıca lenfositlerde apoptoz ve nekroza sebep olan bazı genlerin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir.

Daha düşük molekül ağırlıklı fitatlardan biri olan DMP üzerine yapılan bir çalışmada ise Chi ve ark. (39) 6 haftalık Sprague Dawley erkek ratlara 0, 50, 250 ve 500 mg/kg dozlarında DMP uygulanmıştır. Bu çalışmada DMP'nin antioksidan aktiviteyi inhibe ettiği, reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığı ve böylece oksidatif strese yol açtığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar DMP uygulanan gruplarda eritrosit, lökosit ve lenfosit sayısında belirgin azalma olduğunu bildirmişler ve kan hücrelerindeki değişikliklerin DMP'nin kemik iliğinde kan hücrelerinin maturasyonu üzerinde bir etkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Gebeliğin farklı dönemlerinde siyah Bengal keçisine DEP, DBP, DIBP ve DPP olmak üzere dört farklı fitalat karışımı rasyonla birlikte verilmiş ve hematolojik parametreler incelenmiştir. Çalışmada eritrosit ve lökosit sayısı, hemoglobin konsantrasyonu, hematokrit değerleri fitalata maruz kalan keçilerde anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur (40). Kiran ve ark. (41) ratlara iki hafta 50 mg/kg dozunda DBP uygulamasının hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısında önemli bir azalmaya neden olduğunu, benzer şekilde Patel ve ark. (42) DBP uygulamasının da lökosit ve eritrosit sayısı ile hemoglobin, hematokrit, MCV ve MCHC değerlerinde önemli bir azalmaya neden olduğunu

bildirmişlerdir. Dişi albino farelerde DEHP toksisitesinin hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada glikoz, trigliserid, düşük yoğunluklu lipoprotein ve toplam protein düzeylerinin belirgin şekilde artmış olduğu; toplam alyuvar ve akyuvar sayısı ile hemoglobin düzeyinin ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir (43). Baralić ve ark. (44) ratlarda DEHP, DBP, BPA'yı ayrı ayrı ve hepsinin karışımı halinde vermişler ve bu gruplarda kontrol grubuna kıyasla lökosit ve lenfosit sayısında önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

ACP-az enziminin memelilerde çoğunluğunu T-lenfositlerinin oluşturduğu hücre popülasyonları için spesifik olduğu bildirilmiştir (45). Enzim histokimyasal teknikler, insan ve çeşitli hayvan türlerinin bağışıklık sistemleri üzerinde yapılan deneysel çalışmaların yanı sıra bazı hastalıkların teşhisinde ve sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sebeple kan hücrelerinin sayı ve oranlarının ayrıca kan hücrelerinden özellikle lenfositlerin enzimatik özelliklerinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. DIBP maruziyetinde kanda ACP-az (+) lenfosit oranlarındaki değişiklikler, fitatların immün sistem üzerindeki olası etkilerini açıklamada önemli ipuçları sağlayabilir. Bu çalışmada lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranlarının 500 mg/kg ve 750 mg/kg DIBP uygulanan gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı dikkati çekti ($p < 0.05$). 500 mg/kg DIBP + timokinon ve 750 mg/kg DIBP + timokinon gruplarında da lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranları ise sadece DIBP uygulanan gruplara göre bir miktar artış gösterdi.

Timokinon (2-metil-5-izopropil-1,4-benzokinon), çörek otu olarak da bilinen *Nigella sativa*' dan (*N. Sativa*) elde edilen biyoaktif bir bileşendir. *N. Sativa*, besin açısından zengin değerli tıbbi bitkilerden biridir (46). Antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antineoplastik etkilerinin yanı sıra timokinon güçlü bir immünomodulatördür (47, 48). Yetişkin erkek ratlarda timokinon'un imidaklopid kaynaklı immünotoksiste üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 7 gün boyunca 1 mg/kg dozunda uygulanan timokinon takviyesinin fagositik aktiviteyi, kemotaksiyi, immünglobulin seviyeleri ve antikorların hemaglutinasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. (49). Ratlarda 4 hafta boyunca 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozlarında uygulanan timokinonun, diazinonun immun sistem üzerindeki toksik etkisini azalttığı bildirilmiştir (50). Yüksel ve ark. (51) siklofosfamidin sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı timokinonun koruyucu etkisini değerlendirdikleri çalışmada timokinon'un genotoksik hasara karşı insan periferik kan lenfosit kültürleri üzerinde in vitro koruyucu bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Neonatal ratlarda aflatoksin M1 (AFM1) kaynaklı hematotoksiste ve hepatotoksisteye karşı timokinon uygulamasının koruyucu etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (52). Benzer şekilde

ratlarda bisfenol-A (BPA)'nın neden olduğu hematotoksositeye karşı da timokinonun koruyucu etkinliğinin olduğu ortaya konulmuştur (53).

Sunulan bu çalışmada perifer kan lökosit sayısı ile lenfosit ve ACP-az (+) lenfosit oranlarının 500 ve 750 mg/kg DIBP uygulanan gruplarda diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli oranda ($p < 0.05$) düşük olduğu tespit edildi. Bununla birlikte DIBP ile birlikte 30 gün boyunca 10 mg/kg timokinon uygulanan gruplarda bu değerlerin sadece DIBP uygulanan gruplara göre artmış olduğu görüldü. Bu veriler timokinonun DIBP'ın neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, timokinonun DIBP ve benzeri endokrin bozucu kimyasal-

ların yol açacağı zararlı etkilere karşı koruyucu bir takviye olarak kullanılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Yazarların Katkısı

Konsept, Tasarım: YÖ, TT, TK. Veri Toplama veya İşleme: ET, AK, AGY, TT. Analiz veya Yorum: YÖ, TK, ET. Literatür Taraması: TK, ET, AK, AGY. Yazma: TK, ET, YÖ.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada, araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Tufan N. Fitalat maruziyetinin embriyonal gelişime etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2019.
2. Mariana M, Feiteiro J, Verde I, Cairrao E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environ Int* 2016; 94: 758-76.
3. Liu H, Cui K, Zeng F et al. Occurrence and distribution of phthalate esters in riverine sediments from the Pearl River Delta region, South China. *Mar Pollut Bull* 2014; 83: 358-65.
4. Cao Y, Lin H, Zhang K, et al. Microplastics: A major source of phthalate esters in aquatic environments. *J Hazard Mater* 2022; 432: 128731.
5. Yuan S, Liu C, Liao C, Chang B. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. *Chemosphere* 2002; 49: 1295-9.
6. Yerlikaya P. Fitalat esterleri ve su ürünleri tüketimindeki yeri. *Food and Health* 2017; 3: 59-66.
7. Yost EE, Euling SY, Weaver JA et al. Hazards of diisobutyl phthalate (DIBP) exposure: a systematic review of animal toxicology studies. *Environ Int* 2019; 125: 579-94.
8. Magalhães AMR. Evaluation of Diisobutyl Phthalate (DIBP) in Food: Comparison With Dibutyl Phthalate (DBP) in Terms of Hazard Identification, Characterization and Exposure Via Packaging and Food Contact Materials: Universidade de Lisboa (Portugal); 2021.
9. Alves A, Covaci A, Voorspoels S. Are nails a valuable non-invasive alternative for estimating human exposure to phthalate esters? *Environ Res* 2016; 151: 184-94.
10. Jeong SH, Jang JH, Cho HY, Lee YB. Toxicokinetics of diisobutyl phthalate and its major metabolite, monoisobutyl phthalate, in rats: UPLC-ESI-MS/MS method development for the simultaneous determination of diisobutyl phthalate and its major metabolite, monoisobutyl phthalate, in rat plasma, urine, feces, and 11 various tissues collected from a toxicokinetic study. *Food Chem Toxicol* 2020; 145: 111747.
11. Wang X, Sheng N, Cui R, Zhang H, Wang J, Dai J. Gestational and lactational exposure to di-isobutyl phthalate via diet in maternal mice decreases testosterone levels in male offspring. *Chemosphere* 2017; 172: 260-7.
12. Yin S, den Ouden F, Cleys P et al. Personal environmental exposure to plasticizers and organophosphate flame retardants using silicone wristbands and urine: Patterns, comparisons, and correlations. *Sci Total Environ* 2024; 927: 172187.
13. Yang Y, Jiang D, Ji C, Han X, Li Q, Chao L. Integrated multi-omics analysis dissects di-isobutyl phthalate exposure-induced male fertility impairment. *Ecotoxicol Environ Saf* 2025; 303: 119013.

14. Linghu D, Zhu Z, Zhang D, et al. Diethylhexyl phthalate induces immune dysregulation and is an environmental immune disruptor. *J Hazard Mater* 2024; 480: 136244.
15. Pirozan P, Källsten L, Theodoropoulou E, Almamoun R, Karlsson O. Persistent immunosuppressive effects of dibutyl phthalate exposure in adult male mice. *Sci Total Environ* 2023; 878: 162741.
16. Sur E, Öznurlu Y, Özaydın T, Çelik İ, Aydın İ, Kadıralıyeva N. Gebe Farelerde Perifer Kan ve Endometriyum Dokusunda T-lenfosit, Null Lenfosit ve Asit Fosfataz Pozitif Lenfositlerin Oran ve Dağılımları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20: 135-41.
17. İzgi M, Sur E, Öznurlu Y, Özaydın T, Kuşat T. Determination of Embryotoxic Effects of In Ovo Administered Propofol on Peripheral Blood Alpha Naphthyl Acetate Esterase and Acid Phosphatase-Positive Lymphocytes. *Türk J Anaesthesiol Reanim* 2023; 51: 37-42.
18. Sur E, Aydın İ, Öznurlu Y, Özaydın T, Çelik İ, Kadıralıyeva N. Merinos ırkı sağlıklı gebe koyunların perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2013; 19: 483-8.
19. Telatar T, Arslan A, Sur E, Öznurlu Y, Özparlak H. An enzyme histochemical study on the peripheral blood lymphocytes of three different bat species. *Selcuk University J Sci Faculty* 2008; 2: 1-7.
20. Arslan C, Pirinç A, Eker N, Sur E, Ündağ İ, Kuşat T. Dietary encapsulated essential oil mixture influence on apparent nutrient digestibility, serum metabolic profile, lymphocyte histochemistry and intestinal morphology of laying hens. *Anim Biosci* 2022; 35: 740-51.
21. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of black seed (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone. *J Pharmacopuncture* 2017; 20: 179.
22. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Samarghandian S. Anti-inflammatory effects of thymoquinone and its protective effects against several diseases. *Biomed Pharmacother* 2021; 138: 111492.
23. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75: 311-35.
24. Randhawa MA, Alghamdi MS. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed)-a review. *Am J Chin Med* 2011; 39: 1075-91.
25. Mouminah HH. Black Seed (*Nigella sativa*) Reduced Release of Phthalates Esters from Packing Material to Prepared Cheese. *Pharmacognosy Res* 2024; 16.
26. Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *J Lit Pharmacy Sci* 2018; 7: 118-35.
27. Khader M, Eckl PM. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 950.
28. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009; 85: 830-4.
29. Sur E. Farklı yaş gruplarındaki Türk merinosu erkek kuzularının perifer kan lenfositlerinin alfanaftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) enzimi aktivitelerinin belirlenmesi. *Veterinarium* 2004; 15: 15-22.
30. Liu M, Du X, Chen H, Bai C, Lan L. Systemic investigation of di-isobutyl phthalate (DIBP) exposure in the risk of cardiovascular via influencing the gut microbiota arachidonic acid metabolism in obese mice model. *Regen Ther* 2024; 27: 290-300.
31. Zhang Q, Chen X-Z, Huang X, Wang M, Wu J. The association between prenatal exposure to phthalates and cognition and neurobehavior of children-evidence from birth cohorts. *Neurotoxicology* 2019; 73: 199-212.
32. Yao X, Wang C, Li Ma et al. Extreme environmental doses of diisobutyl phthalate exposure induce oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*): evidence at the biochemical and molecular levels. *J Environ Manage* 2023; 331: 117321.
33. Kastner J, Cooper DG, Marić M, Dodd P, Yargeau V. Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and “green” plasticizers from poly (vinyl chloride). *Sci Total Environ* 2012; 432: 357-64.
34. Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. *Environ Health Perspect* 2014; 122: 235-41.
35. Wu Y, Li J, Yan B et al. Oral exposure to dibutyl phthalate exacerbates chronic lymphocytic thyroiditis through oxidative stress in female Wistar rats. *Sci Rep* 2017; 7: 15469.
36. Abdollahi M. Phthalate-Induced toxicity in various organs with a focus on the reproductive system. *Int J Pharmacol* 2015; 100: 95-105.
37. Popescu M, Feldman TB, Chitnis T. Interplay Between Endocrine Disruptors and Immunity: Implications for Diseases of Autoreactive Etiology. *Front Pharmacol* 2021; 12: 626107.
38. Zhang Y, Lyu L, Tao Y, Ju H, Chen J. Health risks of phthalates: A review of immunotoxicity. *Environ Pollut* 2022; 313: 120173.

39. Chi Z, Lin H, Wang X et al. Dimethyl phthalate induces blood immunotoxicity through oxidative damage and caspase-dependent apoptosis. *Sci Total Environ* 2022; 838: 156047.
40. Hasan S, Miah MA, Mustari A, Sujan KM, Bhuiyan MER, Rafiq K. Exposure to environmentally relevant phthalate mixture during pregnancy alters the physical and hemato-biochemical parameters in Black Bengal goats. *Heliyon* 2024; 10: e25852.
41. Kiran S, Joshi M. Impact of di-n-butyl phthalate on haematology and biochemistry of albino rat. *Toxicol Int* 2009; 16: 117.
42. Patel RR, Joshi B, Ghodasara D, Khorajiya J, Ghodasara PD, Pandey S. Toxicopathological studies of di butyl phthalate in male wistar rats. *Ind J Vet & Anim Sci Res* 2014; 43: 211-20.
43. Soni M, Shah M, Shrivastava VK. Vitamin C mitigates hematological and biochemical alterations caused by di(2-ethylhexyl) phthalate toxicity in female albino mice, *Mus musculus*. *Comp Clin Path* 2022; 31: 1005-16.
44. Baralić K, Buha Djordjevic A, Živančević K et al. Toxic effects of the mixture of phthalates and bisphenol a-subacute oral toxicity study in wistar rats. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: 746.
45. Basso G, Cocito M, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol* 1980; 44: 577-82.
46. Gull T, Anwar F, Sultana B, Alcayde MAC, Nouman W. Capparis species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. *Indust Crop Produc* 2015; 67: 81-96.
47. Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res* 2015; 95: 138-58.
48. Dur A, Köse H, Koçyiğit A, Kocaman O, Ismayilova M, Sönmez FC. The anti-inflammatory and antioxidant effects of thymoquinone on ceruleine-induced acute pancreatitis in rats. *Bratisl Lek Listy* 2016; 117: 614-8.
49. Mohany M, El-Feki M, Refaat I, Garraud O, Badr G. Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide. *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1-11.
50. Danaei GH, Karami M. Protective effect of thymoquinone against diazinon-induced hematotoxicity, genotoxicity and immunotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017; 55: 217-22.
51. Yuksel S, Tasdemir S, Korkmaz S. Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Bratisl Lek Listy* 2017; 118: 208-11.
52. Badmos AO, Oni EO, Aladesida AA, Oluwafemi F. Protective role of *Nigella sativa* oil and vitamins C and E against aflatoxin M1-induced hematology and hepatic toxicity in neonatal rats. *Sci Rep* 2025; 15: 25611.
53. Sujan KM, Miah MA, Mustari A, Islam MK. Beneficial effects of black seed oil on blood, hormone profile, sperm parameters and histotexture of testis of male mice exposed to Bisphenol-A. *J Bangladesh Agril Univ* 2021; 19: 223-9.