



## DENEYSSEL ALERJİK KONJONKTİVİT MODELİNDE ÇÖREK OTU BİLEŞENLERİNDEN TİMOKİNON'UN ETKİSİ

### THE EFFECT OF THYMOQUINONE ON EXPERIMENTAL MODEL OF ALLERGIC CONJUNCTIVITIS

Tolga Kocatürk<sup>1</sup>, Ayşe İpek Akyüz Ünsal<sup>1\*</sup>, Ceren Günel<sup>2</sup>, Buket Demirci<sup>3</sup>, İbrahim Meteöğlu<sup>4</sup>,  
 Harun Çakmak<sup>1</sup>, İmran Kurt Ömürlü<sup>5</sup>

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, <sup>4</sup>Patoloji Anabilim Dalı, <sup>5</sup>Biyostatistik Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

**ORCID iD:** Tolga Kocatürk: 0000-0001-5187-227X; Ayşe İpek Akyüz Ünsal: 0000-0001-5260-674X; Ceren Günel: 0000-0002-1760-6397; Buket Demirci: 0000-0002-3442-5061; İbrahim Meteöğlu: 0000-0001-5367-0495; Harun Çakmak: 0000-0003-3728-6009; İmran Kurt Ömürlü: 0000-0003-2887-6656

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ayşe İpek Akyüz Ünsal, e-posta / e-mail: [ipekunsal@yahoo.com](mailto:ipekunsal@yahoo.com)

Geliş Tarihi / Received: 25.07.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 13.11.2019

Yayın Tarihi / Published: 12.01.2020

### Öz

**Amaç:** Alerjik konjunktivit tedavisi güç bir hastalıktır; yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada anti-inflamatuar ve anti-alerjik özellikleri olan ve çörek otundan (*Nigella Sativa*) elde edilen timokinonun (TK) sıçan alerjik konjunktivit (AK) modeli üzerindeki etkisinin histolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya 48 adet 4-6 aylık yetişkin Wistar Albino dişi sıçan dahil edildi. Sıçanlar; kontrol, AK, AK+Deksametazon, 10 mg/kg TK, AK+3 mg/kg TK ve AK+10 mg/kg TK şeklinde rastgele 6 gruba ayrıldı. AK geliştirmek için, 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> ve 0,3 mg Ovalbumin, serum fizyolojik içinde her sıçana 1 mL intraperitoneal (i.p.) olarak gün aşırı 7 kez uygulandı. Ardı sıra 15-21. günlerde doğrudan konjunktiva üzerine serum fizyolojik içinde %2'lik Ovalbumin 7 kez damlatıldı. Ait olduğu gruba göre TK ilgili dozlarda i.p. olarak uygulandı. Konjunktiva dokusu mast hücre sayıları (MHS) ile histopatolojik ve immünohistokimyasal MCT, TGFβ ve TNFα boyama sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Timokinonun tek başına sistemik uygulanması konjunktiva histolojisinde değişikliğe neden olmadı. Ovalbümünle duyarlı hale getirilen AK grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, konjunktiva epitelindeki MHS istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ( $p<0,001$ ). Deksametazon tedavisi grubunda ( $p<0,001$ ) olduğu gibi; TK tedavi gruplarında da MHS, AK grubuna göre daha düşük bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. TGF-β ile negatif boyanma, TNF-α ile zayıf fokal boyanma tedavi gruplarının ortak bulgusu olarak saptandı.

**Sonuç:** Bu çalışmadaki doz ve sürelerle uygulanan ovalbümün, deneysel çalışmalar için uygun bir AK modeli oluşturmaktadır. Timokinonun uygulanan dozlarda yan etki oluşturmadığı ve AK gelişen durumlarda da kısmen anti-inflamatuar yönü ile tedaviye destek olabileceği, ancak istenen anti-alerjik etkiyi göstermediği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alerjik konjunktivit modeli, çörek otu, timokinon

### Abstract

**Objective:** Treatment of allergic conjunctivitis is challenging and new treatment modalities are required. In this study; the effect of Thymoquinone (TK), a natural derivative of *Nigella Sativa* with its anti-allergic and anti-inflammatory properties, was investigated on an experimental rat model of allergic conjunctivitis (AK).

**Methods:** Forty-eight female Wistar Albino rats aging between 4-6 months were included in this study. Rats were divided into 6 groups as following: control, AK, AK + Dexamethasone, 10 mg/kg TK, AK + 3 mg/kg TK and AK + 10 mg/kg TK. To induce an AK rat model, Ovalbumin (0.3 mg) and Al(OH)<sub>3</sub> (30 mg/ml) in 1 ml of %0.9 NaCl were given 7 times intraperitoneally (i.p.) to each rat every other day. Ovalbumin drops (2%) were installed everyday between 15<sup>th</sup>-21<sup>th</sup> days directly on conjunctiva. TK was applied i.p. with above mentioned doses. Tissue Mast Cell Counts (MCC) and histopathological - immunohistochemical staining results were statistically evaluated.

**Results:** Systemic administration of Thymoquinone alone did not demonstrate any detrimental effect on eye tissues. MCC of Ovalbumin sensitized AK group was significantly higher than the control cases ( $p<0,001$ ). Similar to dexamethasone treated group ( $p<0,001$ ), MCC of TK treated group was lower than AK groups, but the difference was not statistically significant. As a common finding in all treatment groups weak focal TGF-β staining and negative TNF-α staining have been determined.

**Conclusion:** Administration of Ovalbumin using aforementioned way creates a proper AK model. TK is a safe non-allergic herbal product and may have a supplementary role in AK treatment by its anti-inflammatory effect but unfortunately, it has not reached remarkable anti-allergic effect.

**Keywords:** Allergic conjunctivitis model, *Nigella sativa*, thymoquinone

## Giriş

Alerjik konjonktivit (AK) sık karşılaşılan ve uzun dönem tedavisi güç bir hastalık olması nedeniyle yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Hafif mevsimsel AK'den vernal keratokonjonktivite kadar farklı formlarda karşımıza çıkabilmektedir. Mast hücreleri, T lenfositleri ve eozinofillerden salınan histamin, sitokin ve kemokinler ile immünglobulin E'ye (IgE) bağlı Tip 1 hipersensitivite reaksiyonu AK patogeneğinde yer almaktadır.<sup>1,2</sup> Histamin ve inflamatuvar mediatörlerin salınımına bağlı sulanma, kaşıntı, fotofobi ve bulanık görme, konjesyon, silier ejeksiyon, ödem gibi semptom ve bulgular ile kendini göstermektedir. Ayrıca TNF- $\alpha$  gibi sitokinler limbal kök hücre yetmezliği, korneal neovaskülarizasyon, pannus ve keratokonus gelişimine neden olabilir.<sup>3-5</sup> Alerjik konjonktivitin giderek artan sıklıkta görüldüğü ve görmeyi tehdit edebilecek komplikasyonları olduğu düşünüldüğünde, tedavisinin son derece önemli olduğu ortadadır.<sup>5-8</sup>

Hafif seyreden AK vakalarında genellikle anti-histaminikler, mast hücre stabilizatörleri ve non-steroid anti-inflamatuvar damlalar tercih edilirken, ağır vakalarda steroidler kadar etkili olmasa da siklosporin A ve daha ağır olgularda da deksametazon ve prednizolon içerikli kortikosteroid damlalar kullanılmaktadır.<sup>7,8</sup> Kortikosteroidler etkinliğini kanıtlamış bir tedavi seçeneği olmasına rağmen, enfeksiyonlara zemin yaratabileceği, katarakt ve glokom gelişimine neden olabileceği için AK tedavisinde yeni tedavi alternatiflerine ihtiyaç vardır. Günümüzde bitkisel ürünler birçok hastalığın tedavisinde ilgi çekmeye başlamıştır. Bu çalışmada kanser, sepsis, ateroskleroz ve diabet gibi hastalıklar üzerinde antiinflatuar ve antioksidan özellikleri gösterilmiş olan *Nigella Sativa* (çörek otu)'dan elde edilen Timokinon (TK) isimli bitkisel ajanın<sup>9,10</sup>, olası anti-alerjik etkileri deneysel AK modeli üzerinde değerlendirildi.

Bu çalışmada deneysel AK modeli, alerjik rinitte kullanılan deneysel bir model farklılaştırılarak oluşturuldu. Ayrıca olumlu özellikleri ile dikkat çeken TK'nun öncelikle sağlıklı bir gruba tek başına yüksek doz (10mg/kg) uygulayarak güvenli olup olmadığı, sonrasında da AK üzerindeki olası etkinliği doza bağımlı olarak araştırıldı.

## Yöntem

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul (HADYEK 2014/097) izni alındıktan sonra, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Ünitesi Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

Sıçanların sensitizasyonu için, gün aşırı olmak üzere intraperitoneal (i.p.) 1 ml serum fizyolojik içinde adjuvan olarak 30 mg/ml Al(OH)<sub>3</sub> (Sigma, İnterlab, İstanbul) ve 0,3 mg ovalbumin (OVA; Sigma, İnterlab, İstanbul) 7 kez uygulandı. Ardısıra, AK modeli oluşturmak için 7 gün boyunca her gün her iki gözün konjonktivalarına izotonik içinde %2'lik OVA solüsyonu damlatıldı. Model oluşturulduktan sonra izotonik, deksametazon (Dekort® amp, Deva İlaç San. Tic ve Ltd. Şti, İstanbul) ve TK (Sigma cat. no: 274666, İnterlab, İstanbul) tedavileri i.p. uygulandı. Gelecek çalışmalara referans olması için çalışmamızda TK'nun standardize ekstraktı hazır satın alınarak kullanıldı. Bu AK modeli daha önceki allerjik rinit modellerinden modifiye edilerek oluşturulmuş oldu.<sup>11-13</sup> Bu çalışmada Wistar Albino cinsi sıçanlar ovalbumin ile sensitize edilebildiklerinden ötürü, bizim çalışmamızda da alerjik konjonktivit modeli oluşturabilmek için aynı tür sıçanlar

kullanılmıştır.<sup>13</sup> Kırk sekiz adet 4-6 aylık yetişkin Wistar Albino dişi sıçan, rastgele 6 gruba ayrıldı. Her bir gruba uygulanan ilaçlar aşağıda ayrıntısıyla belirtilmiştir:

### Kontrol Grubu

Serum fizyolojik (SF) içinde 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> her sıçana 1 mL intraperitoneal (i.p.) olarak gün aşırı 7 kez uygulandı. Her iki göze 15-21. günler arasında 7 gün boyunca 7 kez SF damlatıldı.

### Alerjik Konjonktivit (AK) Grubu

Alerjik Konjonktivit geliştirmek için, 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> + 0,3 mg ovalbumin (OVA), 1 ml SF içinde her sıçana i.p. gün aşırı 7 kez uygulandı. Göze 15-21. günler arasında SF içinde %2'lik OVA 7 kez damlatıldı.

### Alerjik Konjonktivit+Kortikosteroid (KS+AK) Grubu

Bu grup çalışmaya pozitif kontrol grubu olarak eklenmiştir. Her sıçana gün aşırı 7 kez 1 ml SF içinde 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub>+0,3 mg OVA i.p. uygulandı. Sensitizasyon döneminden sonra, 15-21. günlerde %2'lik OVA, SF içinde 7 kez göze damlatılırken, eş zamanlı olarak sıçanlara potent bir kortikosteroid (KS) olan deksametazon (Dekort® amp, Deva İlaç San. Tic ve Ltd. Şti, İstanbul) 1 mg/kg dozunda 7 gün boyunca her gün i.p. olarak enjekte edildi.

### Timokinon (TK) grubu

Bu grupta yüksek doz TK'nun (Sigma cat. no: 274666, İnterlab, İstanbul) sağlıklı dokular üzerindeki etkisi değerlendirildi. Her sıçana gün aşırı 7 kez 1 ml SF içinde 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> i.p. uygulandı. Göz damlası olarak 15-21. günlerde 7 kez sadece SF uygulanırken, eş zamanlı 7 gün boyunca her gün 10 mg/kg dozunda i.p. TK enjeksiyonu yapıldı.

### Alerjik Konjonktivit+Timokinon 3 (TK3+AK) Grubu

Bu grupta düşük doz TK'nun alerjik konjonktivitteki etkisi değerlendirildi. Her sıçana gün aşırı 7 kez 1 ml SF içinde 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> + 0,3 mg OVA, i.p. uygulandı. Sensitizasyon döneminden sonra, 15-21. günlerde %2'lik OVA SF içinde 7 kez göze damlatılırken, aynı zamanda 3 mg/kg TK, 7 gün boyunca her gün i.p. enjekte edildi.

### Alerjik Konjonktivit+Timokinon 10 (TK10+AK) Grubu

Bu grupta yüksek doz TK'nun etkisi değerlendirildi. Her sıçana gün aşırı 7 kez 1 ml SF içinde 30 mg/ml adjuvan Al(OH)<sub>3</sub> + 0,3 mg OVA, i.p. uygulandı. Sensitizasyon döneminden sonra, 15-21. günlerde %2'lik OVA SF içinde 7 kez göze damlatılırken, aynı zamanda 10 mg/kg TK, 7 gün boyunca her gün i.p. enjekte edildi.

Çalışmanın bitimini takiben, Ketamin (5 mg/kg) ve Ksilazin (50 mg/kg) anestezisi altında sıçanlar dekapite edildi ve göz, doku katmanlarına ayrılmadan tümüyle çıkarılıp, hemen %10'luk nötral tamponlu formalin içine alındı.

### Histopatolojik İnceleme

Nötral tamponlu formalin (%10) ile tespit edilerek, rutin doku takibi sonrası parafin bloklara gömülü göz dokularından hazırlanan 4  $\mu$ m kalınlığındaki kesitlere, hematoksilen eozin (HE)<sup>14</sup> Toluidine Blue (TB) boyaları uygulandı. Bu kesitler arasından konjonktiva dokularını içeren preparatlardaki boyanma özellikleri değerlendirildi. Daha sonra ışık mikroskopu (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) altında X10, X20 ve X40'lık büyütmelelerde

değerlendirme yapıldı. Mast hücreleri, konjonktiva epitelinde en yoğun boyanma gösteren ardışık 3 büyük büyütme alanında (X400) sayıldı. En yoğun bulunan büyük büyütme alanındaki mast hücre sayısı kaydedildi.

### İmmunohistokimyasal Boyama

Bu çalışmada kullanılan Mast Cell Tryptase (MCT) alerjik reaksiyonlarda mast hücrelerinin degranülasyonunu gösterdiği, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) anti-inflamatuar rolü ve tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inflamasyonu ve alerjide doku hasarını gösterdiği için tercih edilmiştir. İmmunohistokimyasal boyama DAKO Autostainer Universal Staining System (Autostainer Link 48 DAKO, Glostrup, Denmark) kullanılarak yapıldı. İlk önce 4  $\mu$ m kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü lamlara alındı. Daha sonra ksilol ile deparafinize edilen kesitler etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında 96°C'de (10 mM/L citrate buffer, pH 6) 40 dakika termostatik banyoda (PT Link) antiijen retrieval yapıldı. Kesitler anti-MCT (prod. no: M705229, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-TNF- $\alpha$  (prod. no: ab9739, Abcam, Cambridge, MA, USA) ve anti-TGF- $\beta$  (prod. no: ab92486, Abcam, Cambridge, MA, USA) ile 60 dakika inkübe edildi Streptavidin-biotin immunoperoxidase teknik ile (K8000 Envision Flex, DAKO, Glostrup, Denmark) otomatize sistem kullanıldı. Renk verecek görüntüyü sağlamak için Diaminobenzidin tetraklorid (DAB) ile immuno reaksiyonlar gösterildi. Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kaplandı. Pozitif boyandığı bilinen dokular ile pozitif kontrol değerlendirmesi yapıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine normal tavşan IgG kullanılarak uygulandı.

### İmmunohistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi

Boyanma aşamasından sonra konjonktival kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında X4, X10, X20 ve X40'luk büyütme alanlarında, tek bir patoloğ tarafından (İM) incelendi. İmmun boyanma skorlaması, inflamatuvar hücrelerin boyanma yoğunluğu ve boyanan mast hücre yüzdeleri temelinde yapıldı. Boyanma yoğunluğu; 0 ile +3 arasında değişen şekilde (boyanma yok:0, hafif şiddette:+1, orta şiddette:+2, yoğun:+3) skorlandı. Boyanan hücre yüzdesi de benzer şekilde; boyanma yok: 0, <%25'in altında boyanma: +1, %25-50 boyanma:+2, >%50'nin üzerinde boyanma:+3 olarak skorlandı. Boyanma yoğunluğu skoru (0-3) ile boyanan hücre yüzdesi skoru (0-3) toplanarak toplam skor (0-9) elde edildi. Bu toplam skora göre: 0= negatif (0), 1-2= zayıf (1), 3-6= orta (2), 7-9= güçlü (3) olmak üzere tüm immunohistokimyasal boyanma skorları belirlendi.

### Verilerin Analizi

Gruplar arası karşılaştırma Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler "ortalama $\pm$ standart sapma" şeklinde sunuldu. İstatistiksel olarak *p* değerinin 0,05'in altında olması anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Oluşturulan AK modeli ve tedavi gruplarında HE ve Toluidin Blue ile boyamalarda konjonktivada mast hücre sayısı gruplara göre şu şekildeydi: Kontrol grubunda 1,42 $\pm$ 0,53; AK grubunda 6,42 $\pm$ 0,97; KS+AK grubunda

1,85 $\pm$ 0,69; TK grubunda 3,43 $\pm$ 0,97; TK3+AK grubunda 3,00 $\pm$ 0,57; TK10+AK grubunda 3,28 $\pm$ 0,48. Gruplar arası karşılaştırmalarda sadece kontrol grubu ile AK grubu ve AK ile KS+AK grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü (*p*<0,001). Timokinon tedavi gruplarında mast hücre sayısındaki azalma kontrol grubu değerlerine ulaşmadığı için, TK ile tedavi istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p*>0,05). Gruplara göre mast hücre sayıları ve gruplar arası karşılaştırma Çizelge 1'de sunulmuştur.

Alerjik konjonktivit grubunda güçlü MCT boyanması (1c), TGF- $\beta$  ile negatif (1d) ve TNF- $\alpha$  ile fokal boyanma görülürken (1e), KS ve TK tedavisi alan gruplarda ise zayıf MCT boyanması (1m,r) görülmekteydi. Çizim 1o ve 1t'de gösterildiği üzere tüm tedavi gruplarında TNF- $\alpha$  ile zayıf fokal boyanma ortak bulgu olarak gözlemlendi. Alerjik konjonktivit grubundaki konjonktiva epitelindeki yıkım TGF- $\beta$  ile diffüz boyanma (Çizim 1i) şeklinde kendini gösterirken, tedavi gruplarında (Çizim 1n ve 1s) doku bütünlüğünün kaybolmadığını gösterecek şekilde zayıf boyanma gerçekleşti. Tek başına TK'un 10 mg/kg dozunda verilmesi ile konjonktivada histopatolojik olarak olumsuz herhangi bir etki oluşmadı (Çizim 1 u-z).

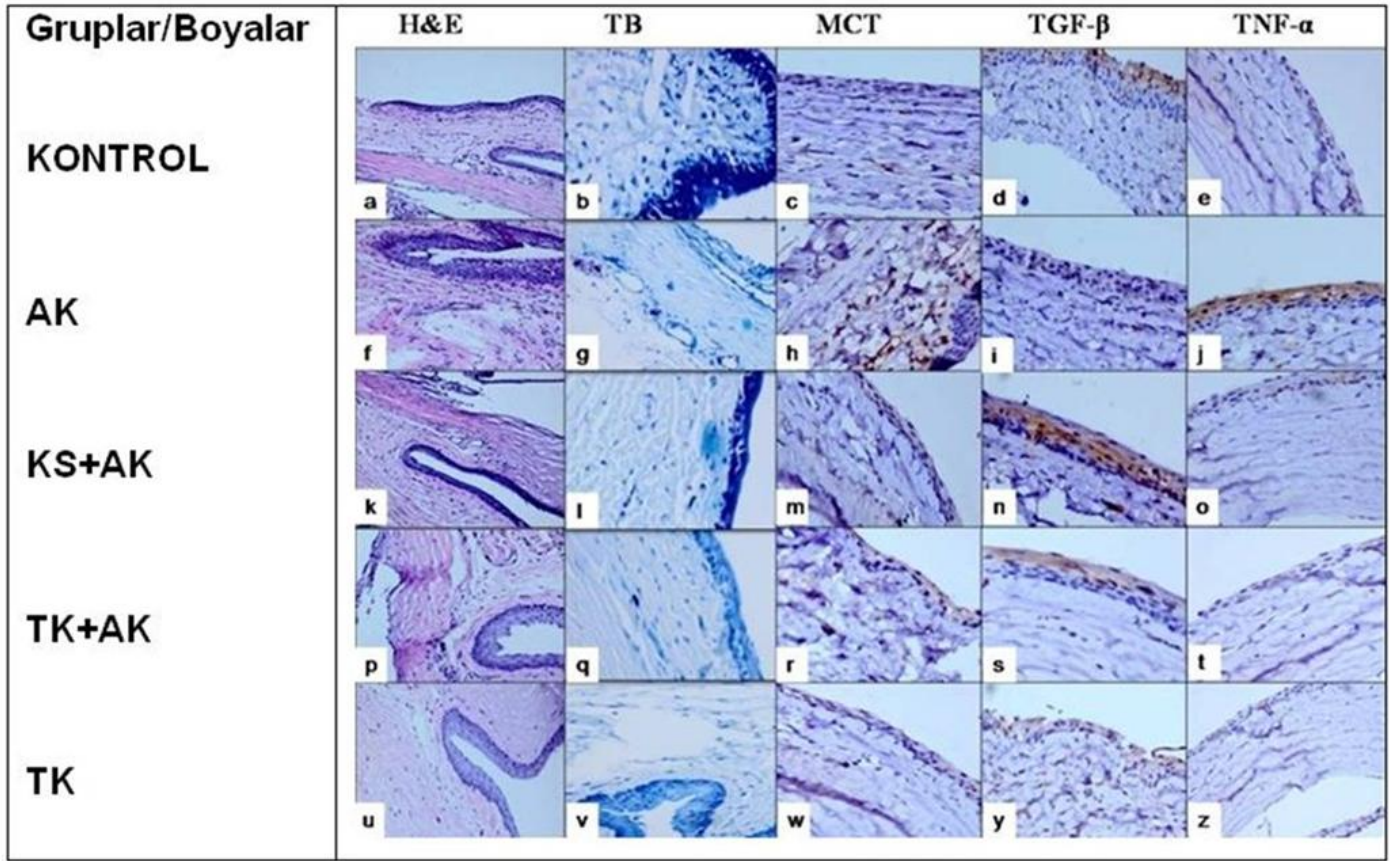
**Çizelge 1.** Mast hücre sayılarına göre gruplar arası Post-hoc karşılaştırma

Birinci Grup	Karşılaştırılan Gruplar		MHS $\pm$ SD	P
	MHS $\pm$ SD	İkinci Grup		
<b>Kontrol</b>	<b>1,42<math>\pm</math>0,53</b>	<b>AK</b>	<b>6,43<math>\pm</math>0,97</b>	<b>&lt;0,001</b>
Kontrol	1,42 $\pm$ 0,53	TK	3,43 $\pm$ 0,97	0,051
Kontrol	1,42 $\pm$ 0,53	TK3+AK	3,00 $\pm$ 0,57	0,015
Kontrol	1,42 $\pm$ 0,53	TK10+AK	3,28 $\pm$ 0,48	0,004
Kontrol	1,42 $\pm$ 0,53	KS+AK	1,85 $\pm$ 0,69	0,417
AK	6,42 $\pm$ 0,97	TK	3,43 $\pm$ 0,97	0,035
AK	6,42 $\pm$ 0,97	TK3+AK	3,00 $\pm$ 0,57	0,009
AK	6,42 $\pm$ 0,97	TK10+AK	3,28 $\pm$ 0,48	0,032
<b>AK</b>	<b>6,42<math>\pm</math>0,97</b>	<b>KS+AK</b>	<b>1,86<math>\pm</math>0,69</b>	<b>&lt;0,001</b>
TK	3,43 $\pm$ 0,97	TK3+AK	3,00 $\pm$ 0,57	0,615
TK	3,43 $\pm$ 0,97	TK10+AK	3,28 $\pm$ 0,48	0,973
TK	3,43 $\pm$ 0,97	KS+AK	1,85 $\pm$ 0,69	0,019
TK3+AK	3,00 $\pm$ 0,57	TK10+AK	3,28 $\pm$ 0,48	0,639
TK3+AK	3,00 $\pm$ 0,57	KS+AK	1,85 $\pm$ 0,69	0,067
TK10+AK	3,28 $\pm$ 0,48	KS+AK	1,85 $\pm$ 0,69	0,021

MHS: Mast hücre sayısı, SD: Standart deviasyon, AK: Alerjik konjonktivit modeli oluşturulan grup, TK: Timokinon pozitif kontrol grubu, TK3+AK: 3 mg/kg TK ile tedavi edilen AK grubu, TK10+AK: 10 mg/kg TK ile tedavi edilen AK grubu, KS+AK: 1 mg/kg Deksametazon ile tedavi edilen AK grubu

### Tartışma

Alerjik konjonktivit kaşıntı, yanma, batma ve sulanma gibi rahatsız edici semptomların yanı sıra, keratokonusden korneal perforasyona varabilen ciddi komplikasyonları olması sebebiyle yakın takip ve düzenli tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır. Artan çevre kirliliği ile birlikte tüm dünyada en sık görülen hastalıklardan biri olması sebebiyle AK tedavisinde, lokal kullanılmasına rağmen katarakt ve glokom gibi önemli yan etkileri olan kortikosteroidlere alternatif olabilecek ajanlara ihtiyaç vardır. Yeni tedavi ajanlarını denemek ve geliştirmek açısından da deneysel olarak alerjik konjonktivit modeli geliştirilmesi önemlidir. Çalışmamızda sıçanlarda AK modeli oluşturmak için iki farklı araştırmacı grubunun deneysel modelini örnek aldık. Bu çalışmalarda, OVA ve adjuvan olarak Alüminyum Hidroksit (AlOH<sub>3</sub>) birlikte i.p. olarak 7 kez gün aşırı veril-



**Çizim 1:** AK: Alerjik konjonktivit, KS+AK: Dekametazon tedavi grubu, TK+AK: Timokinon tedavi grubu, TK: Timokinon grubu, H&E: Hemotoksilen-eozin, TB: Toluidin blue, MCT: Mast cell triptase, TGF- $\beta$ : Transforming growth factor- $\beta$ , TNF- $\alpha$ : Tumour necrosis factor- $\alpha$ .

Çalışma gruplarında patolojik kesitlerde boyanma paternleri. Kontrol grubunda HE ve Toluidin Blue boyalarında çok az sayıda mast hücre (a-b), immunhistokimyasal MCT, TGF- $\beta$  ve TNF $\alpha$  ile zayıf fokal boyanmalar (c-e), AK grubunda HE ve Toluidin Blue boyalarında artmış mast hücre varlığı (f-g), immunhistokimyasal MCT ile güçlü, TGF- $\beta$  ile negatif ve TNF $\alpha$  ile zayıf fokal boyanmalar (h-j), KS+AK grubunda HE ve Toluidin Blue boyalarında az sayıda mast hücre varlığı (k-l), immunhistokimyasal MCT, TGF- $\beta$  ve TNF $\alpha$  ile zayıf fokal boyanmalar (m-o), TK+AK grubunda HE ve Toluidin Blue boyalarında az sayıda mast hücre varlığı (p-q), immunhistokimyasal MCT ile güçlü, TGF- $\beta$  ile negatif ve TNF $\alpha$  ile zayıf fokal boyanmalar (r-t), TK-10 gruplarında benzer şekilde HE ve Toluidin Blue boyalarında az sayıda mast hücreleri (u-v), immunhistokimyasal MCT ve TNF $\alpha$  ile zayıf fokal boyanmalar TGF- $\beta$  ile negatif boyanma (w-z) izleniyor.

Büyütme değerleri: a,f,k,p,u (X100, HE), b,g,l,q,v (X100, TB), diğer resimler X200" büyütmedir.

miş; daha sonra sensitize edilen sıçanlar, 15. günden itibaren her gün olmak şartıyla, 7 gün boyunca OVA içeren burun damlası her iki burun deliğine damlatılarak burunda enflamasyon modeli geliştirilmiştir.<sup>11,12</sup> Bu çalışmada ise, benzer şekilde sıçanlar duyarlı hale getirildikten sonra, göze 7 gün boyunca %2'lik OVA damlatılarak AK modeli oluşturuldu. Alerjik konjonktivit grubunda artan mast hücre sayısı, güçlü mast hücre triptaz ve TNF- $\alpha$  boyanmalarının saptanması nedeniyle ile bu protokolün deneysel AK modeli geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca tüm bu bulguların standart tedavi olan kortikosteroid uygulaması ile kontrol altına alınabilmesi de modelimizin başarılı olduğunu ortaya koymuştur.

Timokinon son zamanlarda literatürde immün sistemi etkilediği öne sürülen bir gıda takviyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte taraftan, TK'nun i.p. olarak uygulamada erkek sıçanlarda 22,5 mg/kg dozunda, dişi sıçanlarda ise 15 mg/kg dozunda toksik bulgular geliştirdiği; oral uygulamada ise tek seferlik maksimum tolere edilebilecek dozun 100 mg/kg olduğu ileri sürülmüştür.<sup>15</sup> Bir başka çalışmada TK sıçan LD<sub>50</sub> dozunu i.p uygulamada 57,5 mg/kg olarak belirlenmiştir.<sup>16</sup> Bu nedenlerle çalışmamızda, söz konusu literatürlerde belirtilen doz aralığında kalarak, 7 gün boyunca sağlıklı hayvanlara 10 mg/kg/gün i.p. uygulayarak, bu dozda TK'nın mast hücre sayısında ya da inflamasyonu gösteren parametrelerde artışa neden olmadığı, yan etkiler

göstermediğini, başka bir deyişle güvenli olduğunu tespit ettik.

Mevcut çalışmamızda geliştirdiğimiz AK modelinde, TK'yi düşük doz olarak 3 mg ve yüksek doz olarak da 10 mg i.p. uygulayarak iki farklı dozda göstereceği etkiye farklılık olup olmayacağını da araştırdık. Mevcut literatürde anti-alerjik olduğu söylenen TK'nın mast hücre sayısını azaltmadaki etkinliğini 1 mg/kg standart tedavi olan deksametazon ile kıyasladık. TK hem 3 mg/kg hem 10 mg/kg uygulamada mast hücre sayısını azaltmıştır, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve doza bağlı olarak da değişmemektedir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa dahi bu azalma fotofobi, epifora ve kaşıntı gibi hayvan deneylerinde tespit edilemeyecek klinik bulguları giderebileceği için günlük uygulamada önem taşıyabilir. Farelerde 3 mg/kg i.p. TK verildiğinde OVA ile oluşturulan alerjik astma modelinde İnterlökin-4 (IL-4), IL-5, IL-13 sitokin düzeylerinin azaldığı ve eosinofil infiltrasyonunu engellendiği<sup>17</sup>, ilave olarak 5-lipoksijenaz ürünlerinin oluşumunun ve lökotrien C4 sentezinin inhibe edildiği<sup>18</sup> gösterilmiştir. Literatürdeki bu bilgiye rağmen; çalışmamızda 7 günlük i.p. 3 ve 10 mg/ml dozunda TK tedavisi, AK modelinde konjonktiva dokuları üzerinde yeterli etki oluşturamamıştır. Ancak tedavi dozu ve süresi TK'un toksik olması göz önüne alınarak daha fazla artırılmamıştır.

Literatürde TK'un etkilerini konu alan başka çalışmalar da bulunmaktadır. Kurşun ile oluşturulan deneysel beyin hasarında, TK içme suyu ile 20 mg/kg olarak bir ay boyunca oral olarak verilmiş ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.<sup>19</sup> Bir başka çalışmada da 10 mg/kg içme suyu ile 5 gün oral alındığında Cisplatin nefrotoksitesine karşı koruyucu olduğu sonucuna varılmıştır.<sup>20</sup> Sıçanlarda oluşturulan akut solunum yetmezliği modelinin tedavisinde i.p. 6 mg/kg dozunda, adjuvan artrit modelinde ise oral 2,5 ve 5 mg'lık dozlarda kronik uygulamada; TNF- $\alpha$  ve IL-4 seviyesini azaltmada etkin olduğu belirtilmiştir.<sup>21,22</sup> Tüm bu çalışmalar, uygun dozlarda TK'un anti-inflamatuar özelliğine dikkat çekmektedir. Alerjik konjonktivit modeli oluşturduğumuz bu çalışmada da TNF- $\alpha$  boyanmasındaki azalma, önceki çalışmalar ile kısmen uyumludur. Kronik bir hastalık olan AK için oluşturduğumuz bu deneysel modelde, TK'nın gözdeki inflamasyonun derecesini azalttığına dair kanıtlar ortaya çıkması, TK'un gıda desteği olarak alınmasının, AK yönünden zararlı etkiler oluşturmayacağını, ancak yeterli anti-alerjik etki göstermediğini ve zayıf anti-inflamatuar etkisi bulunabileceğini düşündürmüştür.

### Kısıtlılıklar

Çalışmamızda rutin klinik uygulamalarda kullanılan topikal steroid ve mast hücre stabilizatörüne ait grupların olmaması kısıtlılık oluşturmuştur.

### Sonuç

Sonuç olarak, 15 günlük bir sensitizasyon döneminden sonra göze damlatılan OVA, deneysel çalışmalar için AK modeli oluşturmaktadır; 7 günlük 10 mg/kg TK tek başına uygulamada oküler dokular üzerinde yan etki oluşturmadığı görülmektedir. AK'de TK uygulaması ise doza bağımlı olmaksızın patolojik değerlendirmede aktif hastalık bulgularını azaltmada anti-inflamatuar özelliği yönünden kısmen etkili olmaktadır. Kortikosteroidler kadar etkili olmamasına rağmen AK tedavisinde yeri olan non-steroid anti-inflamatuar damlalar gibi TK'nın da anti-inflamatuar etkisinden yararlanılabilir.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması tarif eden herhangi bir kişi bulunmamaktadır.

### Etik Onay/Hasta Onamı

Etik onayı, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK/2014/097) alınmıştır.

### Maddi Destek

Bu çalışmada herhangi bir fon veya destekten yararlanılmamıştır.

### Yazar Katkıları

TK, AİAÜ, CG: Fikir; TK, AİAÜ, CG, BD, İM, HÇ, İKÖ: Tasarım; TK, AİAÜ, CG, BD, HÇ: Kaynakların toplanması ve/veya işlenmesi; TK, AİAÜ, İKÖ: Analiz ve/veya yorum; TK, AİAÜ, CG: Literatür taraması; TK, AİAÜ, CG, BD, İM, HÇ, İKÖ: Yazıyı yazan; TK, AİAÜ, CG, BD, İM, HÇ, İKÖ: Eleştirel inceleme

### Kaynaklar

1. Leonardi A, DeFranchis G, Zancanaro F et al. Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:3036-3040.

- Calder VL, Jolly G, Hingorani M et al. Cytokine production and mRNA expression by conjunctival T-cell lines in chronic allergic eye disease. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:1214-1222. doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00585.x
- Merdler I, Hassidim A, Sorkin N, Shapira S, Gronovich Y, Korach Z. Keratoconus and allergic diseases among Israeli adolescents between 2005 and 2013. *Cornea.* 2015;34:525-529. doi:10.1097/ICO.0000000000000416
- Nivenius E, Montan P. Spontaneous corneal perforation with atopic keratoconjunctivitis: a case series and literature review. *Acta Ophthalmol.* 2015;93:383-387. doi: 10.1111/aos.12617
- Naderan M, Rajabi MT, Zarrinbakhsh P, Bakhshi A. Effect of allergic diseases on keratoconus severity. *Ocul Immunol Inflamm.* 2017;25:418-423. doi: 10.3109/09273948.2016.1145697
- Solomon A. Corneal complications of vernal keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2015;15:489-494. doi:10.1097/ACI.0000000000000202
- La Rosa M, Lionetti E, Reibaldi M et al. Allergic conjunctivitis: A comprehensive review of the literature. *Ital J Pediatr.* 2013;39:1-8. doi:10.1186/1824-7288-39-18.
- Shaker M, Salcone E. An update on ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2016;16:505-510. doi: 10.1097/ACI.0000000000000299
- Schneider-Stock R, Fakhoury IH, Zaki AM, El-Baba CO, Gali-Muhtasib HU. Thymoquinone: Fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discov Today.* 2014;19:18-30. doi:10.1016/j.drudis.2013.08.021
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:443-451. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.029
- Wang W, Zheng M. Nuclear factor kappa B pathway down-regulates aquaporin 5 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268:73-81. doi: 10.1007/s00405-010-1282-3
- Xu YY, Liu X, Dai LB, Zhou SH. Effect of Tong Qiao drops on the expression of eotaxin, IL-13 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *J Chin Med Assoc.* 2012;75:524-529. doi: 10.1016/j.jcma.2012.07.003
- Günel C, Demirci B, Eryılmaz A, Yılmaz M, Meteöğlu İ, Ömürlü İK, Başal Y. Inhibitory effect of Pycnogenol® on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic rhinitis. *Balkan medical journal.* 2016; 33:620-626. doi: 10.5152/balkanmedj.2016.150057
- Unsal AIA, Basal Y, Birincioglu S, Kocaturk T, Cakmak H, Unsal A, Cakiroz G, Eliyatkin N, Yukselen O, Demirci B. Ophthalmic adverse effects of nasal decongestants on an experimental rat model. *Arquivos brasileiros de oftalmologia.* 2018;81:53-58. doi: 10.5935/0004-2749.20180012
- Abukhader MM. The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74:195-200. doi: 10.4103/0250-474X.106060
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008;20:25-27.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:1088-1095. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.006
- Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004;19:431-436. doi:10.1080/14756360400002072

19. Radad K, Hassanein K, Al-Shraim M, Moldzio R, Rausch WD. Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(1):13-17. doi:10.1016/j.etp.2013.07.002
20. Ulu R, Dogukan A, Tuzcu M et al. Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:1675-1679. doi:10.1016/j.fct.2012.02.082
21. Isik AF, Kati I, Bayram I, Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: Thymoquinone. An experimental study in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;28:301-305. doi:10.1016/j.ejcts.2005.04.012
22. Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A. Effects of thymoquinone (volatile oil of black cummin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytother Res.* 2007;21:895-897. doi:10.1002/ptr.2143