

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL  
ALERJİK RİNİT MODELİNDE TOPİKAL  
İNTRANAZAL DOKSİSİKLİN ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET ÖZGÜR AVINÇSAL

İZMİR 2010

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL  
ALERJİK RİNİT MODELİNDE TOPİKAL  
İNTRANAZAL DOKSİSİKLİN ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET ÖZGÜR AVİNÇSAL

TEZ DANIŞMANI

PROF. Dr. ENİS ALPİN GÜNERİ

İZMİR 2010

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	5
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	6
1. Alerjik rinit.....	6
1. 1. Tanım ve insidans.....	6
1. 2. Etiyoloji.....	6
1. 3. Patoloji ve patofizyoloji.....	7
1. 3. 1. Antijen sunumu ve sensitizasyon.....	7
1. 3. 2. Ig E Sentezi.....	8
1. 3. 3. Erken faz yanıtı.....	8
1. 3. 4. Geç faz yanıtı.....	9
1. 4. Tanı yöntemleri.....	9
1. 4. 1. Anamnez.....	9
1. 4. 2. Fizik muayene .....	10
1. 4. 3. Laboratuvar, invitro testler.....	11
1. 4. 4. Laboratuvar, invivo testler.....	11
1. 5. Tedavi prensipleri ve tedavi yöntemleri.....	12
1. 5. 1. Alerjiden kaçınma ve korunma.....	12
1. 5. 2. İlaç tedavisi.....	13
2. Matriks metalloproteinazları.....	16
2. 1. Metalloproteinaz ailesi.....	16
2. 2. Metalloproteinazların yapısı.....	17
2. 3. Metalloproteinazlarının sınıflandırılması.....	18
2. 4. Metalloproteinazların Sentez, Sekresyon ve Aktivitelerinin Regülasyonu..	19
2. 4. 1. Transkripsiyonel regülasyon.....	19
2. 4. 2. Proenzimin aktivasyonu aşamasında düzenleme.....	19
2. 4. 3. Matriks metalloproteinaz enzim aktivitesinin inhibisyonu.....	20
3. Tetrasiklinler.....	20
3.1. Doksisisiklin.....	20

<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	23
1. Işık mikroskopik doku takip protokolü.....	27
1. 1. Hematoksilen-Eozin boyaması.....	28
1. 2. Alcian Blue-Peryodik Asit Schiff (A/B/PAS) boyaması.....	30
1. 3. Hücre sayımı.....	32
2. İstatistiksel analizler.....	33
<b>BULGULAR</b> .....	34
1. Deneysel alerjik rinit modeli.....	34
2. Histolojik değerlendirme.....	37
2. 1. Silyum kaybı.....	39
2. 2. Goblet hücre artışı.....	39
2. 3. Vasküler konjesyon.....	40
2. 4. Vasküler proliferasyon.....	40
2. 5. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu.....	41
2. 6. Kondrositlerde hipertrofi.....	41
2. 7. Eozinofil infiltrasyonu.....	42
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	58
<b>KAYNAKLAR</b> .....	63

## **TABLO LİSTESİ**

- Tablo 1.** Mast hüresinden salgılanan mediatörler
- Tablo 2.** Matriks metalloproteinaz enzimlerinin sınıflandırılması
- Tablo 3.** Alerjik rinit skorlama yöntemi
- Tablo 4.** Rutin doku takibi
- Tablo 5.** Hematoksilen-Eozin boyama protokolü
- Tablo 6.** Alcian Blue-Periyodik Asit Schiff protokolü
- Tablo 7.** Ortalama hapşırma sayıları
- Tablo 8.** Ortalama burun kaşıma hareketi sayıları
- Tablo 9.** Nazal kavite septum ve lateral duvarlarının semikantitatif histolojik değerlendirme sonuçları
- Tablo 10.** Gruplandırılmış silyum kaybı bulguları
- Tablo 11.** Gruplandırılmış goblet hücre artışı bulguları
- Tablo 12.** Gruplandırılmış vasküler konjesyon bulguları
- Tablo 13.** Gruplandırılmış vasküler proliferasyon bulguları.
- Tablo 14.** Gruplandırılmış enflamatuar hücre infiltrasyonu bulguları
- Tablo 15.** Gruplandırılmış kondrosit hipertrofisi bulguları
- Tablo 16.** Gruplandırılmış eozinofil infiltrasyonu bulguları

## SEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Matriks metalloproteinaz enzimlerinin moleküler yapısı
- Şekil 2.** Matriks metalloproteinaz enzim aktivitesinin düzenlenmesi
- Şekil 3.** Materyaller ve ağırlıklarının tespiti için kullanılan hassas terazi
- Şekil 4.** Sıçanlarda intraperitoneal enjeksiyon uygulanması
- Şekil 5.** Mikropipet ile topikal intranazal uygulama yöntemi
- Şekil 6.** Deneysel alerjik rinit oluşturulması ve tedavi protokolünün zaman çizelgesi
- Şekil 7.** Sıçanların nazal kavitelerinin blok olarak çıkarılması
- Şekil 8.** Histolojik olarak değerlendirilen kesit ve insisiv papilla seviyesinden (T2) geçen kesit
- Şekil 9.** Ortalama hapşırma sayılarının karşılaştırılması
- Şekil 10.** Ortalama burun kaşıma hareketi sayısı
- Şekil 11.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 12.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 13.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 14.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 15.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 16.** Alerjik rinit grubu genel görünüm, vasküler proliferasyon, goblet hücrelerinde artış
- Şekil 17.** Alerjik rinit grubu genel görünüm, vasküler proliferasyon ve dilatasyon, kondrositlerde hipertrofi
- Şekil 18.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış
- Şekil 19.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış
- Şekil 20.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış
- Şekil 21.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış, enflamatuar hücre artışı
- Şekil 22.** Alerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış
- Şekil 23.** Alerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış ve vasküler konjesyon
- Şekil 24.** Alerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış ve vasküler konjesyon
- Şekil 25.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış
- Şekil 26.** Alerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış
- Şekil 27.** Tedavi grubu genel görünüm
- Şekil 28.** Tedavi grubu genel görünüm
- Şekil 29.** Tedavi grubu genel görünüm

- Şekil 30.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 31.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 32.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 33.** Kontrol grubu genel görünüm
- Şekil 34.** Alerjik rinit grubu genel görünüm
- Şekil 35.** Alerjik rinit grubu goblet hücrelerinde artış
- Şekil 36.** Alerjik rinit grubu goblet hücrelerinde artış
- Şekil 37.** Tedavi grubu genel görünüm
- Şekil 38.** Tedavi grubu genel görünüm
- Şekil 39.** Tedavi grubu genel görünüm
- Şekil 40.** Tedavi grubu genel görünüm

## KISALTMALAR

<b>AB/PAS:</b>	Alcian Blue-Periyodik Asit Schiff
<b>Al (OH)<sub>3</sub>:</b>	Alüminyum hidroksit
<b>AR:</b>	Alerjik rinit
<b>ASH:</b>	Antijen sunan hücreler
<b>EGF:</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>ESM:</b>	Ekstrasellüler matriks
<b>HE:</b>	Hemotoksilen-eozin
<b>ICAM-1:</b>	Hücrelerarası adezyon molekülü-1
<b>MHC:</b>	Majör histocompatibility complex
<b>MMP:</b>	Matriks metalloproteinazları
<b>OVA:</b>	Ovalbumin
<b>PAF:</b>	Trombosit aktive edici faktör
<b>PDGF:</b>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>SDD:</b>	Subantimikrobial doz doksisiklin
<b>TGF-beta:</b>	Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-beta
<b>ThO:</b>	Farklılaşmamış T hücreleri
<b>TIMP:</b>	Matriks metalloproteinazlarının spesifik doku inhibitörleri
<b>TNF-alfa:</b>	Tümör nekrozis faktör-alfa
<b>VCAM-1:</b>	Vasküler hücre adhezyon molekülü-1



## ÖZET

### **SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL ALERJİK RİNİT MODELİNDE TOPIKAL İNTRANAZAL DOKSİSİKLİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Mehmet Özgür Avinçsal

Dokuz Eylül Üniversitesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı

Matriks metalloproteinaz (MMP)'ları ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratan,  $Zn^{++}$  ve  $Ca^{++}$ 'a bağımlı bir nötral endopeptidaz ailesidir. Sentez, sekresyon ve aktivasyonları gen transkripsiyonu, latent enzim aktivasyonu ve spesifik doku inhibitörleri (TIMP) sayesinde düzenlenir. MMP'lerin TIMP dışında,  $Zn^{++}$  atomlarını bağlayarak inaktive olmalarına neden olan sentetik inhibitörleri de mevcuttur ve tetrasiklin gurubu bir antibiyotik olan doksisisiklin böyle bir ajandır.

Bu çalışmanın amacı toplikal intranazal doksisisiklinin, MMP'leri inhibe ederek alerjik rinitte görülen tipik semptomları ve enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltabileceğini göstermektir. Böylece MMP'lerin alerjik rinitteki etkilerini ve doksisisiklinin alerjik rinit tedavisindeki etkisini araştırarak tedavide alternatif bir seçenek olup olmayacağını değerlendirmektir.

Bu hedefe yönelik olarak yapılan çalışmada öncelikle dişi Wistar sıçanlarda intraperitoneal ovalbumin (OVA) enjeksiyonunu takiben tekrarlayan intranazal OVA uygulamaları ile deneysel bir alerjik rinit modeli oluşturuldu. Bu sıçanların bir kısmına intranazal OVA uygulamasından bir saat önce onbeş gün boyunca her gün toplikal intranazal doksisisiklin uygulandı. İnanazal uygulamalar sonrası nazal semptomlar gözlemlenerek skorlandı ve uygulamalar sonrasında bütün sıçanların nazal mukozaları hazırlanıp histolojik olarak değerlendirildi.

İnanazal doksisisiklin uygulamaları ile burun kaşıma, hapşırma gibi tipik alerjik rinit semptomlarının belirgin derecede azaldığı ve tekrarlayan intranazal OVA uygulamaları sonrası bu semptomlarda artış olmadığı belirlendi. Doksisisiklin tedavisi sonrası yapılan histolojik incelemelerde ise alerjik rinitte görülen tipik enflamatuvar değişiklikler saptanmadı.

Elde edilen sonuçlar MMP'lerin alerjik rinitte önemli fonksiyonları olan proteinazlar olduğunu: bir MMP inhibitörü olan doksisisiklinin, özellikle alerjik rinitin geç fazında

enflamatuar hücrelerin enflamasyon alanına gelmelerinde etkili olan MMP'leri inhibe ederek alerjik rinitte alternatif bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel alerjik rinit, matriks metalloproteinaz inhibitörleri, doksisisiklin

## **SUMMARY**

### **THE EFFECTS OF TOPICAL INTRANASAL DOXYCYCLINE TREATMENT IN THE RAT ALLERGIC RHINITIS MODEL**

Mehmet Özgür Avınçal, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Dokuz Eylül University Medical School, İzmir, Turkey

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc and calcium dependent endopeptidases that play a key role in extracellular matrix (ECM) degradation. MMPs are regulated at multiple levels including gene transcription, activation of the latent enzyme and inactivation by specific tissue inhibitors (TIMPs). Synthetic inhibitors generally contain a chelating group which binds the catalytic Zn<sup>++</sup> atom at the MMP active site tightly. Doxycycline belongs to the tetracycline family which is a synthetic inhibitor of MMP activity in humans.

The aim of this study was to determine whether intranasal administration of doxycycline could relieve the typical symptoms of allergic rhinitis (AR) and attenuate the inflammatory cell infiltration by inhibition of MMPs. Thus, to elucidate the functions of MMPs in allergic rhinitis and evaluate whether doxycycline could be an alternative treatment in allergic rhinitis.

Allergic rhinitis was induced by intraperitoneal injection of OVA followed by its repeated intranasal instillation in female Wistar rats. Some AR animals were intranasally treated with topical intranasal doxycycline 1 hour before OVA intranasal instillation everyday for 15 days. Subsequently, nasal symptoms were evaluated. Finally, the nasal mucosae of all animals were prepared for histological assessment.

Doxycycline administration alleviated typical AR symptoms including nasal itching and sneezing, and subsequent intranasal repeated challenge with OVA did not trigger AR symptoms. After doxycycline treatment, inflammatory histological characteristics within the nasal mucosa of AR animals were absent.

These results indicate that MMPs play important roles in allergic rhinitis. Doxycycline may be useful for the treatment of allergic rhinitis by inhibition of MMPs by attenuating the inflammatory cell infiltration in the late phase of allergic rhinitis.

**Key Words:** Experimental allergic rhinitis, matrix metalloproteinase inhibitors, doxycycline

## GİRİŞ VE AMAC

Alerjik rinit, nazal mukozada bir enflamasyonla ortaya çıkan konjesyon, rinore, kaşıntı, hapşırma ve postnazal akıntı ile karakterize kronik bir üst solunum yolu hastalığıdır. Oluşması için herhangi bir alerjene maruz kalma ve bu alerjene karşı immunolojik duyarlılık gereklidir. Alerjik rinit prevalansı en yüksek olan kronik hastalıklardan biridir; tüm dünyada oldukça yaygın olup, toplumun % 10-25'ini etkilediği bildirilmektedir. Ancak bu rakamın gerçeği yansıtmadığı, semptomlarını hekime başvuracak kadar ciddiye almayan hastaların varlığı da göz önüne alınırsa alerjik rinitin daha yaygın bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Alerjik rinitin sıklığı da yıllar içinde giderek artmaktadır. Alerjik rinit tipik olarak 40 yaşından önce başlar, ortalama başlangıç 12-15 yaşlar arasındadır. Yaşam kalitesinde azalmaya neden olan bu kronik hastalık varlığında sinüzit ve otitis media insidansı artar, alerjik rinit astım gelişimi için de majör bir risk faktörüdür (1). Alerjik rinitin tedavisinde kullanılan ilaçlar topikal ve oral antihistaminikler, topikal ve oral kortikosteroidler, topikal ve oral dekonjestanlar, mast hücre stabilizatörleri, mukolitikler, antikolinergik ajanlar ve tuzlu su spreyleri şeklinde sıralanabilir (2).

MMP'ler nötral pH da aktif olan ve ESM'yi parçalayan, multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Sentez, sekresyon ve aktivasyonları gen transkripsiyonu, latent enzim aktivasyonu ve TIMP sayesinde düzenlenir(3). MMP'lerin TIMP dışında, Zn<sup>++</sup> atomlarını bağlayarak inaktive olmalarına neden olan sentetik inhibitörleri de mevcuttur ve tetrasiklin gurubu bir antibiyotik olan doksisisiklin böyle bir ajandır (4).

Bu çalışmanın amacı toplikal intranazal doksisisiklinin, MMP'leri inhibe ederek alerjik rinitte görülen tipik semptomları ve enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltabileceğini göstermektir. Böylece MMP'lerin alerjik rinitteki etkilerini ve doksisisiklinin alerjik rinit tedavisindeki etkisini araştırarak tedavide alternatif bir seçenek olup olamayacağını değerlendirmektir.

## **GENEL BİLGİLER**

### **1. ALERJİK RİNİT**

#### **1. 1. Tanım ve İnsidans**

Alerjik rinit, nazal mukozada enflamasyonla ortaya çıkan nazal konjesyon, rinore, kaşıntı, hapşırma ve postnazal akıntı ile karakterize kronik bir üst solunum yolu hastalığıdır. Oluşması için herhangi bir alerjene maruz kalma ve bu alerjene karşı immunolojik duyarlılık gereklidir. Alerjik rinit, atopik hastalıkların en sık görülen şeklidir.

Alerjik rinit tüm dünyada oldukça yaygın bir hastalıktır, toplumun % 10-25'ini etkilediği bildirilmektedir. Ancak bu rakamın gerçeği yansıtmadığı, semptomlarını hekime başvuracak kadar ciddiye almayan hastaların varlığı da göz önüne alınırsa alerjik rinitin daha yaygın bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Yaygınlığı yanı sıra alerjik rinitin sıklığı yıllar içinde giderek artmaktadır. Alerjik rinit tipik olarak 40 yaşından önce başlar ve ortalama başlangıç yaşı 12-15 arasındadır. Çalışmalar çocukların % 10'unun, adolesan çağındakilerin ise % 20-30'unun alerjik rinitli olduklarını göstermiştir. Aile öyküsü verenlerde insidans daha yüksek olup % 30-48 arasındadır.

#### **1. 2. Etiyoloji**

Alerjik rinitte çok çeşitli etyolojik ajanlar bildirilmiştir. Atopik alerjenlerden 5µ'dan küçük olanları distal uç bronşiollelere kadar ulaşabilir. Atmosferik inhalan alerjenlerin etki gösterebilmesi için iki özelliğe sahip olması gereklidir; birincisi spesifik antijen taşımaları, ikincisi ise mukozayı geçebilmeleridir.

Alerjenler spesifik IgE antikoru oluşumunu uyaran ve bu antikor ile reaksiyona giren antijenlerdir. Alerjenler genelde protein veya glikoprotein yapıdadır. Bir alerjen ekstraktının içinde çok sayıda antijen bulunmaktadır. Bu antijenlerin tümü duyarlılığa neden olmazlar, az sayıda hastada duyarlanmaya yol açanlar minör alerjenler olarak isimlendirilirler. Hastaların yarısından fazlasında duyarlanmaya neden olan alerjenler ise majör alerjenler olarak adlandırılırlar ve ekstraktın toplam ağırlığının % 1'ini oluştururlar.

Alerjenin immun duyarlanmaya neden olan, özel bir aminoasit dizilimi gösteren bölgesi epitop veya antijenik determinant olarak adlandırılır. Duyarlı kişilerde aynı alerjen molekülünün farklı epitoplarına yanıt oluşabilmektedir. Bu durum genetik olarak MHC (Majör Histocompatibility Complex) Class II genlerinin kontrolü altındadır. Alerjenler

solunum yolu, oral yol ya da parenteral yolla vücuda alınabilirler. Alerjenlerin hayvanlar, arılar, bitkiler, mantarlar ya da küçük molekül ağırlıklı kimyasal ajanlar gibi pek çok kaynağı bulunmaktadır.

Alerji etiolojisinde rol oynayan ajanlar; ev tozu ve akarları, polenler, mantarlar, bakteriler, besinler ve besin katkı maddeleri ile hava kirliliği olarak özetlenebilir.

### **1. 3. Patoloji ve Patofizyoloji**

Alerjik rinit, endüstrileşmiş toplumların yaklaşık % 20'sini etkilemekte ve hayat kalitesinin düşmesine sebep olmaktadır. Alerjik rinitli hastalarda akut sinüzit ve otitis media insidansı artmıştır; alerjik rinit astım gelişimi için de majör bir risk faktörüdür (1).

Alerjik rinitin patogenezinde; salınan mediatörlerin etkisi ile vazodilatasyon, vasküler permeabilite artışı, mukus artışı ve birçok enflamatuvar süreç yer alır.

Bu olayların oluşmasındaki basamaklar şunlardır:

1. Antijen sunumu,
2. T hücre farklılaşması,
3. Ig E sentezi,
4. Mast hücre degradasyonu (5).

#### *1. 3. 1. Antijen Sunumu ve Sensitizasyon*

Alerjik rinitin başlangıcında öncelikle vücut alerjene karşı sensitize olur. Solunum mukozası, pikogramdan nanogram boyutuna kadar polen, ev akarlarının dışkısı gibi birçok alerjene maruz kalmaktadır. Mukozada depo edilen antijenler burada bulunan Langerhans hücreleri ve antijen sunan hücreler (ASH) tarafından alınıp, proteolitik olarak 7-14 amino asitlik peptitlere bölünürler ve MHC-Class II denen moleküllerin antijen tanıma bölgelerine bağlanırlar. Bu ASH'ler T lenfositleri için dendritik hücreler, mononükleer fagositler, B lenfositler ve vasküler endotel hücreleridir.

ASH içinde endositoz olduktan sonra peptitler MHC II moleküllerine bağlanarak hücre yüzeyine taşınırlar. ASH'lerde daha sonra bölgesel lenf nodlarına taşınırlar. Tam olarak bilinmeyen bir noktada ASH tarafından farklılaşmamış T hücrelerine (Th0) antijen sunumu gerçekleşir. Atopik diyatezi olan kişilerde Th0 hücresinin reseptörleri ASH üzerindeki MHC II tarafından sunulan antijenik peptiti tanıyarak Th2 hücresine dönüşümü gerçekleşir. Bu dönüşüm sırasında birçok mediatör ve hücre görev yapmaktadır (5).

CD4 (T helper) aktive olarak, MHC II, CD28-B7 arasındaki etkileşim sonucunda Th2 hücrelerini oluşturur. CD4 hücresi IL2, IL18 varlığında Th1, IL4 varlığında ise Th2 hücrelerine farklılaşma gösterir. Th2 hücresi kendi karakteristik sitokinleri olan IL4, IL5, IL9, IL13, Gm-CSF salgılar. Burada görüldüğü gibi IL4, proatopik ortamı oluşturarak pozitif feedback etkisi oluşturmaktadır. Bu oluşumda sitokinler üç ana fonksiyonu yaparlar:

1. Atopi için uygun ortamın sağlanması,
2. Diğer immun yanıtların süpresyonu,
3. B hücrelerinden Ig E sentezinin stimülasyonu (5).

### *1. 3. 2. Ig E Sentezi*

T hücre yüzeyindeki CD3 ve T hücre reseptöründen oluşan kompleksin MHC II ile bağlanmasından sonra T hücre yüzeyinde süratle CD40 ligandı ortaya çıkar. Bu ligand, B hücre yüzeyinde daha önceden mevcut bulunan CD40 ile birleşir. Bu birleşme CD28 (T hücre) ve B7 (B hücre) arasındaki bağlantı ile daha güçlü bir hale gelir. CD28 ile B7 arasındaki bu bağlantı Th2 hücresinden IL4 salınımını da artırır (5).

B hücresinden Ig E salınımının başlaması için iki uyarı gereklidir. Bunlar IL4 ve CD40-CD40 ligandının oluşumudur. Bu uyarılardan sonra B hücresinde epsilon ağır zincir sentezi başlar. Alerjenle yapılan provokasyondan sonra erken ve geç faz reaksiyonu görülür (5).

### *1. 3. 3. Erken Faz Yanıtı*

Erken faz yanıtı, alerjene maruziyetten sonra dakikalar içinde başlar. Erken faz yanıtında başrolü mast hücresi oynar. Mast hücrelerinin degranülasyonu sonucunda, histamin, lökotrienler (cysteinil LT, LT C4, LT D4, LT E4), prostoglandinler (PGD2, PGI2, PGE2, PGF2 $\alpha$ ), kininler ve sitokinlerin salınımı ortaya çıkar. Bu fazın en belirgin semptomları burun tıkanıklığı, rinore, hapşırma ve burun kaşıntısıdır .

Bu yanıtta rol alan ve mast hücrelerinden salgılanan mediatörler Tablo 1'de görülmektedir.



Tablo. 1. Mast hücresinden salgılanan mediatörler

Bronkokonstriksiyon, Mukus sekresyonu, Ödem, Vazodilatasyon, Sinir stimülasyonu	Lökosit aktivasyonu	Lökosit migrasyonu	Lökosit adezyonu	Ig E sentezi
Histamin	IL 5	IL 5	IL 4	IL 4
PGD 2	IL 6	IL 6	IL 5	IL 13
LTC 4	TNF $\alpha$	TNF $\alpha$	LTC 4	
KİNİNLER	TRİPTAZ	TRİPTAZ	TNF $\alpha$	
KİMAZ	PAF	LTC 4 PAF		

Yücel T. Alerjik rinit fizyopatolojisi In: Önerci M. Alerjik rinosinüzitler. Ankara 116-122;2002'den alınmıştır.

#### 1. 3. 4. Geç Faz Yanıtı

Geç faz yanıtı, erken faz reaksiyonundan 4-8 saat sonra başlar. Bu fazda klinik olarak nazal mukozanın kalınlığının ve hava akımı rezistansının arttığı ve diğer nazal bulgularda minimal değişikliğin olduğu görülür (6). Geç fazdan eozinofiller, bazofiller, nötrofiller ve mononükleer hücreler sorumludur. İnterlökin, lökotrien ve PAF (trombosit aktive edici faktör) gibi mediatörler, enflamatuvar hücrelerin damar içinden interstisyel alana çıkışını indüklerler. Mukus hipersekresyonu, ödem, nazal konjesyon ve hava yolu hiperaktivitesi gibi enflamatuvar reaksiyonlar ortaya çıkar. Geç fazda başrolü eozinofiller oynar. Eozinofiller, sitokinlerin ve mediatörlerin yanında majör bazik protein (MBP) ve eozinofil katyonik protein (ECP), eozinofil peroksidaz (EPO), eozinofil kökenli nörotoksin gibi polipeptitleri de açığa çıkarırlar. Bu polipeptitler epitelyal hasara ve hücre ölümüne neden olurlar. Geç faz reaksiyonunda artış gösteren bir diğer hücre ise lenfositlerdir. CD4 T yardımcı hücrelerinde, CD4 CD45 T bellek hücrelerinde, hatta CD8 T sitotoksik hücrelerinde artış vardır (1).

### 1. 4. Tanı Yöntemleri

#### 1. 4. 1. Anamnez

Alerjik rinit tanısında anamnez hala önemini koruyan yöntemdir. Ataklar halinde gelen sabah hapşırımları ile beraber olan burun tıkanıklığı, burun akıntısı, gözlerde sulanma, kaşıntı ve kızarıklık, genizde ve damakta kaşıntı hissi alerjik rinitte belli başlı majör semptomlardır. Anamnez alınırken; semptomların zamanla ilişkisi (belli bir mevsimde ya da yıl boyu),

semptomların evde ya da dışarıda mı ortaya çıktığı, ev tozları, hayvanlarla temas, fiziksel değişiklikler (soğuk, sıcak, nem, hava kirliliği), sigara, egzersiz, yiyeceklerle olan ilişkisi araştırılmalıdır. Ailede atopi öyküsü, sık sinüzit atağı, sık otitis media atağı, geçirilmiş anafaktik reaksiyon sorgulanır ve alerjik hastalığa benzer semptomlar verebilen gebelik, hipertiroidizm, adenoid hipertrofi, septum deviasyonu gibi durumlar ayırt edilir (7).

#### *1. 4. 2. Fizik Muayene*

##### Göz belirti ve Bulguları:

- 1- Uzun, ipek gibi kirpikler,
- 2- Dennie – Morgan çizgileri: Alt göz kapağında venöz staza bağlı olarak oluşan horizontal çizgiler,
- 3- Konjonktivit, gözlerde yanma, kaşınma, sulanma,
- 4- Alerjik şiner: Alt göz kapağının altındaki derinin renginin koyulaşmasıdır. Alt göz kapağında görülen bu koyulaşmanın nedeni kronik venöz staza sekonder epidermiste hemosiderin toplanmasıdır .

##### Burun Belirti ve Bulguları:

- 1- Kaşıntı,
- 2- Alerjik selam: Alerji hastası, el ayası ile burun ucunu yukarı kaldırarak, hem burun kaşıntısını gidermeye çalışır, hem de bu hareket sayesinde nazal valv açısını genişleterek burun solunumunun rahatlamasını sağlar. Burun supratipinde çizginin oluşması için bu hareketin en az iki yıldır yapıyor olması gerekir.
- 3- Burun solunumunda güçlük,
- 4- Burun ucunda maserasyon, nazal kavitede seröz sekresyon,
- 5- Refleks olarak, yüz ve burun buruşturmak.

##### Ağız Belirti ve Bulguları:

- 1- Damak ve genizde kaşıntı,
- 2- Dental ark ve damakta gelişim hataları,
- 3- Ağız solunumu ve ağız açıklığı (Adenoid yüz),
- 4- Ağız açıklığına bağlı olarak tükürük asiditesinin artmasına bağlı diş çürümelere (7).

#### *1. 4. 3. Laboratuvar, İnvitro Testler*

##### Nazal Smear:

Nazal yayma, alerjik ve nonalerjik rinitlerin ayırıcı tanısında önerilen bir tanı yöntemidir. Burun akıntısı bir lam üzerine yayılarak Giemza boyası ile boyanır ve ışık mikroskopu ile incelenir. Eozinofil sayısı sayılan hücrelerin % 15'inden fazla ise nazal eozinofiliden bahsedilir. Sensitivitesi düşük fakat spesifitesi yüksek bir testtir.

##### Total Ig E Ölçülmesi:

IgE düzeyi alerjik hastaların, yaklaşık % 50'sinde normal bulunabilir, dolayısıyla bu testin tanısız değeri sınırlıdır. Total Ig E yüksekliği birçok durumda ortaya çıkabilir (viral enfeksiyonlar, parazitoz vs.). Fakat total Ig E değeri yüksek bulunan hastaların, ileri tetkikler ile IgE duyarlılıklarının araştırılması gereklidir (7).

##### Alerjen Spesifik Ig E:

Serum içindeki alerjen spesifik Ig E'nin tespitinde immunoradiometrik metodlar (RAST, F/N mRAST, ELISA, Chemiluminometrik analiz vb.) kullanılır. Wide ve arkadaşları tarafından tarif edilen RAST (Radio Allergo Sorbent Test) bu metodlar içinde en iyi bilinenidir. İnhalan alerjiler için RAST sisteminin sensitivitesi % 60-80 olup, spesifitesi % 90'dan fazladır. RAST testi pozitif ise hastaların büyük bir çoğunluğu Ig E sensitiftir.

Bebekler ve küçük çocuklar, Prick testinin yapılmasının mümkün olmadığı cilt değişiklikleri bulunan hastalar (nörodermatitis, eritrodermi, ürtiker, dermatografizm) ve azalmış cilt reaktivitesi olan hastalarda (yüksek dozda kortikosteroid, antihistaminik, immunosüpresif ilaç alanlar), primer alerji testi olarak deri testi yerine RAST yapılması gerekir (7).

#### *1. 4. 4. Laboratuvar, İnvivo Testler*

Bu testlerin temel esası, derideki hassaslaşmış mast hücrelerinin lokal bir alerjik cevabı başlatmak için spesifik bir alerjen ile indüklenmesidir. Alerjeni cildin hemen altına yerleştirerek oluşacak kabarıklık ve eritem reaksiyonunu gözlemeye dayanır. Bu teknik spesifik antijene karşı IgE antikor varlığında etkilidir.

##### Deri Testleri

Alerjik bir kişinin cildinde var olan alerjen spesifik IgE, değişik test yöntemleri kullanarak, kişinin alerjik olduğu alerjenle temas getirildiğinde, derideki temas noktasında, ortada bir kabarıklık ve çevresinde bir kızarıklık oluşur. Oluşan bu reaksiyonun sensitivitesi

ve spesifitesi uygulanan alerjenin konsantrasyonuna ve kullanılan cilt testi metoduna bağlıdır (7).

**a. Scratch test:** Bu yöntemde oldukça konsantre antijen solüsyonundan deri üzerine bir damla damlatılır ve sivri uçlu bir alet ile, damlanın içinden geçilerek, cildin yüzeysel tabakasında bir çizik yapılır. Derideki reaksiyon, 0 dan 4'e kadar olan bir skala ile değerlendirilir.

**b. Prick test:** Testin uygulanmasında, derinin üst tabakası, ucu sivri ve keskin olan bir alet (genellikle bir iğne) ile bir noktasından kaldırılır. Burada amaç cildi delip geçmek değil, cildin yüzeysel tabakasında bir çizik oluşturmaktır. Cildin çizilen bu noktası üzerine antijen solüsyonu damlatılır ve sonuçlar 15-20 dakika beklendikten sonra okunur. Cilt üzerinde oluşan kabarıklık ve kızarıklığın boyutları ölçülür ve kaydedilir. Sonuçlar pozitif (histamin) ve negatif (sulandırıcı ya da gliserin) kontrollerle karşılaştırılarak 0 dan 4'e kadar olan bir skala ile değerlendirilir (7).

**c. İntradermal testler:** Antijen ekstraları küçük miktarlarda deri içine enjekte edilir. İntradermal test, spesifik alerjik duyarlılığın tespitinde, scratch ve prick testlere oranla daha kesin sonuçlar verir. Test sonuçları 15-20 dakika içinde, endüzyonun çapına göre değerlendirilir. Sensitivitesi daha yüksektir, fakat daha fazla zaman alır, ağrı verir, yalancı pozitif reaksiyon riski ve anaflaksi riski fazladır (7).

## **1. 5. Tedavi Prensipleri ve Tedavi Yöntemleri**

Alerjik rinitte tedavi planlanırken her hasta ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Tedavi öncesinde hastanın tedaviye olan uyumu, tedavinin maliyeti, hastanın genel sağlık durumu değerlendirilmelidir. Alerjik rinit tedavisinde, sorumlu alerjenden korunma ilk ve en önemli adımdır. Korunma mümkün değilse veya yetersiz ise ilaç tedavisine geçilir. Aşılar tedavinin en son aşamasında, çevre kontrolünün ve uygun ilaçların yetersiz kaldığı durumlarda kullanılırlar.

### *1.5. 1. Alerjenden Kaçınma ve Korunma*

Alerjenden korunmada amaç alerjenle burun mukozasının temasının engellenmesine dayanır. Polenlerden korunmada, polen mevsiminde ev dışı aktiviteler kısıtlanmalıdır. Polen konsantrasyonu özellikle sıcak, kuru, rüzgarlı havalarda ve sabah erken saatlerde en yüksek seviyeye ulaşırken, soğuk ve nemli havalarda en düşük seviyeye iner. Ev içi alerjenlerden

korunmada; zamanın önemli kısmı ev içinde geçtiğinden, kontrolün ev içi alerjenleri olan ev tozu, mantar, hayvan ve hamam böceği atıklarını kapsamaları gereklidir. Akarlar için çevre kontrolü yatak takımları, kumaş kaplı mobilya, halı ve içi doldurulmuş oyuncaklar üzerine yoğunlaştırılmalıdır. Odalar sık sık havalandırılmalıdır. Kuş tüyü yastıklardan ve yünlü battaniyelerden kaçınılmalıdır. Yatak takımları için ev tozu akarları gelişimine izin vermeyecek özel sentetik kumaşlar kullanılabilir. Bunlar haftada bir 60 C<sup>0</sup> ısıda yıkanmalıdır. Akarisidler ev tozu akarları miktarını azaltabilir. Ev içinde mantar kaynağı olabilecek nemli ve ıslak alanlar kontrol edilmelidir. Ev içi hayvanlar uzaklaştırılmalıdır. Bu tedbirlerin yanında gerek ev içi, gerekse ev dışı hava kirliliğinin alerjik semptomları ve hasta rahatsızlığını artıracığı unutulmamalıdır. Bunun için aktif veya pasif sigara içiciliği önlenmeli, şehrin hava kirliliği olmayan bölgesinde oturulmalıdır.

### *1.5.2. İlaç Tedavisi*

Alerjik rinitin tedavisinde kullanılan ilaçlar topikal ve oral antihistaminikler, topikal ve oral kortikosteroidler, topikal ve oral dekonjestanlar, mast hücre stabilizatörleri, antikolinergik ajanlar ve tuzlu su spreyleri şeklinde sıralanır (2). İlaç tedavisini planlarken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar arasında hastanın yaşı, gebelik durumu, mesleği, birlikte bulunan hastalıkların ortaya konması; hastanın başlıca şikayetinin belirlenerek tedavinin buna göre yönlendirilmesi ve gerekirse ilaç kombinasyonlarına gidilmesidir. Ayrıca hastanın sosyo-ekonomik ve kültürel durumu göz önüne alınmalıdır.

### *Antihistaminikler*

Etki mekanizmaları histaminle kompetitif inhibisyona girip onun etkisini hızla azaltmaktır. Bu inhibisyon sonucu alerjik rinit semptomları olan hapşırma, burun akıntısı, burun kaşınması hafifler (8). Antihistaminikler, sedasyon yapıcı etkileri esas alınarak sedasyon yapan ve yapmayan olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bu etki, ilacın kan-beyin bariyerini geçiş hızına bağlıdır. Lipofilik olanlar bu bariyeri hızlı geçerler ve sedasyon yaparlar. Sedatif antihistaminikler santral sinir sistemindeki H1 reseptörlerine ilaveten muskarinik, kolinerjik, alfa adrenerjik reseptörlere de etki ederler ki bu etkiler antihistaminiklere ait diğer yan etkilerin sebebidir. Sedasyon yapmayanların ise lipofilik özellikleri azalmıştır ve kan-beyin bariyerini yavaş geçerler. Birinci kuşak adı verilen klasik antihistaminiklerin (klorfeniramin, difenhidramin, klemastin vb.) sedatif ve antikolinergik yan etkilere karşı ikinci kuşak

antihistaminiklerde (terfenadin, astemizol, loratadin, setirizin vb.) bu etkiler yok denecek kadar azdır.

Terfenadin ve astemizolün aşırı dozda kullanıldığında ventriküler aritmi yaptığı görülmüştür; bu durum EKG’de QT uzaması, ST çökmesi olarak görülür. Makrolid ve antifungal ilaç kullananlarda, terfenadin ve astemizol metabolizması kompetitif inhibisyona girerek bu antihistaminiklerin plazmada toksik seviyeye çıkmalarına sebep olur. Diğer yan etkiler arasında iştah kaybı, bulantı, kusma, kabızlık, diare, karın ağrısı görülebilir. Özellikle sedatif olan grupta önemli antikolinergik ve antimuskarinik etkiler ortaya çıkabilir. Bu etkilerin sonucu ağız kuruluğu, idrar retansiyonu ve sık idrara çıkma, çarpıntı, görmede bulanıklık, hipotansiyon, baş ağrısı, ellerde güçsüzlük, karıncalanma meydana gelir. Azelastin ve levokabastin topikal amaçla kullanılabilen antihistaminiklerdir.

#### *Lökotrien İnhibitörleri*

Lökotrienler araşidonik asit metabolitidir ve birçok alerjik semptomu indükleyerek hipersekresyon ve eozinofiliye yol açar. Bu etkileri ortadan kaldırmak için lökotrien sentez inhibitörü (zileuton) ve reseptör blokerleri (zafirlukast, montelukast, pranlukast) üretilmiştir. Bunlar astım tedavisi için üretilmiş olup alerjik rinit tedavisine yönelik çalışmalar devam etmektedir (2).

#### *Dekonjestanlar*

Alfa agonistler (fenilefrin, oksimetazolin, ksilometazolin, nafazolin) ve noradrenalin salgılatanlar (efedrin, psödoefedrin, fenilpropanolamin) olarak sıralanabilir. Nazal mukozayı besleyen kan damarlarında konstrüksiyona yol açarlar ve konjesyonu azaltırlar. Bu etkinin kaşınma, hapşırma ve burun akıntısı üzerine yararı yoktur.

#### *Kromolin Sodyum*

Alerjik reaksiyonun erken ve geç fazının her ikisini de kontrol altına aldığı için burun kaşıntısı, hapşırık ve akıntının yanı sıra burun tıkanıklığına da iyi gelmektedir. Etki süresi kısa olduğundan sık kullanım gerekliliği hasta uyumunu zorlaştırır. Yaşlı, çocuk ve hamilelerde güvenle kullanılabilir ancak intranazal steroidler kadar etkili değildir.

### *Kortikosteroidler*

Geç faz reaksiyonları üzerine etkilidirler. Alerjik rinitin tüm semptomlarına, özellikle de burun tıkanıklığı üzerine etkilidirler. Sistemik kullanımda yan etkileri bakımından yüksek risk taşırlar. Bu yüzden sistemik olarak sadece çok ileri derecede burun tıkanıklığı olan hastalarda topikal tedaviye zemin hazırlamak için kullanılabilirler. Çocuk ve hamilelerde kullanılmamalıdır. Hastanın bilinen bir kontrendikasyonu yoksa, metilprednizolon 40-80 mg per oral veya tek doz depo steroid olarak kullanılabilir. Depo steroid intramuskuler uygulanır ve hasta uyumu sorunu olmaz, bazen enjeksiyon yerinde doku atrofisine bağlı çökme görülebilir.

İntranazal steroidler, hem mevsimsel hem pereniyal alerjik rinit semptomlarının çoğunu kontrol altına alırlar. Flunisolid, flutikazon propiyonat, budesonid, triamsinolon asetonid ve beklamethazon topikal olarak kullanılan preparatlarıdır. Alerjenlere karşı oluşan erken ve geç cevabı inhibe ederler, nazal mukozadaki eozinofil sayısını düşürürler, burun mukozasındaki mast ve T hücrelerini ve enflamatuvar mediatör salınımını azaltırlar.

Topikal steroid kullanımının yan etkileri arasında yer alan iritasyon, yanma, reaktif hapşırık gibi şikayetler birkaç gün içinde kaybolur. Ancak uzun dönemde burunda kuruma ile birlikte kanlı kabuklanma görülebilir. Nadiren septal perforasyon vakaları da bildirilmiştir. Etkinin ortaya çıkması antihistaminiklere ve dekonjestanlara göre zaman alır. Mevsimsel alerjik rinitte birkaç gün, pereniyal alerjik rinitte bir hafta gerekebilir, bu durumu hastaya izah etmekte fayda vardır.

### *İmmünoterapi*

İmmünoterapi, alerjik hastada temas edildiğinde semptomlara yol açan alerjen aşılmasının giderek artan dozlarda uygulanmasıdır. Bu tedavi yönteminin amacı, hastaların hassasiyetlerini azaltmak ve dolayısıyla semptomlara engel olmaktır. İmmünoterapi başlangıcında alerjen spesifik IgE ve IgG seviyeleri yükselir. Daha sonra IgE seviyesi düşer ve IgG seviyesi artmaya devam eder. IgG antikoru alerjen bloke edici antikoru olarak hareket ederler ve IgG, IgE'nin alerjen bağlama yeri ile yarışarak IgE'ye bağlı mast hücre aktivasyonunu engeller. İmmünoterapinin spesifik IgG'de, özellikle IgG1 ve IgG4 alt sınıflarında artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Endikasyonları:

1. IgE bağımlı alerjiye bağlı hastalık (Alerjik rinit, alerjik astım ),
2. Deri testleri ile alerjen(ler)in veya serum spesifik IgE'nin saptanması,
3. Alerjik semptomların alerjenler tarafından ortaya çıkarılmasının tarif edilmesi,
4. Medikal tedavi ile semptomların yeterince kontrol altına alınmadığı hastalar,
5. Medikal tedavide kalmak istemeyenler,
6. Medikal tedavinin yan etkilerinin ortaya çıktığı hastalar,
7. Uzun süre medikal tedavi almak istemeyen hastalar.

## **2. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARI**

ECM proteinleri ve proteoglikanları içeren, organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, doku morfogenezisi gibi pekçok biyolojik aktivitede etkisi olan karmaşık ve dinamik bir oluşumdur. ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu ve dönüşümü gibi etkilerini MMP'ler aracılığı ile ortaya koyar. MMP ekstrasellüler matriksi parçalayan, nötral pH da aktif olan, multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, eozinofiller, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanırlar (8).

### **2.1. Metalloproteinaz Ailesi**

Aşağıdaki özelliklere sahiptir :

1. Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardır.
2. Zn ++ iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
3. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gereklidir. İnvitro olarak organomerküriyel bileşenlerle aktive olabilirler.
4. Metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörleri ile (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMP) inhibe olurlar.
5. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.



## 2. 2. Metalloproteinazların Yapısı

Klonlanmış MMP'lerin primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülür (Şekil 1).

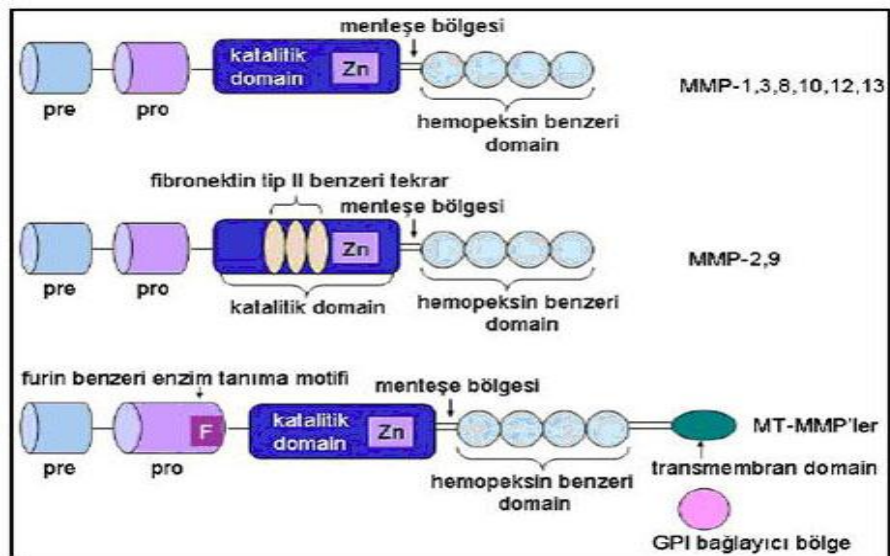
1. Predomain: İlk bölge predomain olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptittir.

2. Prodomain: Enzim aktive olduğunda ortaya çıkar ve yüksek derecede korunmuş PRCGVDPV dizisi içerir. Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığına inanılır. Prodomainin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.

3. Katalitik bölge: Histidin rezidüleri içeren ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan  $Zn^{++}$  iyonunu içeren bölgedir.

4. Prolinden zengin bölge: Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.

5. Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda 'hem' bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Matrilisin (MMP7) dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte, substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Substrat bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmede fonksiyonel rolü vardır (9).



Şekil 1. Matriks metalloproteinaz enzimlerinin moleküler yapısı

### 2. 3. Metalloproteinazlarının Sınıflandırılması

Yeni üyelerin katılımı ile sürekli genişleyen bu enzim ailesinin bugüne dek klonlanmış ve sekanslanmış 66'dan fazla üyesi bulunmaktadır (Tablo II ). Bunlardan 23'ünün insanlarda sentez edildiği gösterilmiştir (10). Bu üyeler substrat özgüllüğüne göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğerleri olmak üzere 5 alt grupta sınıflandırılmıştır (10). En yaygın olarak kullanılan sınıflandırma şekli “substrat özgüllüğüne göre” yapılan sınıflandırmadır. Bununla birlikte “molekül ağırlıklarına göre” veya “yapılarına göre” yapılan sınıflandırmalar da kullanılmaktadır (11).

**Tablo II.** Matriks metalloproteinaz enzimlerinin sınıflandırılması

Grup Adı	Tanımlayıcı İsim	Numara	Temel Substrat
<b>Kolajenazlar</b>	İnterstisyel kolajenaz	MMP-1	Kolajen Tip 1, 2, 3, 7 ve 10, jelatin, PG
	Nötrofil kolajenaz	MMP-8	Kolajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kolajenaz 3	MMP-13	Kolajen Tip 1, 2, 3
	Kolajenaz 4	MMP-18	Kolajen 1
<b>Jelatinazlar</b>	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, Kolajen IV, V, VII ,X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, Kolajen IV, V, XIV, elastin, PG
<b>Stromelisinler</b>	Stromelizin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kolajen III, IV, IX ve X
	Stromelizin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kolajen III, IV, IX ve X
	Stromelizin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kolajen III, IV, IX, X
<b>Membran Tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)</b>	MT1-MMP	MMP-14	Kolajen,I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	
	MT3-MMP	MMP-16	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT4-MMP	MMP-17	
	MT5-MMP	MMP-24	Kolajen III, FN, jelatin
	MT6-MMP	MMP-25	
<b>Diğerleri</b>	Matrisilin 1	MMP-7	Serin Proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	
	RASI-1	MMP-19	Kolajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	Enamelisin	MMP-20	
	X-MMP	MMP-21	Kolajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	CA-MMP	MMP-23	
	Matrisilin 2	MMP-26	Agrekan,amelogenin
	CMMP	MMP-27	
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır

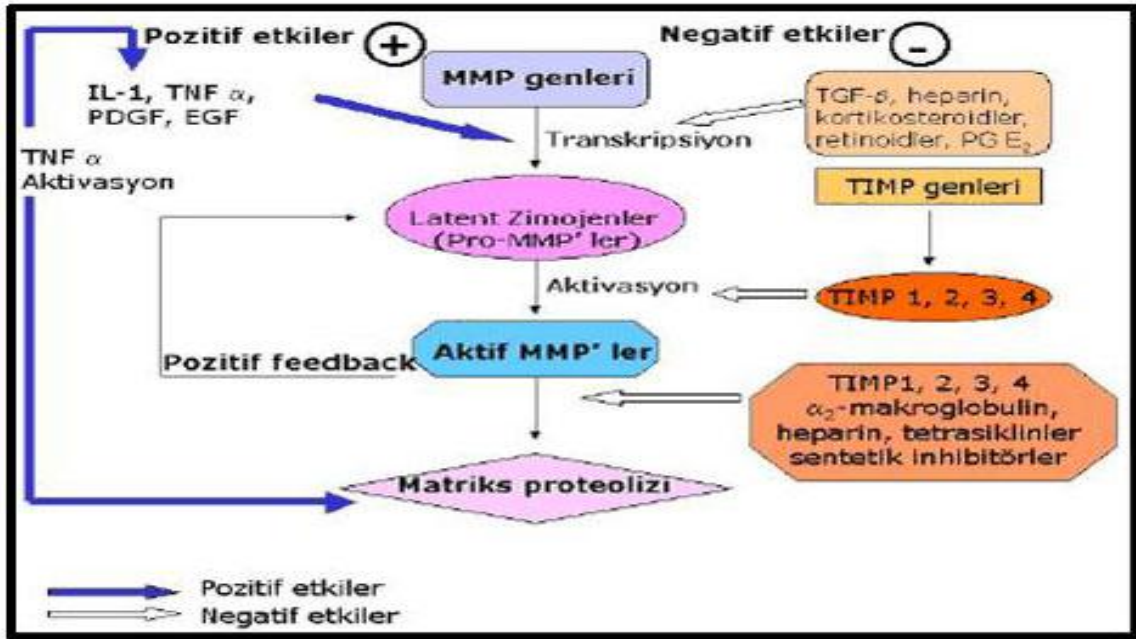
PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

## 2. 4. Metalloproteinazların Sentez, Sekresyon ve Aktivitelerinin Regülasyonu

MMP'lerin sentez, sekresyon ve aktivitelerinin regülasyonu gen transkripsiyonu, latent enzim aktivasyonu ve spesifik inhibitörler tarafından inaktivasyonu gibi birçok aşamada sağlanır (3).

### 2. 4. 1. Transkripsiyonel Regülasyon

MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa), interlökin-1 (IL-1) gibi enflamatuar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile stimüle edilir (Şekil 2). Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-beta (TGF-beta), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (12).



Şekil 2. Matriks metalloproteinaz enzim aktivitesinin düzenlenmesi

### 2. 4. 2. Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

MMP'ler sentez edildikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak salıverilirler. Enzimin 'pro' bölgesindeki sisteinin sülfidril grubu ile aktif bölgedeki Zn<sup>++</sup> arasındaki etkileşim latentliğin sürdürülmesinden sorumludur. Latent formda bulunan MMP; organik civa bileşenleri, şelasyon yapıcı ajanlar ve proteazlar gibi bazı invitro ajanlarla aktive

edilebilir ve bu aktivasyon proteolitik sindirimle sınırlandırılabilir (9, 3). Latent molekül, prodomaini etrafında katlanmış ve korunmuş olarak bulunan PRCGVDPV bölgesindeki sistein rezidüleri  $Zn^{++}$  molekülü ile bir kompleks yapmıştır. MMP aktivatörleri molekülde  $Zn^{++}$  ile etkileşimi bozarak ve proteolitik reaksiyona eşlik edecek olan  $Zn^{++}$ 'yi serbestleştirerek, MMP latent molekülünde bir konformasyonel değişikliğe yol açarlar. PRCGVDPV sekansını içeren aminoterminal prodomaini uzaklaştırılmış aktif MMP otoproteoliz yeteneğine sahiptir (9, 3).

#### *2. 4. 3. Matriks Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu*

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar. Bundan başka alfa2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (Şekil 2).

#### *Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri (TIMP)*

Metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP), MMP'lerin proteaz aktivitelerini inhibe eden düşük molekül ağırlıklı endojen moleküllerdir (3). Tanımlanmış dört tane spesifik doku inhibitörü vardır (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasında sürekli bir denge söz konusudur (13). MMP'ler ve TIMP'leri normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında kemiğin yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenez, enflamasyon, apoptozis, immun cevap gelişimi, embriyonik gelişim, blastosit implantasyonu, organ morfogenezi, sinir hücre gelişimi, ovülasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyon, endometriyal siklus ve saç folikülü siklusu sayılabilir (13).

### **3. TETRASİKLİNLER**

Yapıca birbirine çok yakından benzeyen ve bir tetrasiklik bileşik olan naftasenkarboksamitten türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (4). İlk tetrasiklin antibiyotiği 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*'ten elde edilen klortetrasiklidir. Daha sonra oksitetrasiklin, tetrasiklin, dimetilklortetrasiklin adlı diğer doğal tetrasiklinler tedavi amaçlı kullanıma girmişlerdir (4). Bunları yarı sentetik tetrasiklinler olan metasiklin, doksisisiklin ve minosiklin izlemiştir. Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar. Bakteri hücresi içine, hücre dış

duvarındaki porin kanallarından geçmek ve sitoplazma membranındaki aktif transport mekanizması tarafından hücre içine pompalanmak suretiyle girerler. Bakteri hücresi içine girdikten sonra ribozomların 30 S alt birimine bağlanırlar ve bunun sonucu 50 S alt biriminin akseptör noktasına (A noktasına) aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine amino asid eklenmesini olanaksız duruma getirirler (4).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda tetrasiklinlerin MMP aktivitesini azaltacak bir özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Tetrasiklin ailesinin tüm üyelerinde bulunan bu özellik ilk olarak 1980'lerin başlarında, diabet üzerine yapılan çalışmalar sırasında saptanmıştır (14). Tetrasiklinin antimikrobiyal ve antibiyotik özelliklerinden ayrı olarak kolajenolitik aktiviteyi engelleyen bir özelliğe sahip olduğunu gösteren bu sonuç, devam eden çalışmalarda da doğrulanmıştır (15, 16). Yapılan çalışmalarda minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklinin kolajenolitik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiş iken tetrasiklin grubu dışındaki antibiyotiklerin bu etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (15).

Tetrasiklinler MMP aktivitesini birçok sinerjistik mekanizmayla azaltmaktadır. Tetrasiklinler, aktif MMP'leri kalsiyum ve çinko bağlama özelliğine bağlı olarak direkt bir mekanizmayla engellemektedir (16, 17). Ek olarak tetrasiklinler, PMNL kaynaklı reaktif oksijen metabolitlerinin (hipokloröz asit (HOCl)) üretimini engellemektedir (18). Bu özellik, latent pro-MMP'yi aktive eden HOCl'yi inhibe ederek, doksisisiklinin non-antimikrobiyal, anti-enflamatuar özelliklerine katkıda bulunabilir. Ayrıca HOCl konak kaynaklı proteinaz inhibitörleri alfa1-PI ve alfa2 makroglobulini (MMP inhibitörleri) oksidize ve inaktive eder (19). Alfa1-PI, doku yıkıcı enzimleri özellikle serum proteinazları inhibe eden majör bir endojen inhibitördür (20). İltihabi hastalıklarda, reaktif oksijen türleri ve kolajenaz tarafından alfa1-PI inaktive edilir (21). Tetrasiklin MMP aktivitesinin inhibisyonunu; hem direkt inhibisyon ve hem de HOCl gibi reaktif oksijen metabolitlerinin inhibisyonu ile indirekt olarak sağlar.

## **2. 1. Doksisisiklin**

Doksisisiklinin, antimikrobial tetrasiklinler arasında en potent ve non-selektif MMP inhibitörü olduğu anlaşıldıktan sonra araştırmalar doksisisiklin üzerine odaklanmıştır (4, 22, 23). Doksisisiklin subantimikrobial dozlarda MMP aktivitesini inhibe etmektedir. Araştırmacılar, doksisisiklinin diğer tetrasiklin grubu ilaçlardan daha sıkı bir şekilde Zn<sup>++</sup>'ya bağlandığını bildirmişlerdir (22). Ayrıca doksisisiklinin inhibe edici konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>=15µ), minosiklinden (IC<sub>50</sub>=190µ) veya tetrasiklinden (IC<sub>50</sub>=350µ) daha düşüktür

(23). Ek olarak, doksisisiklinin PMN tip kolajenaz aktivitesini (MMP-8) engellemede fibroblast tip kolajenaz aktivitesine (MMP-1) göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu durum doksisisiklinin, normal bağ doku metabolizmasına müdahale etmeden patolojik olarak yükselmiş kolajenaz seviyelerini azalttığını ve daha güvenli bir tedavi metodu olduğunu göstermiştir (24).

Antibiyotik dozunda doksisisiklinin (100mg) yan etkileri fotosensitivite, hipersensitivite reaksiyonları ve grip benzeri semptomlar, bulantı, kusma ve özefagal iritasyondur. Yapılan klinik çalışmalarda subantimikrobiyal doz doksisisiklin (20 mg günde 2 kez) kullanımı sonucu tetrasiklin sınıfı antibiyotiklerin tipik yan etkileri gözlenmemiştir (25). Ayrıca antimikrobiyal etki ile ilgili bir yan etkide bildirilmemiştir. Subantimikrobiyal doz doksisisiklin (SDD) vücutta iyi tolere edilir ve en sık rastlanılan yan etkileri baş ağrısı olarak bildirilmesine rağmen, bu yan etkiler açısından plasebo kullandırılan gruplarla fark bulunamamıştır. SDD'in gastrointestinal ve ürogenital bölgelerdeki mikrofloraya belirgin etkileri bulunmamış, fırsatçı patojenlerde artışa sebep olmadığı belirtilmiştir (25).

## **GEREC VE YÖNTEM**

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından sağlanan ortalama 250-300 gram ağırlığındaki 21 adet sağlıklı Wistar türü dişi sıçan üzerinde gerçekleştirildi (26, 27). Sıçanlar 30x18x24 cm boyutlarındaki kafeslerde, her birinde en fazla 4 hayvan olacak şekilde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda ve  $24 \pm 2$  °C'lik ortamda tutularak, standart laboratuvar diyeti ile beslendi. Hayvanların deney süresi içinde istedikleri kadar su içip, yem yiyebilmeleri sağlandı. Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi (etik kurul onay no: 30/2009 ve tarihi: 05.06.2009).

Hayvanlar her grupta 7 sıçan olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Çalışma dizaynı A grubunda alerjik rinit oluşturulan 7 sıçan, B grubunda alerjik rinit oluşturulup topikal intranasal doksisisiklin ile tedavi edilen 7 sıçan, C grubunda ise kontrol grubunu oluşturan 7 sıçan yer alacak şekilde düzenlendi.

Çalışmada kullanılan ilaçlar Sartorius marka hassas terazide (GD603-0CE Karat Terazisi, Sartorius Mechatronics, Goettingen, Almanya) tartılarak hazırlandı (Şekil 3). A ve B gurubundaki hayvanlara 1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik içinde 0.3 mg Ovalbumin (OVA, Grade V, Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO) ve adjuvan olarak 30 mg aliminyum hidroksit olacak şekilde hazırlanmış antijen solüsyonu intraperitoneal yolla, her 2 günde bir kez olmak üzere toplam 14 gün boyunca 7 kez saat 11:00-12:00 arasında uygulanarak sensitizasyon oluşturuldu (28). Kontrol gurubuna yer alan hayvanlara ise her 2 günde bir kez olmak üzere toplam 14 gün boyunca 7 kez saat 11:00-12:00 arasında 1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı (Şekil 4).

Çalışmanın ikinci aşamasında, sensitize edilmiş hayvanlarda alerjik rinit modeli oluşturmak için % 0.9'luk serum fizyolojik içinde 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan OVA solüsyonundan her iki burun deliğine mikropipet ile 15 gün boyunca 11:00-12:00 saatleri arasında hergün 10 µl damlatıldı (28). B gurubundaki hayvanlara ek olarak 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanan doksisisiklin (D-9891, Dox, Sigma-Aldrich) solüsyonundan 10 µl, her iki burun deliğine 15 gün boyunca OVA uygulamasından bir saat önce olacak şekilde hergün mikropipet ile damlatıldı (Şekil 5). C grubundaki hayvanların her iki burun deliğine ise 15 gün boyunca 11:00-12:00 saatleri arasında hergün mikropipet ile 10 mikroL % 0.9'luk serum fizyolojik damlatıldı (Şekil 6).



a)



b)

**Şekil 3.** Kullanılan ilaçlar (a) ve ağırlıklarının tespiti için kullanılan hassas terazi (b).



**Şekil 4.** Sıçanlara intraperitoneal enjeksiyon uygulanması.





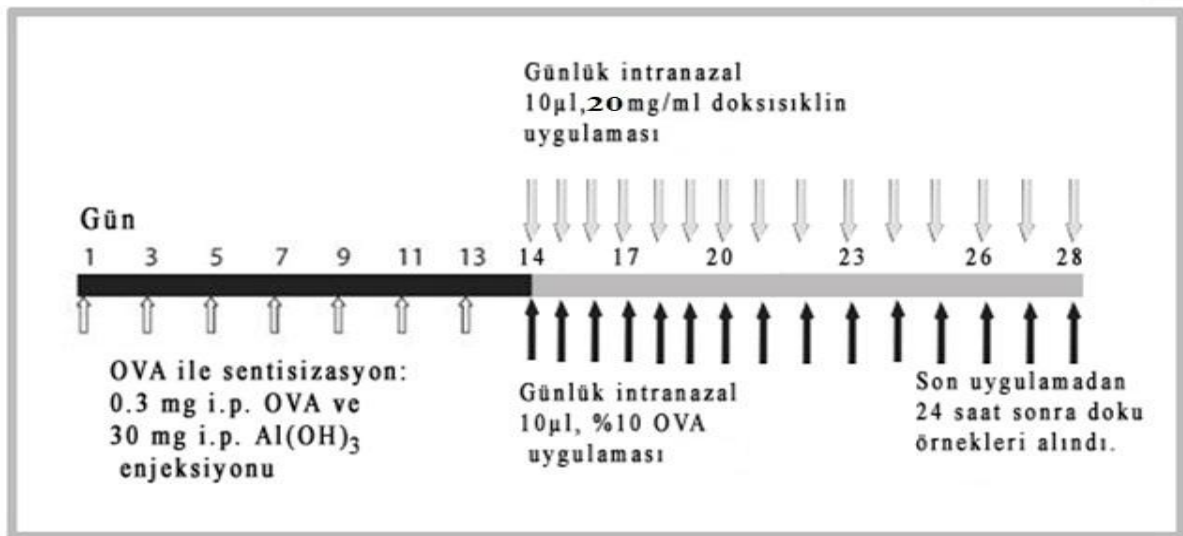
**Şekil 5.** Mikropipet ile topikal intranazal uygulama yöntemi.

Alerjik rinit semptomlarının subjektif değerlendirilmesi 1, 14, 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerde 11:00-12:00 saatleri arasında; intranazal OVA uygulamasının hemen sonrasında, her kafeste bir hayvan olacak şekilde 10 dakikalık bir uyum süresinin ardından 10'ar dakika boyunca aynı kişi tarafından burun kaşıma hareketi ve hapşırma gözlemlenerek yapıldı. Lokal sensitizasyonun başlangıcı olan 14. günde hayvanların burun kaşıma hareketi, hapşırma ve burun akıntısı değerlendirilerek skorlandı (Tablo 3). Ve toplam skorun >5 puan olması durumunda başarılı bir alerjik rinit modeli olduğu kabul edildi (28, 29).

**Tablo 3.** Alerjik rinit skorlama yöntemi

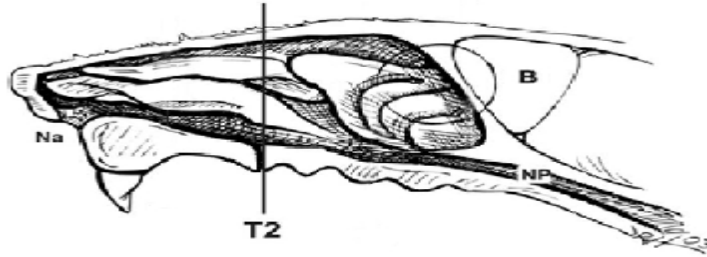
	<b>0 puan</b>	<b>1 puan</b>	<b>2 puan</b>	<b>3 puan</b>
<b>Burun kaşıma hareketi sayısı</b>	Yok	2 defa/dk	4-6 defa/dk	> 6 defa/dk
<b>Hapşırma sayısı</b>	Yok	2 defa/dk	4-6 defa/dk	> 6 defa/dk
<b>Burun akıntısı miktarı</b>	Yok	Bir burun deliğinde	Her iki burun deliğinde	Dışarı doğru akan

İlaç uygulaması bitiminden 24 saat sonra bütün hayvanlar 80 mg/kg intraperitoneal pentobarbital enjeksiyonu verilerek sakrifiye edilip, sol ventrikülden 100 ml % 0.9'luk serum fizyolojik ve takiben 400 ml formaldehit verilerek perfüze edildiler.



**Şekil 6.** Deneysel alerjik rinit oluşturulması ve tedavi protokolünün zaman çizelgesi.

Daha sonra hayvanların nazal kavite, nazal septum, paranasal sinüs ve konkaları blok olarak çıkarıldı. Bunun için yapılan kesiler ön kesici dişler seviyesinin hemen önünden başlayarak, arkada sert damak bitimine kadar yapıldı (Şekil 7).



**Şekil 7.** Sığanların nazal kavitelerinin blok olarak çıkarılması. NP: nazofarenks, B: beyin, Na: nares, T2: histolojik çalışmanın yapıldığı kesit (insisiv papilla düzeyi)

### **1. IŞIK MİKROSKOBİK DOKU TAKİP PROTOKOLÜ**

Elde edilen nazal doku spesmenleri % 10'luk tamponlanmış nötral formaldehit ile fikse edildikten sonra 3 gün süreyle % 10'luk nitrik asid ile dekalsifiye edildi. Nitrik asidin uzaklaştırılması için bir gece akar su altında yıkandıktan sonra, 60°C'de etüvde 20'şer dakika boyunca sırasıyla % 70, % 80, % 96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C'de etüvde 20'şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Ardından şeffaflandırma amacıyla 60°C'de etüvde 30'ar dakika iki değişim ksilolde bekletildi ve 60°C'lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonları sağlanan spesmenlerden hazırlanan ince doku dilimleri parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 4). Daha sonra bu kesitlerden mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5 µ'luk sagittal kesitler alındı (Şekil 8).

Kesitlerin bir kısmı doku histolojisini incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin ile boyandı, diğer kesitlere goblet hücrelerini işaretlemek amacıyla Alcian Blue-Peryodik Asit Schiff (AB/PAS) boyaması yapıldı.



**Şekil 8.** Histolojik olarak değerlendirilen ve insisiv papilla seviyesinden (T2) geçen kesit.

S: septum, MS: maksiler sinüs, DM: dorsal meatus, HP: sert damak

**Tablo 4.** Rutin doku takibi

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Fiksasyon	% 10' luk Formaldehit	24-48 Saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	% 70' lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	% 80' lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	% 96' lik Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

### **1.1. Hematoksilen-Eozin boyaması**

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dakika süreyle 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika, diğer ikisi 10'ar dakikalık olmak üzere oda ısısında üç kez ksilole tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absöü alkol ve % 96'dan % 70'e

azalan alkol serilerinden geçirdi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire, İngiltere) ile boyandı. Boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire, İngiltere) ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla % 70, % 80, % 96 ve iki seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 5).

**Tablo 5.** Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (Oda ısısında)	10 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (Oda ısısında)	10 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika

Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eosin	2 Dakika
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

### 1.2 Alcian Blue-Periyodik Asit Schiff (AB/PAS) boyaması

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika etüvde diğer ikisi 20'şer dakikalık olmak üzere oda ısısında üç farklı şekilde ksilole tabi tutuldu. Rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve % 96'dan % 70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 5 dakika Alcian mavisi ile boyanarak, önce akarsu ile yıkanıp distile su ile çalkalandı. Daha sonra 10 dakika periyodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanıp distile su ile çalkalanan kesitler, 20 dakika Schiff boyası ile boyandı ve boyamadan sonra 10 dakika akarsuda tutuldu. Dehidratasyon işlemi için sırasıyla % 70, % 80, % 96 ve iki seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 6).

**Tablo 6.** Alcian Blue-Peryodik Asit Schiff boyama protokolü

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (Oda ısısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Alcian Mavisi	5 Dakika
Yıkama	Akarsu	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Peryodik Asit	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama

Boyama	Shiff	20 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Hematoksilen	3 Dakika
Yıkama	Akarsu	6 Dakika
Dehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

### 1. 3. Hücre sayımı

Hematoksilen-Eozin ve Alcian Blue-Peryodik Asit Schiff ile boyanan kesitlerin görüntüleri, ışık mikroskobu (Olympus BH-2 Tokyo, Japonya) ve yüksek rezolüsyon video kamera (JVC TK-890E, Japonya) içeren bilgisayar destekli görüntü analiz sistemi kullanılarak elde edildi. Değerlendirme 20x Olympus lensle görüntülenen monitörde, her bir hayvana ait kesitten 5 ayrı alan incelenerek yapıldı.

Işık mikroskobik inceleme ile silya kaybı, goblet hücre artışı, vasküler konjesyon, vasküler proliferasyon, enflamatuar hücre infiltrasyonu, eozinofil infiltrasyonu ve kondrositlerdeki



hipertrofi derecesi değerlendirilerek skorlandı (30, 31, 32). Skorlama, Ercan ve ark. (33) tarafından daha önce tanımlandığı gibi semikantitatif olarak, her parametre için eğer herhangi bir değişiklik yoksa “0”, hafif derecede değişiklik varsa “1”, belirgin derecede değişiklik varsa “2”, ileri derecede değişiklik varsa “3” puan verilerek yapıldı. Sayım sonucu elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

## **2.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

Elde edilen veriler Windows için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15.0 programı kullanılarak analiz edildi. Histolojik parametrelerin değerlendirme sonuçları semikantitatif skorlamaya dayalı veriler olduğu için, gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapmak amacıyla sonuçlar yok-hafif (skoru < 1.5) ve belirgin-ileri (skoru > 1.5) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplar arasındaki farklılığı test etmek için Fischer’s Exact Test kullanıldı.

Hapşırma ve burun kaşıma sayısı ölçüm değerleri ise ikili gruplar arasında Mann Whitney U testi kullanılarak test edildi. Grup içi karşılaştırmalarda ise Wilcoxon Sıralı Sayılar Testi kullanıldı. Kullanılan tüm analizlerde p değeri 0.05’ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olarak kabul edildi.

## **BULGULAR**

### **1. DENEYSEL ALERJİK RİNİT MODELİ**

A ve B gruplarında yer alan hayvanlarda, ilk topikal intranasal OVA uygulamasını takiben hapşırma, burun kaşıma hareketi, burun akıntısı gibi tipik alerjik rinit semptomlarının ortaya çıktığı görüldü ve bu semptomların ortalama 1.5 saat boyunca devam ettiği gözlemlendi. Tekrarlayan topikal intranasal OVA uygulamalarının ise, semptomların süre ve şiddetini arttırdığı dikkati çekti. Alerjik rinitin subjektif değerlendirilmesinde, A ve B gruplarındaki bütün hayvanlarda 14. günde toplam skor  $> 5$  olduğu için başarılı bir alerjik rinit modelinin oluştuğu kabul edildi. Böylelikle A ve B grubundaki bütün hayvanlar çalışmaya dahil edildi.

A grubundaki hayvanlarda 14, 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki hapşırma sayısı 1. günden anlamlı derecede fazla olarak saptandı (sırasıyla  $p = 0.017$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.016$ ,  $p = 0.016$ ,  $p = 0.017$ ). Doksisisiklin ile tedavi edilen B grubundaki hayvanlarda ise tedavinin 3. gününden itibaren hapşırma sayısında belirgin azalma olduğu görüldü (Şekil 9). B grubundaki hayvanlarda 14. ve 17. günlerdeki hapşırma sayısı 1. günden anlamlı derecede daha fazla olarak saptanırken (sırasıyla  $p = 0.017$ ,  $p = 0.018$ ); 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki hapşırma sayısı ise 1. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı değildi (sırasıyla  $p = 0.317$ ,  $p = 1.000$ ,  $p = 0.083$ ,  $p = 0.317$ ). C grubundaki hayvanların hapşırma sayıları arasında çalışma boyunca anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 7).

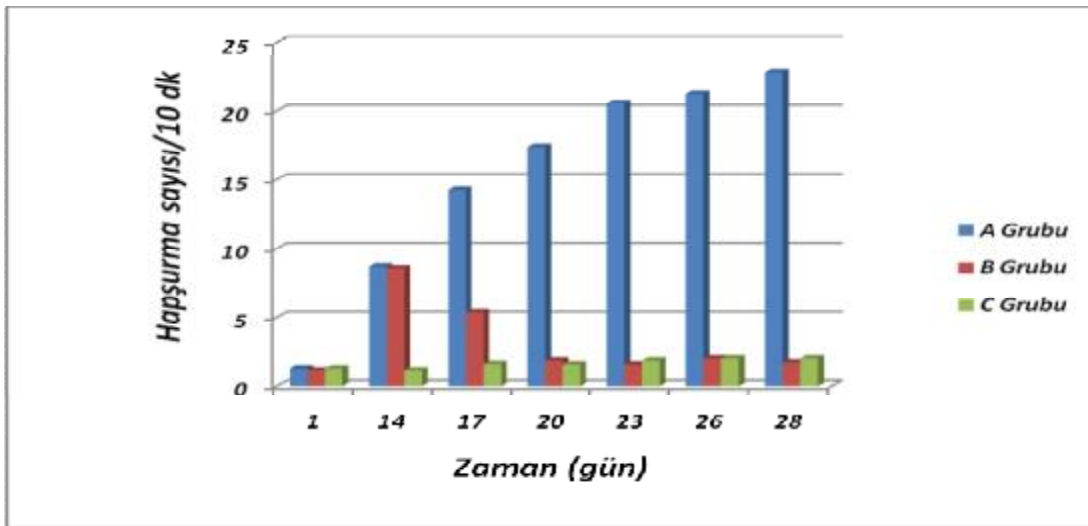
**Tablo 7.** Ortalama hapşırma sayıları

	1. gün	14. gün	17. gün	20. gün	23. gün	26. gün	28. gün
<b>A Grubu</b>	1.28	8.71	14.28	17.42	20.57	21.28	22.85
<b>B Grubu</b>	1.14	8.57	5.40	1.85	1.57	2.00	1.71
<b>C Grubu</b>	1.28	1.14	1.60	1.57	1.85	2.00	2.00

A ve C grubu arasındaki karşılaştırmada; 1. gündeki ortalama hapşırma sayıları arasında anlamlı farklılık yokken ( $p = 0.606$ ); 14, 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki ortalama hapşırma sayılarının, A grubunda C grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ).

B ve C gruplarındaki hayvanların 1, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki ortalama hapşırma sayıları arasında anlamlı farklılık yokken (sırasıyla  $p = 1.000$ ,  $p = 0.100$ ,  $p = 0.254$ ,  $p = 1.000$ ,  $p=0.334$ ); 14. ve 17. günlerdeki ortalama hapşırma sayısının B grubunda C grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu ve iki grup arasında anlamlı derecede farklılık olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ).

A ve B grubu arasındaki karşılaştırmada: 1. ve 14. günlerdeki ortalama hapşırma sayıları arasında anlamlı farklılık yokken (sırasıyla  $p = 0.606$ ,  $p = 0.790$ ); 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki ortalama hapşırma sayılarının B grubunda A grubuna göre azalmış olduğu ve gruplar arasında anlamlı derecede farklılık olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ).



**Şekil 9.** Ortalama hapşırma sayılarının karşılaştırılması

A grubundaki hayvanlarda 14, 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayısı 1. günden anlamlı derecede artmış olarak saptandı (sırasıyla  $p = 0.017$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.014$ ,  $p = 0.017$ ,  $p = 0.014$ ,  $p = 0.014$ ). Doksisisiklin ile tedavi edilen B grubundaki hayvanlarda tedavinin 3. gününden itibaren burun kaşıma hareketi sayısında belirgin azalma olduğu görüldü (Şekil 10). B grubundaki hayvanlarda 14. ve 17. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayılarının 1. günden anlamlı derecede daha fazla olduğu saptanırken (sırasıyla  $p = 0.017$ ,  $p = 0.018$ ); 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayılarının ise 1. günden anlamlı derecede farklı olmadığı belirlendi (sırasıyla  $p = 0.083$ ,  $p = 0.257$ ,  $p = 0.096$ ,  $p = 0.317$ ). C grubundaki hayvanların farklı günlerdeki burun kaşıma hareketi sayıları arasında çalışma boyunca anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 8).

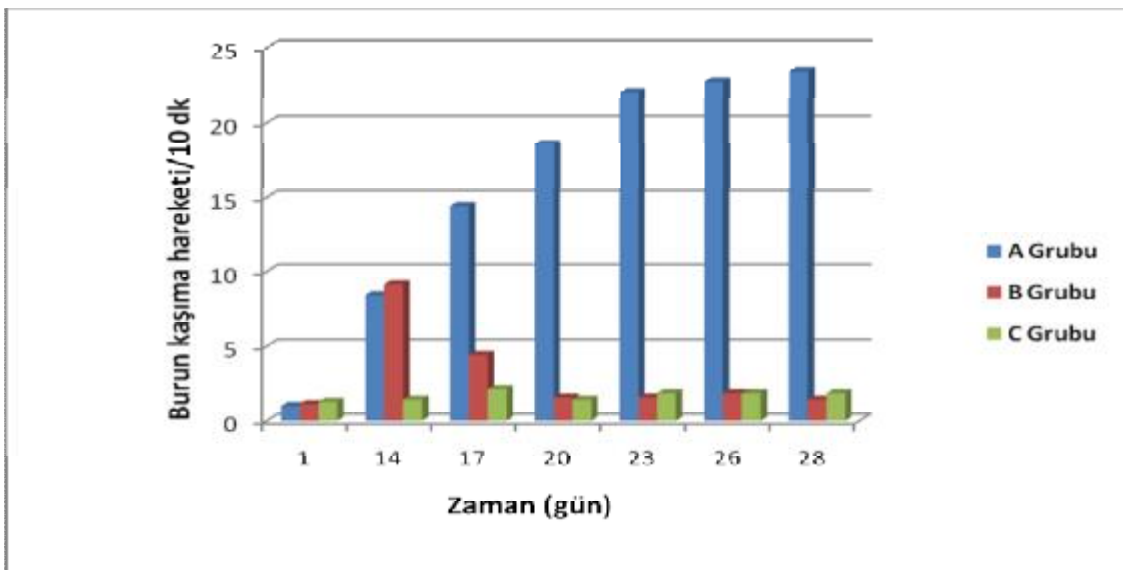
**Tablo 8.** Ortalama burun kaşıma hareketi sayıları

	1. gün	14. gün	17. gün	20. gün	23. gün	26. gün	28. gün
A Grubu	1.00	8.42	14.42	18.57	22.00	22.71	23.42
B Grubu	1.14	9.14	4.42	1.57	1.57	1.85	1.42
C Grubu	1.28	1.42	2.14	1.42	1.85	1.85	1.85

A ve C grubu arasındaki karşılaştırmada, 1. gündeki ortalama burun kaşıma hareketi sayıları arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p = 0.304$ ); 14, 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayılarının ise A grubunda anlamlı derecede artmış olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ).

B ve C gruplarında yer alan hayvanların 1, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki ortalama burun kaşıma hareketi sayıları arasında anlamlı farklılık yokken (sırasıyla  $p = 0.404$ ,  $p = 0.606$ ,  $p = 0.254$ ,  $p = 1.000$ ,  $p = 0.107$ ); B grubundaki hayvanlarda 14. ve 17. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayılarının anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.001$ ,  $p = 0.004$ ).

A ve B grubu arasındaki karşılaştırmada, 1. ve 14. günlerdeki burun kaşıma hareketi sayıları arasında anlamlı farklılık yokken (sırasıyla  $p = 0.728$ ,  $p = 0.181$ ); B grubunda yer alan hayvanlarda 17, 20, 23, 26 ve 28. günlerdeki ortalama burun kaşıma hareketi sayılarının belirgin olarak azaldığı ve her iki grup arasında anlamlı derecede farklılık olduğu saptandı (sırasıyla  $p = 0.002$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ ).



**Şekil 10.** Ortalama burun kaşıma hareketi sayılarının karşılaştırılması

## **2. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME**

Nazal kavite, septum ve lateral nazal duvarlarının semikantitatif histopatolojik değerlendirme sonuçları incelendiğinde (Tablo 9); ışık mikroskopik değerlendirmede kontrol grubunda normal histolojik yapılar izlendi. Respiratuar pseudostratifiye silli silindirik epitel hücrelerinde silyalar ve goblet hücreleri olağan gözlemlendi, lamina propria eozinofil ve enflamatuar hücre infiltrasyonu görülmedi. Bağı dokusunda damar yapılarının normal olduğu, vasküler konjesyon ve vasküler proliferasyon bulunmadığı görüldü. Mukozal bezler ve kondrositler normal olarak izlendi (Şekil 11-15).

Alerjik rinit modeli oluşturulan A grubundaki sıçanlarda ise kontrol grubuna göre tüm histolojik parametrelerde anlamlı değişiklikler olduğu görüldü. A grubundaki sıçanlarda HE boyamalarda respiratuar epitel hücrelerinde silya kaybı, eozinofil ve enflamatuar hücre infiltrasyonu ile bağı dokusundaki damarlarda belirgin vasküler konjesyon ve vasküler proliferasyon gözlemlendi. Kıkırdak dokusu incelendiğinde ise kondrositlerde önemli ölçüde hipertrofi izlendi (Şekil 16-26). AB/PAS boyamalarda ise goblet hücrelerinde belirgin artış olduğu görüldü (Şekil 34-36).

Doksisiklin ile tedavi edilen B grubunda respiratuar epitel hücrelerinde silya kaybının azaldığı ve kontrol grubuna yaklaştığı görüldü. Alerjik rinit nedeniyle artan eozinofil ve enflamatuar hücre infiltrasyonunun da azaldığı gözlemlendi. Bağı dokusundaki damarlarda az miktarda vasküler konjesyon ve vasküler proliferasyon mevcuttu. Kıkırdak dokusunda ise kondrositlerde hipertrofinin azaldığı izlendi (Şekil 27-29). AB/PAS boyamalarda ise alerjik rinit modelinde görülen goblet hücreleri artışının azaldığı ve kontrol grubuna yaklaştığı görüldü (Şekil 37-40).

**Tablo 9.** Nazal kavite septum ve lateral duvarlarının semikantitatif histolojik değerlendirme sonuçları.

	<b>Sk</b>	<b>Gha</b>	<b>Vask</b>	<b>Vasp</b>	<b>Ehi</b>	<b>Kh</b>	<b>Eozinf</b>
<b>A1</b>	2.00	2.60	2.60	3.00	2.40	3.00	2.60
<b>A2</b>	2.00	2.40	2.60	3.00	2.00	2.60	2.40
<b>A3</b>	2.00	2.00	2.60	2.80	2.20	2.80	2.40
<b>A4</b>	2.00	2.60	2.60	2.80	2.40	2.80	2.40
<b>A5</b>	2.00	2.80	2.60	3.00	2.40	2.60	2.60
<b>A6</b>	2.00	2.80	2.20	2.60	2.00	2.60	2.00
<b>A7</b>	2.00	2.60	2.60	3.00	2.80	3.00	2.80
<b>B1</b>	1.00	1.40	1.00	1.00	1.00	0.00	1.00
<b>B2</b>	1.60	1.60	1.40	1.20	1.20	0.40	1.20
<b>B3</b>	1.20	1.60	1.00	1.00	1.00	0.00	1.20
<b>B4</b>	1.40	1.60	1.00	1.00	1.00	0.20	1.00
<b>B5</b>	1.40	1.80	1.00	1.00	1.20	0.40	1.20
<b>B6</b>	1.00	1.60	1.20	1.20	1.00	0.20	1.00
<b>B7</b>	1.40	1.80	1.20	1.20	1.00	0.20	1.20
<b>C1</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
<b>C2</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>C3</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40
<b>C4</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
<b>C5</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20
<b>C6</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40
<b>C7</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20

**Sk:** Silya kaybı, **Gha:** Goblet hücre artışı, **Vask:** Vasküler konjesyon, **Vasp:** Vasküler proliferasyon, **Ehi:**Enflamatuar hücre infiltrasyonu, **Kh:** Kondrositlerde hipertrofi, **Eozinf:** Eozinofil infiltrasyonu.

Histolojik parametrelerin değerlendirme sonuçları, semikantitatif skorlamaya dayalı veriler olduğu için gruplar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapmak amacıyla sonuçlar yok-hafif (skoru < 1.5) ve belirgin-ileri (skoru > 1.5) olanlar olmak üzere iki guruba ayrıldı.

## 2.1. Silyum kaybı

Elde edilen bulgular Tablo 10’da sunulmuştur.

**Tablo 10.** Guruplandırılmış silyum kaybı bulguları.

Gruplar	Silyum kaybı				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
A Grubu	0	0	7	100	7	100
B Grubu	6	85.7	1	14.3	7	100
C Grubu	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda silyum kaybının kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı ( $p = 0.001$ ). A grubundaki silyum kaybı, B grubundaki sıçanlardakinden de anlamlı derecede fazla olarak saptandı ( $p = 0.005$ ). Buna karşılık B ve C grupları arasında silyum kaybı açısından anlamlı farklılık saptanmadı ( $p = 1.000$ ).

## 2.2. Goblet hücre artışı:

Elde edilen bulgular Tablo 11’de sunulmuştur.

**Tablo 11.** Gruplandırılmış goblet hücre artışı bulguları.

Gruplar	Goblet hücre artışı				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
A Grubu	0	0	7	100	7	100
B Grubu	1	14.3	6	85.7	7	100
C Grubu	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda goblet hücre artışının kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede fazla olduğu saptandı ( $p = 0.001$ ). B grubundaki sıçanlarda da goblet hücre artışı gerilemiş olmasına rağmen, A grubu ile karşılaştırıldığında aralarında bu parametre açısından anlamlı farklılık saptanmadı ( $p = 1.000$ ).

### 2.3. Vasküler konjesyon

Elde edilen bulgular Tablo 12’de sunulmuştur.

**Tablo 12.** Gruplandırılmış vasküler konjesyon bulguları.

Gruplar	Vasküler konjesyon				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>A Grubu</b>	0	0	7	100	7	100
<b>B Grubu</b>	7	100	0	0	7	100
<b>C Grubu</b>	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda vasküler konjesyon artışının kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). A grubundaki vasküler konjesyon artışı B grubuna göre de anlamlı derecede daha fazla olarak saptandı (p = 0.001). Buna karşılık B ve C grupları arasında vasküler konjesyon açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p = 1.000).

### 2.4. Vasküler proliferasyon

Elde edilen bulgular Tablo 13’te sunulmuştur.

**Tablo 13.** Gruplandırılmış vasküler proliferasyon bulguları.

Gruplar	Vasküler proliferasyon				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>A Grubu</b>	0	0	7	100	7	100
<b>B Grubu</b>	7	100	0	0	7	100
<b>C Grubu</b>	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda vasküler proliferasyonun kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). A grubundaki vasküler proliferasyonun B grubunda da anlamlı derecede daha fazla



olduğu saptandı (p = 0.001). Buna karşılık B ve C grupları arasında vasküler proliferasyon açısından anlamlı farklılık saptanmadı ( p = 1.000).

### 2.5. Enflamatuar hücre infiltrasyonu

Elde edilen bulgular Tablo 14’te sunulmuştur.

**Tablo 14.** Gruplandırılmış enflamatuar hücre infiltrasyonu bulguları.

Gruplar	Enflamatuar hücre infiltrasyonu				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>A Grubu</b>	0	0	7	100	7	100
<b>B Grubu</b>	7	100	0	0	7	100
<b>C Grubu</b>	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda enflamatuar hücre infiltrasyonunun kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). A grubundaki enflamatuar hücre infiltrasyonunun B grubundan da anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). Buna karşılık B ve C grupları arasında enflamatuar hücre infiltrasyonu açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p = 1.000).

### 2.6. Kondrositlerde hipertrofi:

Elde edilen bulgular Tablo 15’te sunulmuştur.

**Tablo 15.** Gruplandırılmış kondrosit hipertrofisi bulguları.

Gruplar	Kondrosit hipertrofisi				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>A Grubu</b>	0	0	7	100	7	100
<b>B Grubu</b>	7	100	0	0	7	100
<b>C Grubu</b>	7	100	0	0	7	100

İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda kondrositlerdeki hipertrofinin kontrol grubundan (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). A grubunda görülen kondrosit hipertrofinin B grubuna göre de anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). Buna karşılık B ve C grupları arasında kondrositlerdeki hipertrofi açısından anlamlı farklılık saptanmadı ( p = 1.000).

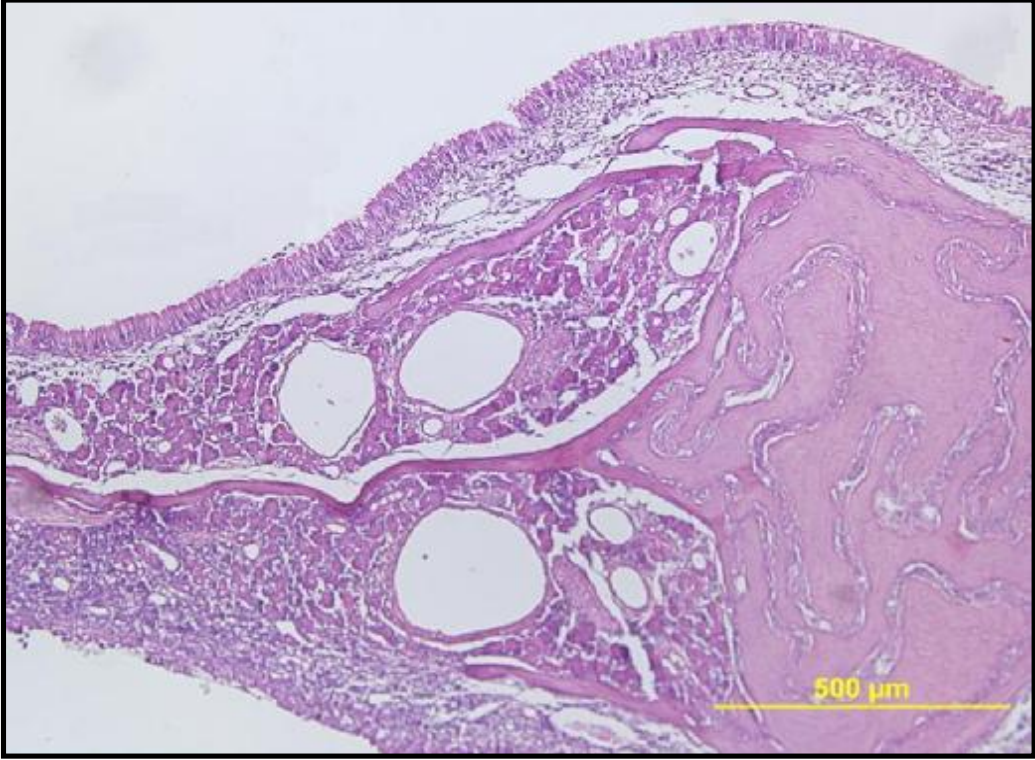
### 2.7. Eozinofil infiltrasyonu:

Elde edilen bulgular Tablo 16’da sunulmuştur.

**Tablo 16.** Gruplandırılmış eozinofil infiltrasyonu bulguları.

Gruplar	Eozinofil infiltrasyonu				Toplam	
	Yok/Hafif Skor < 1.5		Orta/Ağır Skor > 1.5			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>A Grubu</b>	0	0	7	100	7	100
<b>B Grubu</b>	7	100	0	0	7	100
<b>C Grubu</b>	7	100	0	0	7	100

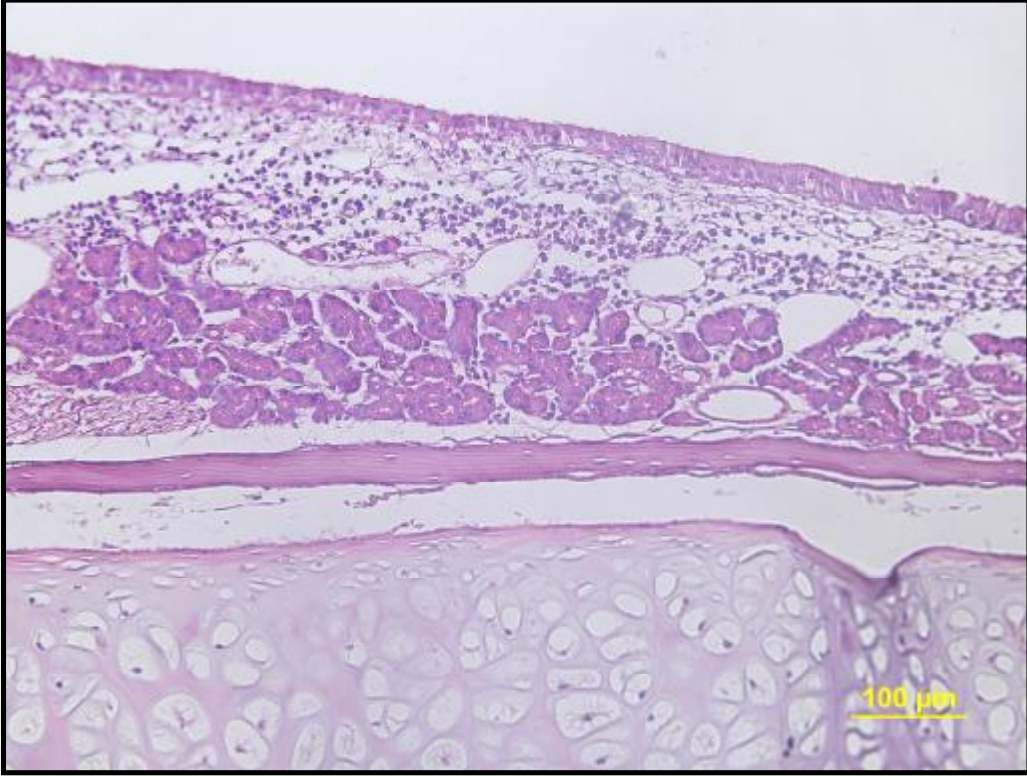
İstatistiksel olarak, alerjik rinit oluşturulan A grubundaki sıçanlarda eozinofil infiltrasyonunun kontrol grubuna göre (C grubu) anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). A grubundaki eozinofil infiltrasyonunun B grubuna göre de anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı (p = 0.001). Buna karşılık B ve C grupları arasında eozinofil infiltrasyonu açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p = 1.000).



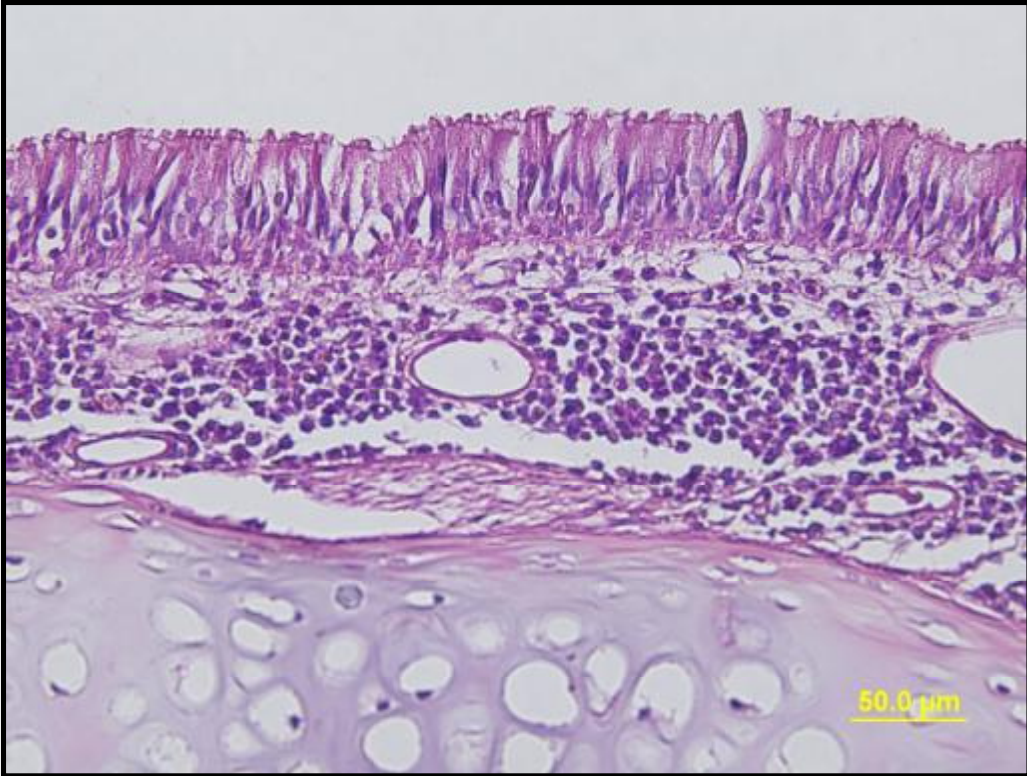
**Şekil 11.** Kontrol grubu genel görünüm HE X10



**Şekil 12.** Kontrol grubu genel görünüm HE X10

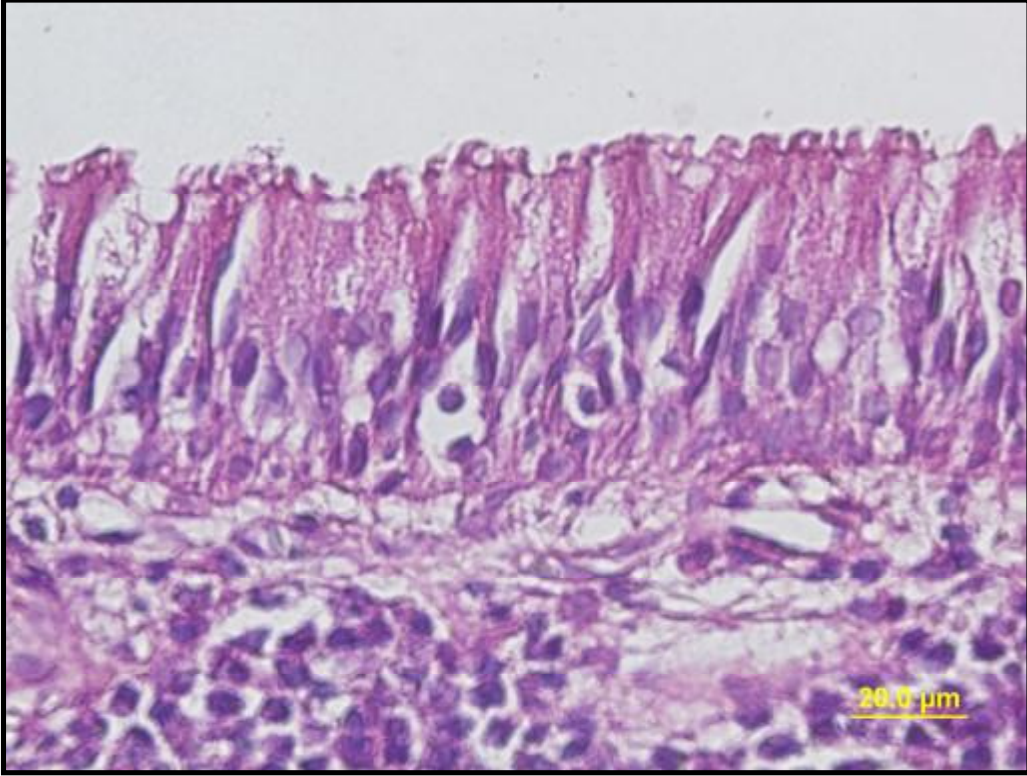


**Şekil 13.** Kontrol grubu genel görünüm HE X20

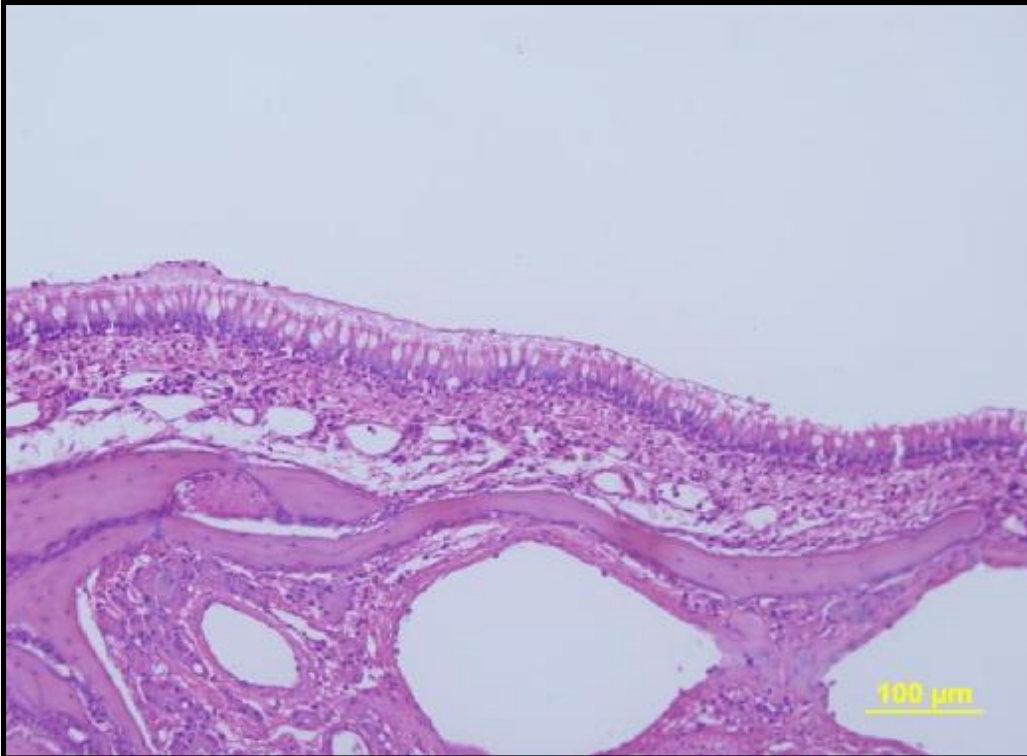


**Şekil 14.** Kontrol grubu genel görünüm HE X40





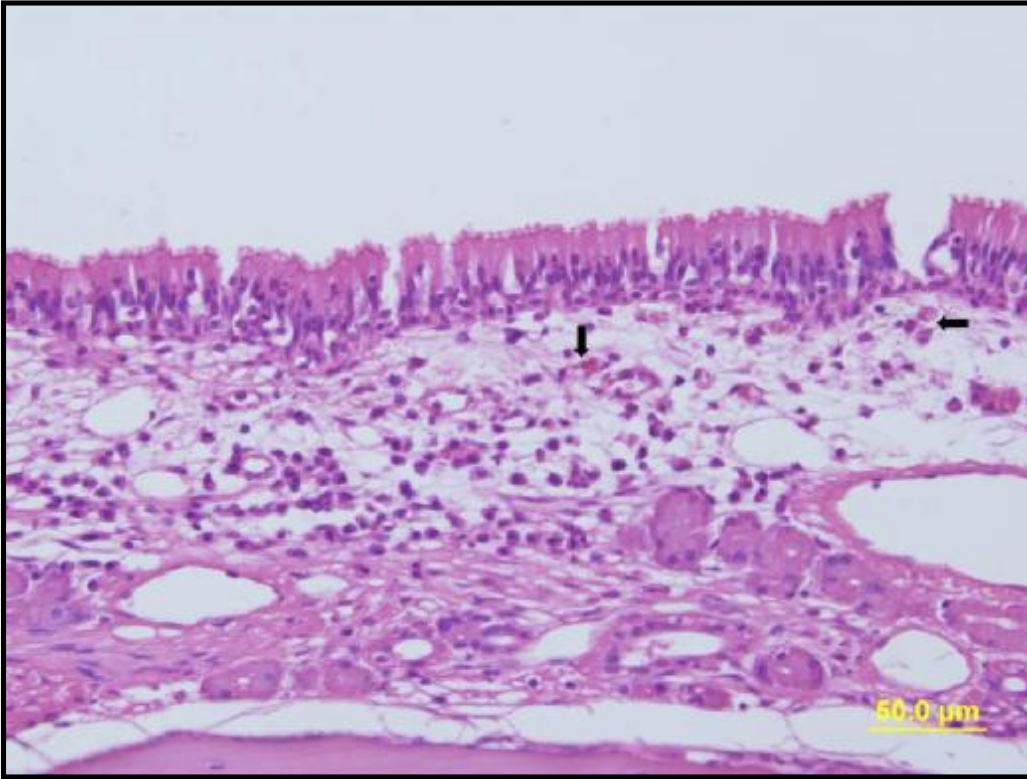
**Şekil 15.** Kontrol grubu genel görünüm HE X100



**Şekil 16.** Allerjik rinit grubu genel görünüm, vasküler proliferasyon, goblet hücrelerinde artış HE X20

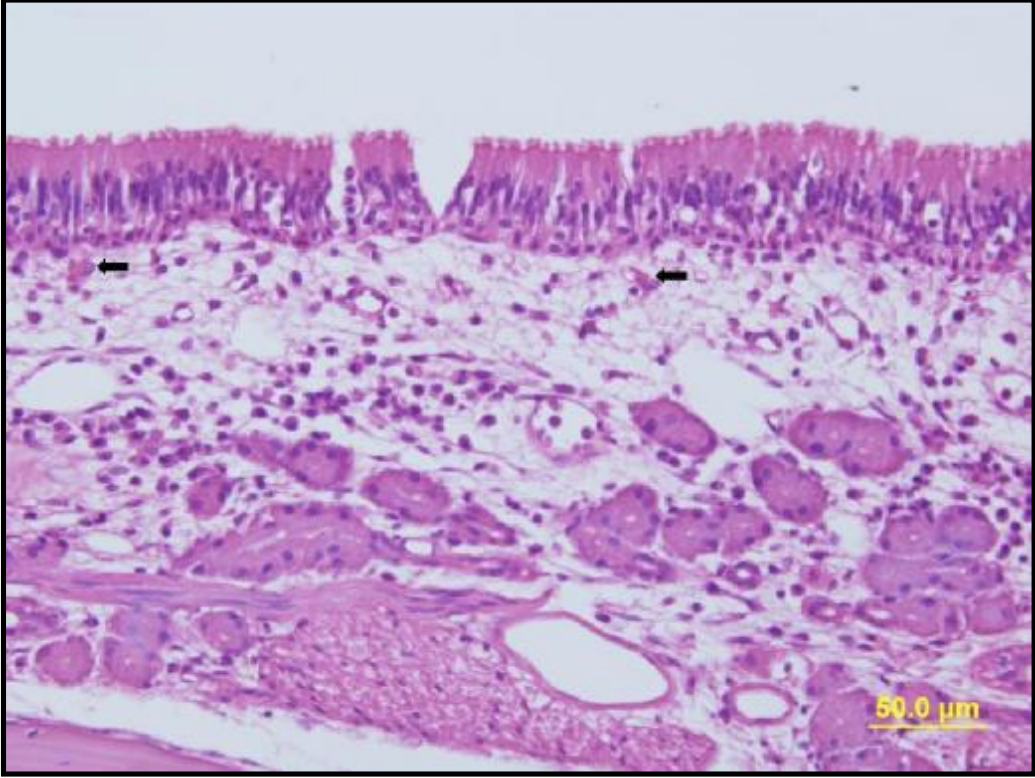


**Şekil 17.** Allerjik rinit grubu genel görünüm, vasküler proliferasyon ve dilatasyon, kondrositlerde hipertrofi HE X20

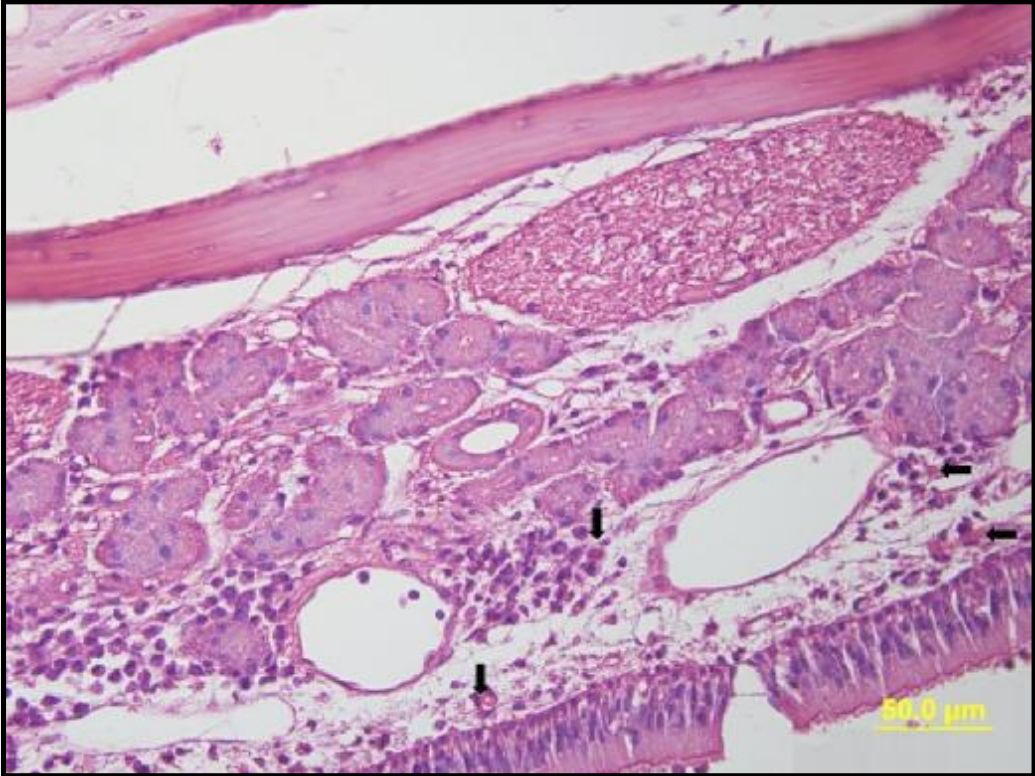


**Şekil 18.** Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış (➡)HE X40

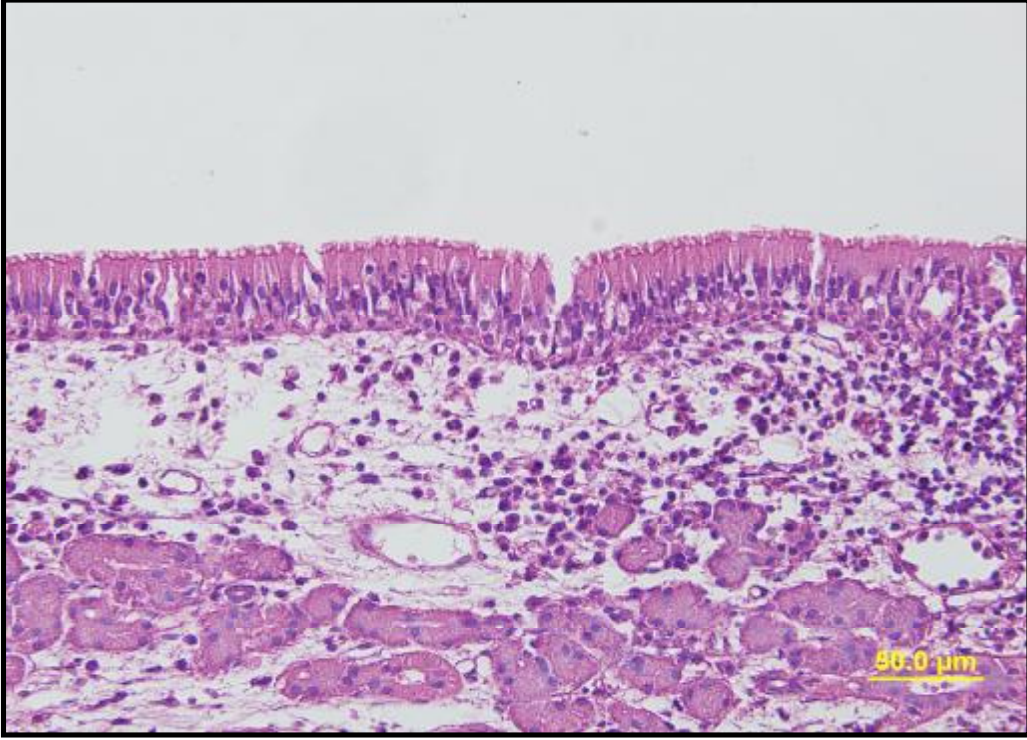




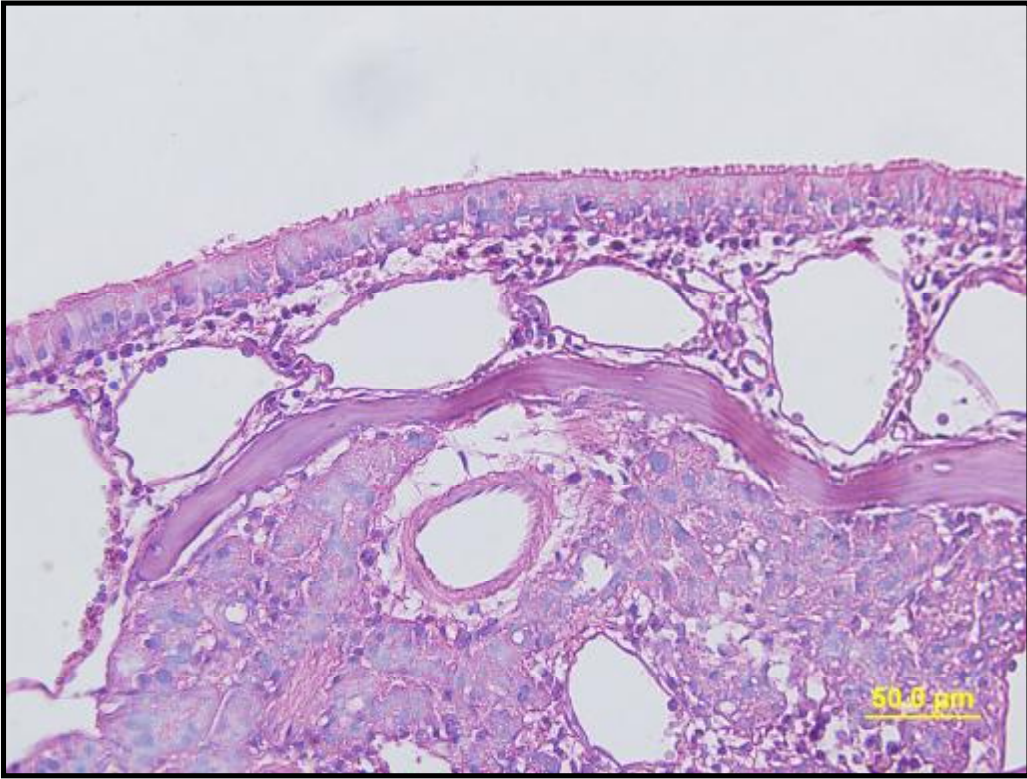
Şekil 19. Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış ( ➡ ) HE X40



Şekil 20. Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış ( ➡ ) HE X40

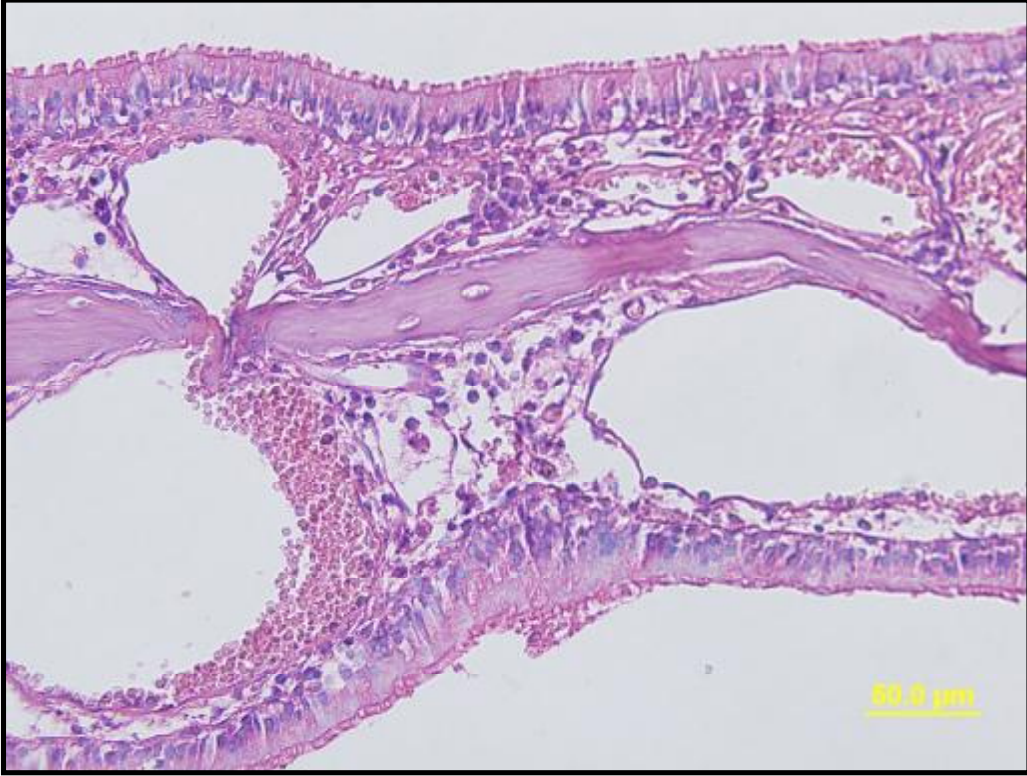


**Şekil 21.** Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış, enflamatuar hücre artışı HE X40

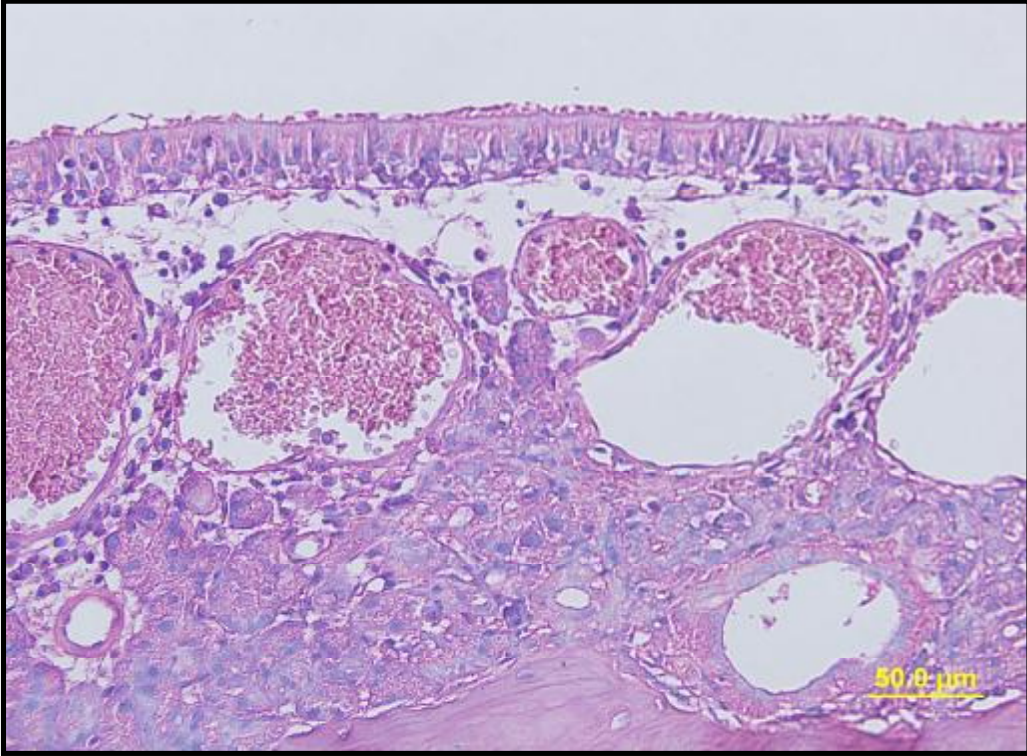


**Şekil 22.** Allerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış HE X40

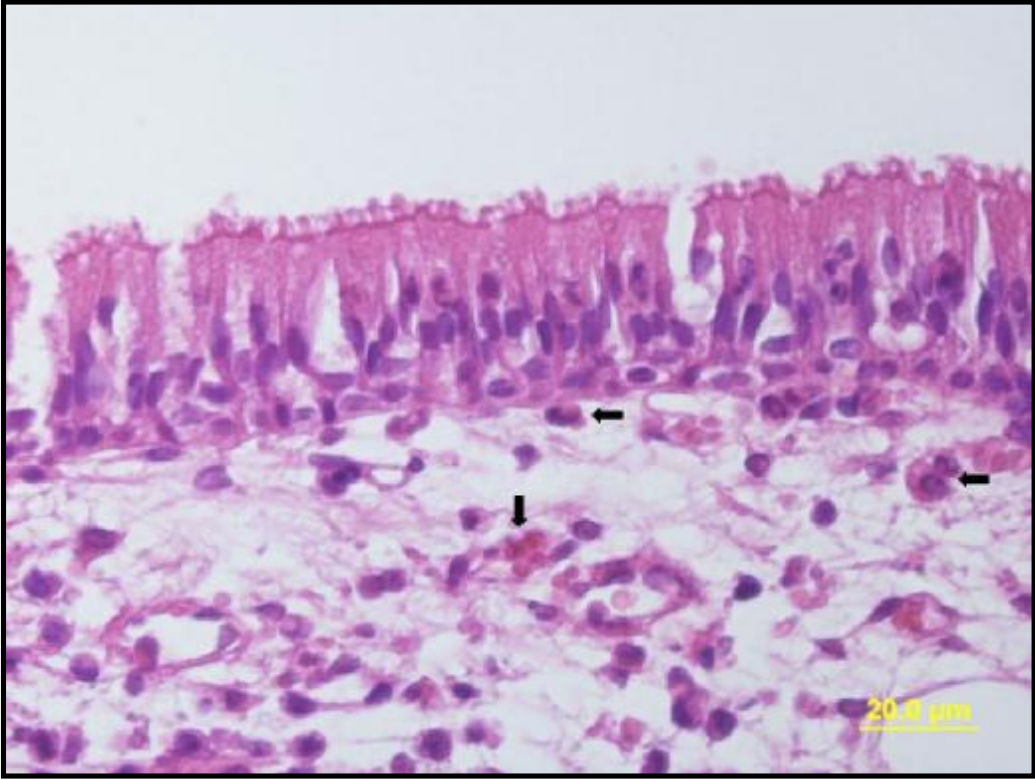




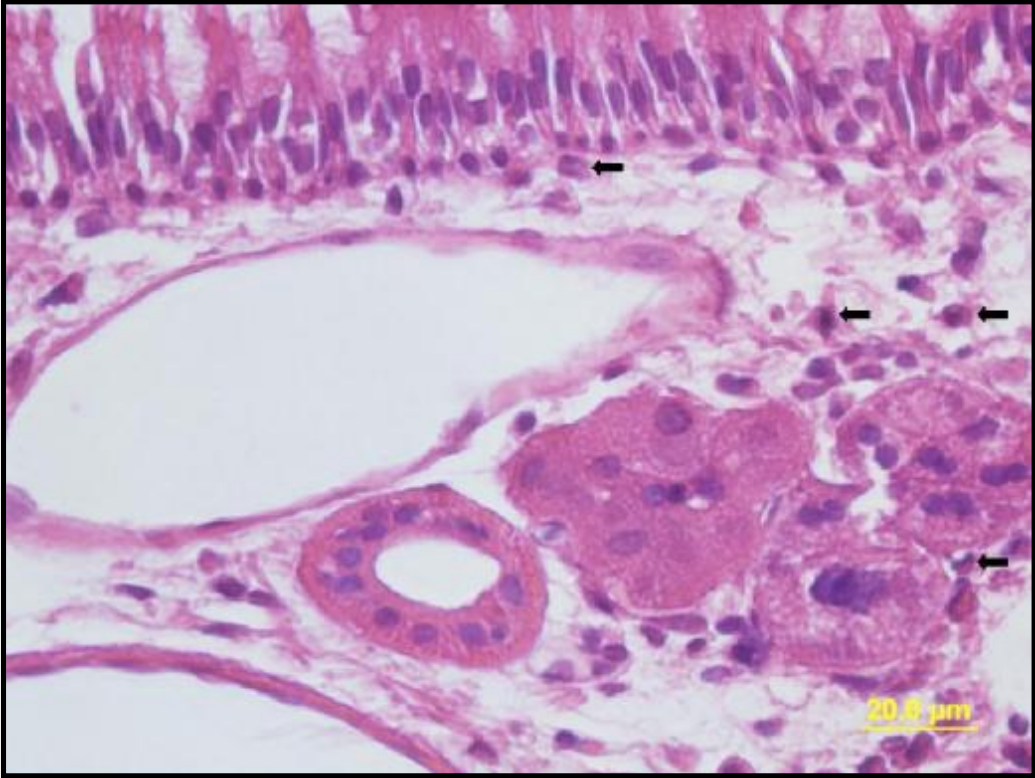
**Şekil 23.** Allerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış ve vasküler konjesyon  
HE X40



**Şekil 24.** Allerjik rinit grubu vaskülarizasyonda artış ve vasküler konjesyon  
HE X40



Şekil 25. Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış ( ➡ ) HE X100

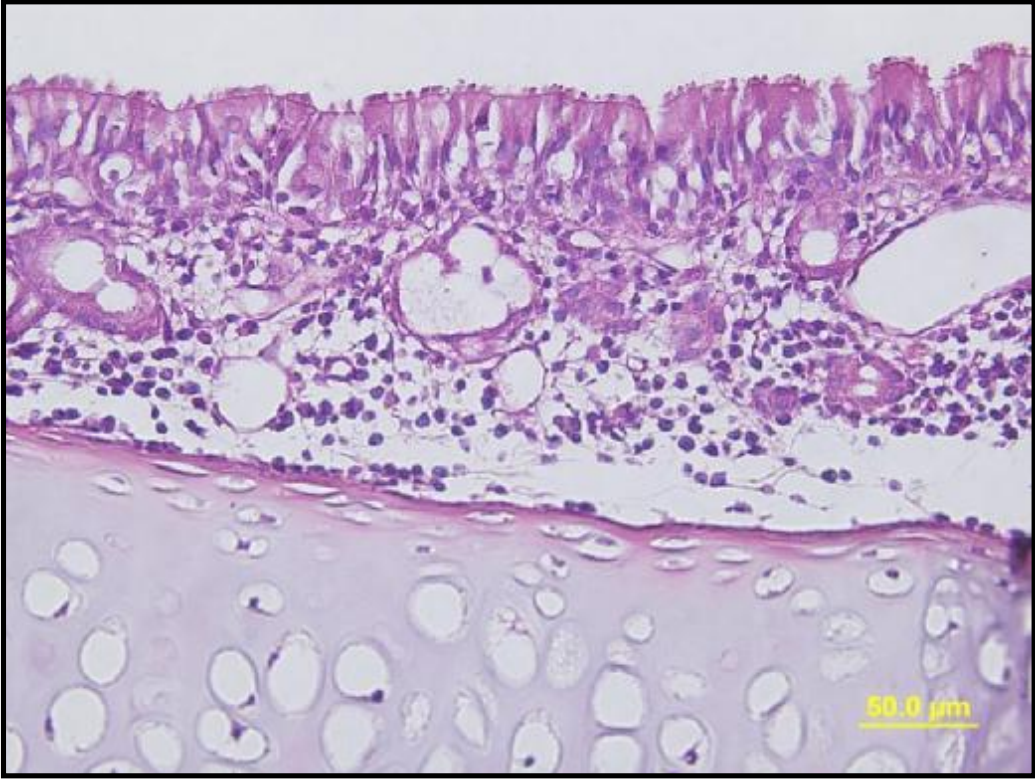


Şekil 26. Allerjik rinit grubu eozinofil hücrelerinde artış ( ➡ ) HE X100

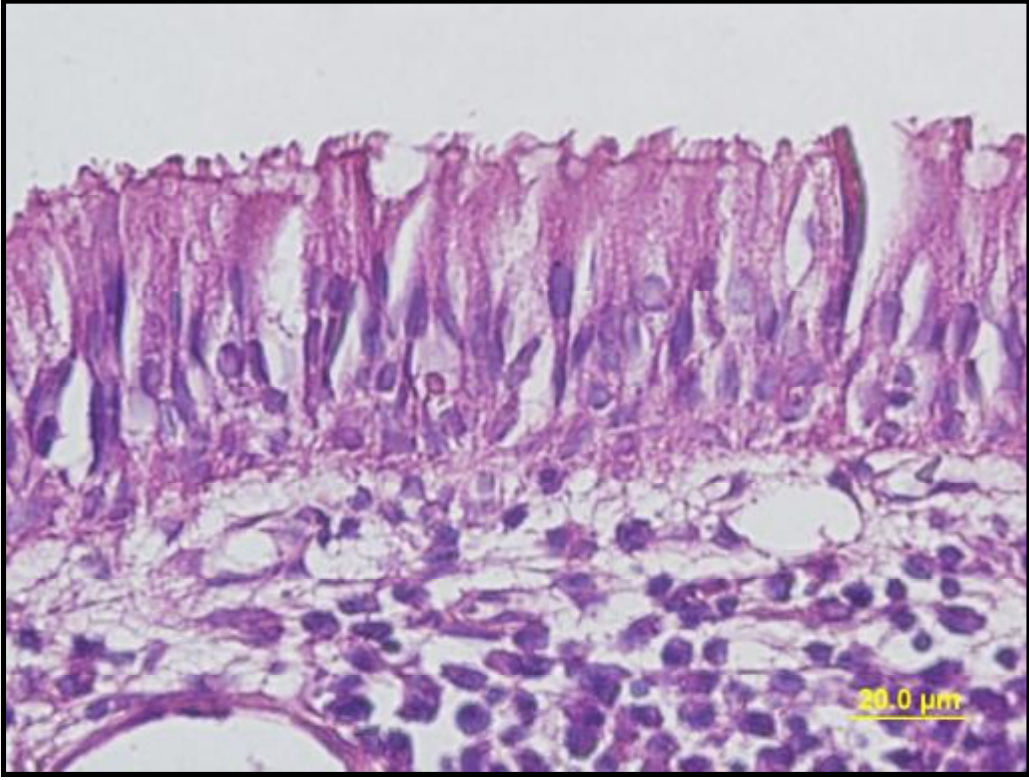




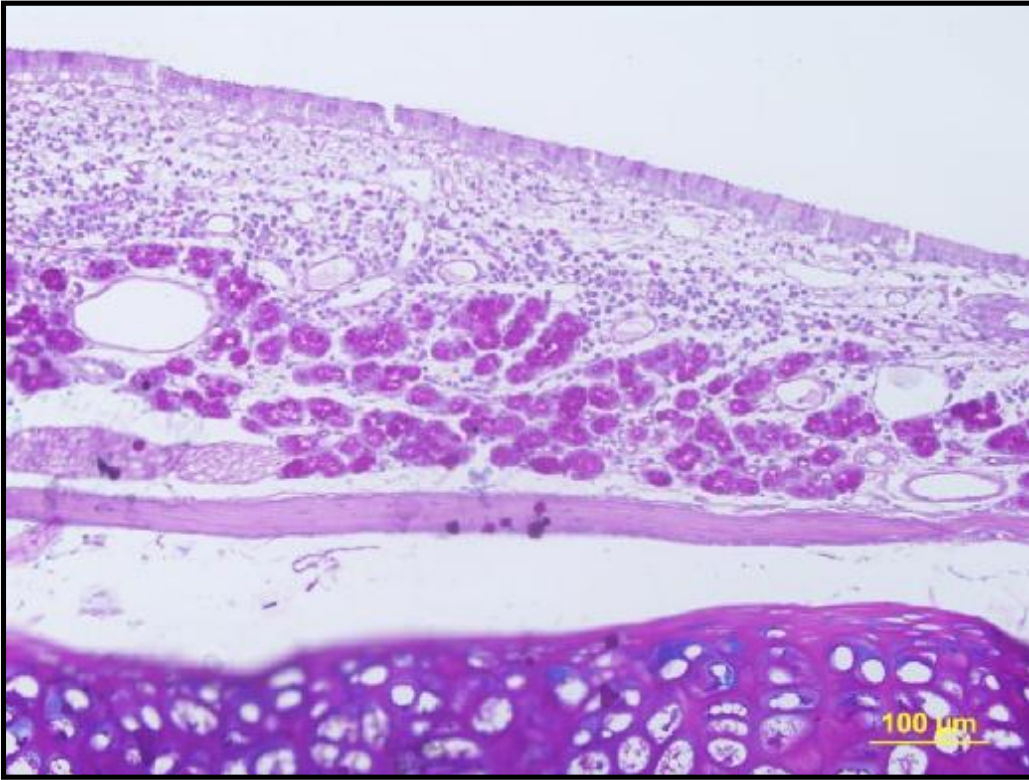
Şekil 27. Tedavi grubu genel görünüm HE X20



Şekil 28. Tedavi grubu genel görünüm HE X40

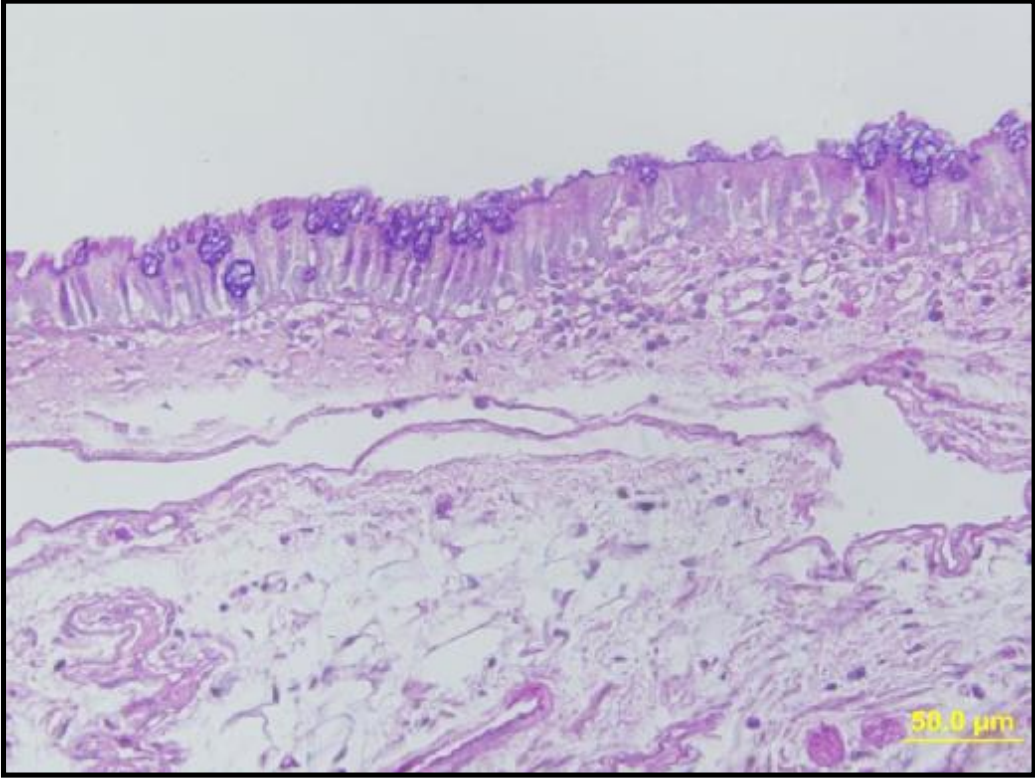


Şekil 29. Tedavi grubu genel görünüm HE X100

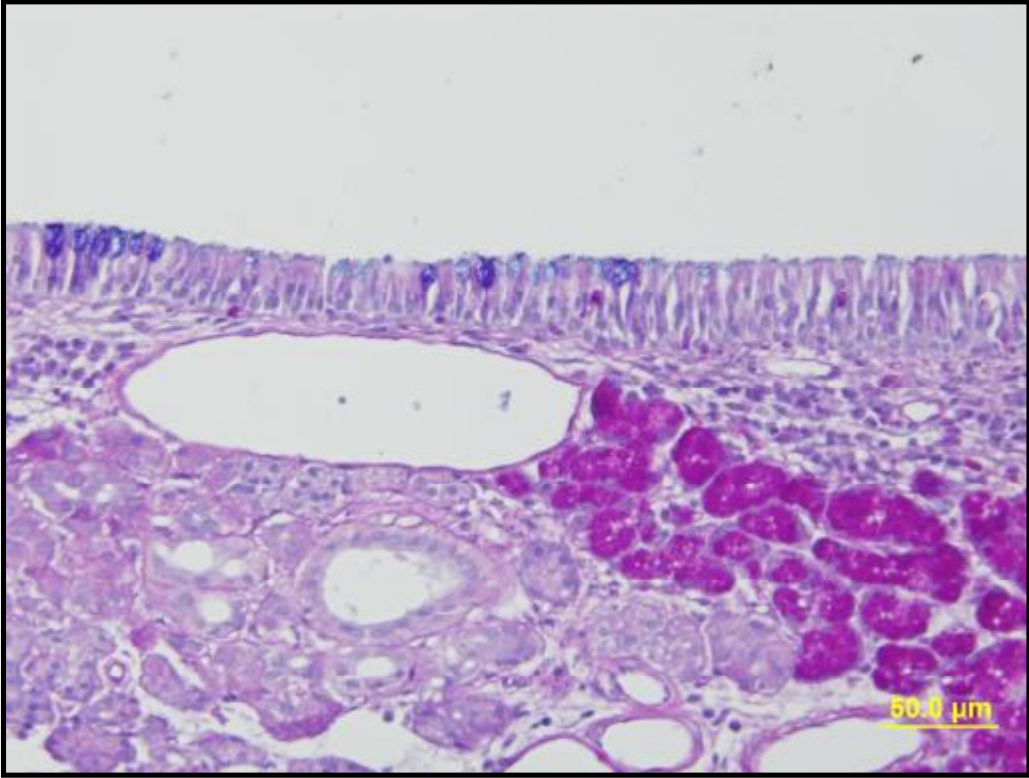


Şekil 30. Kontrol grubu genel görünüm AB/PAS X20

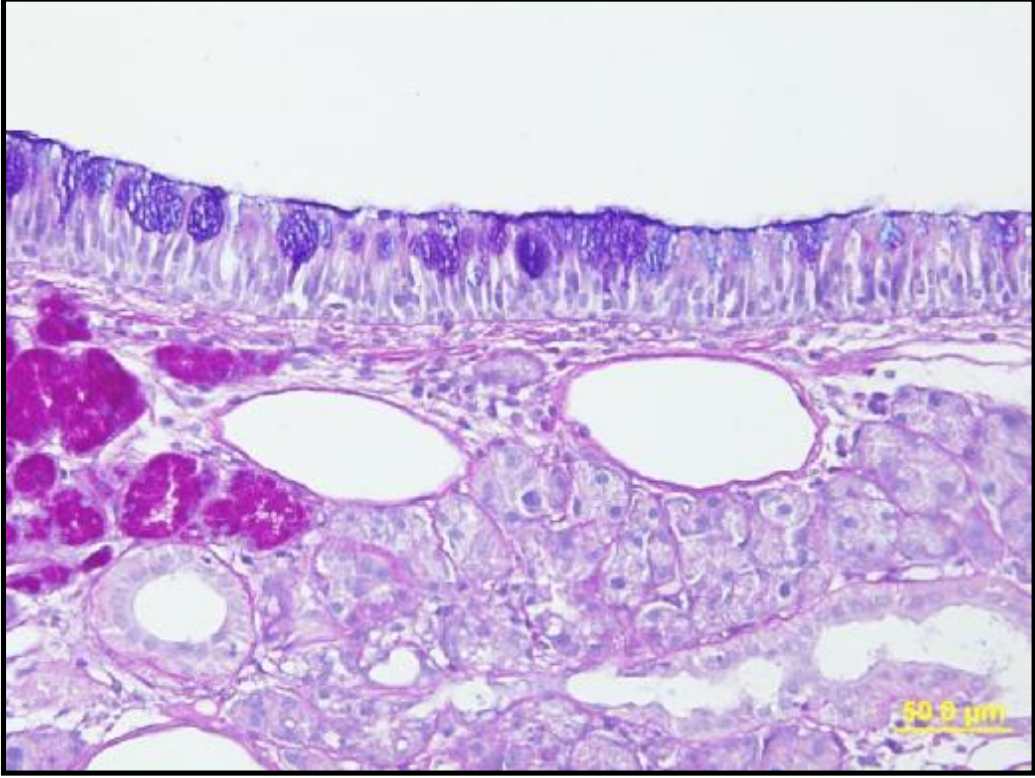




Şekil 31. Kontrol grubu genel görünüm AB/PAS X40



Şekil 32. Kontrol grubu genel görünüm AB/PAS X40

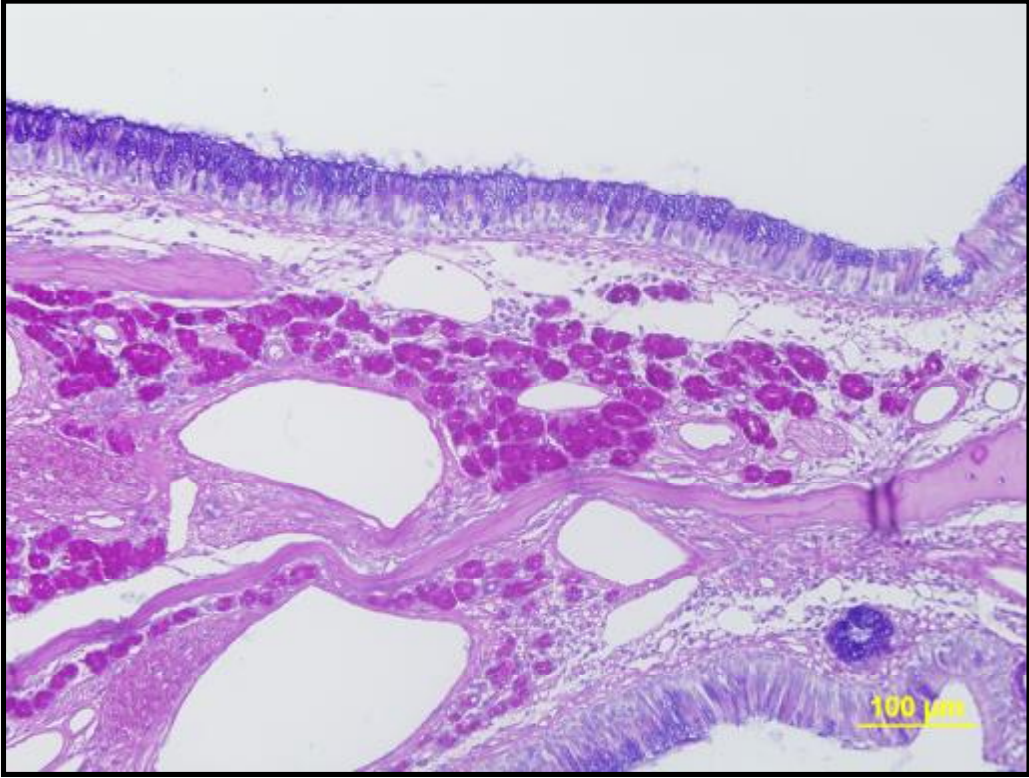


Şekil 33. Kontrol grubu genel görünüm AB/PAS X40

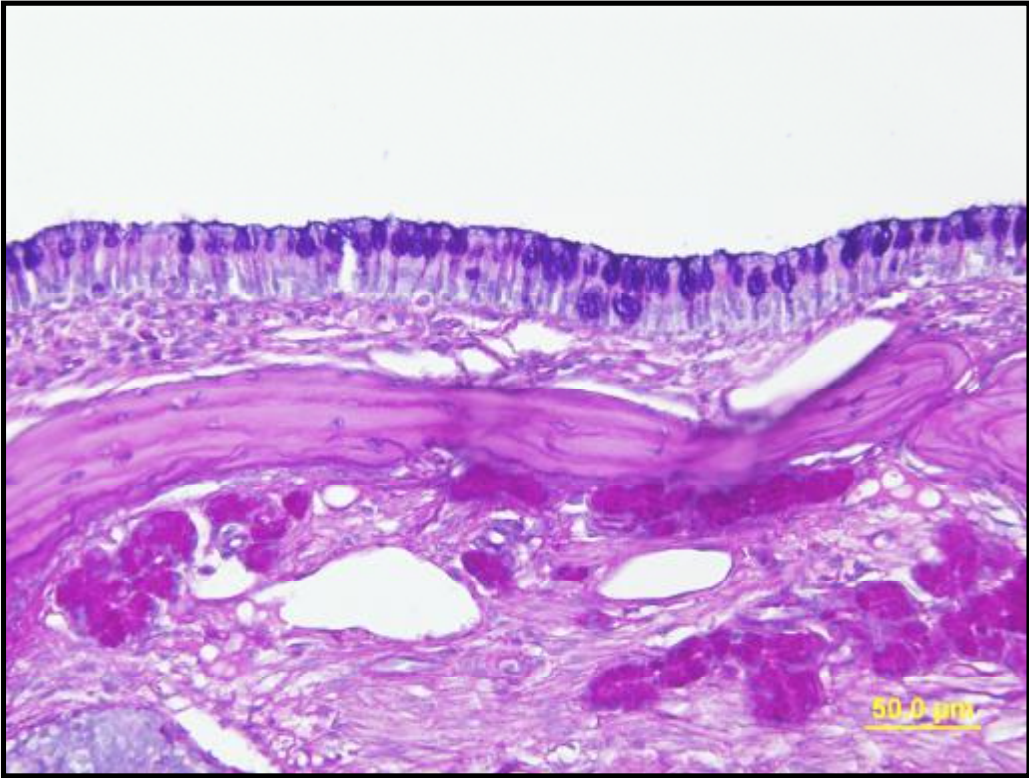


Şekil 34. Allerjik rinit grubu genel görünüm AB/PAS X10

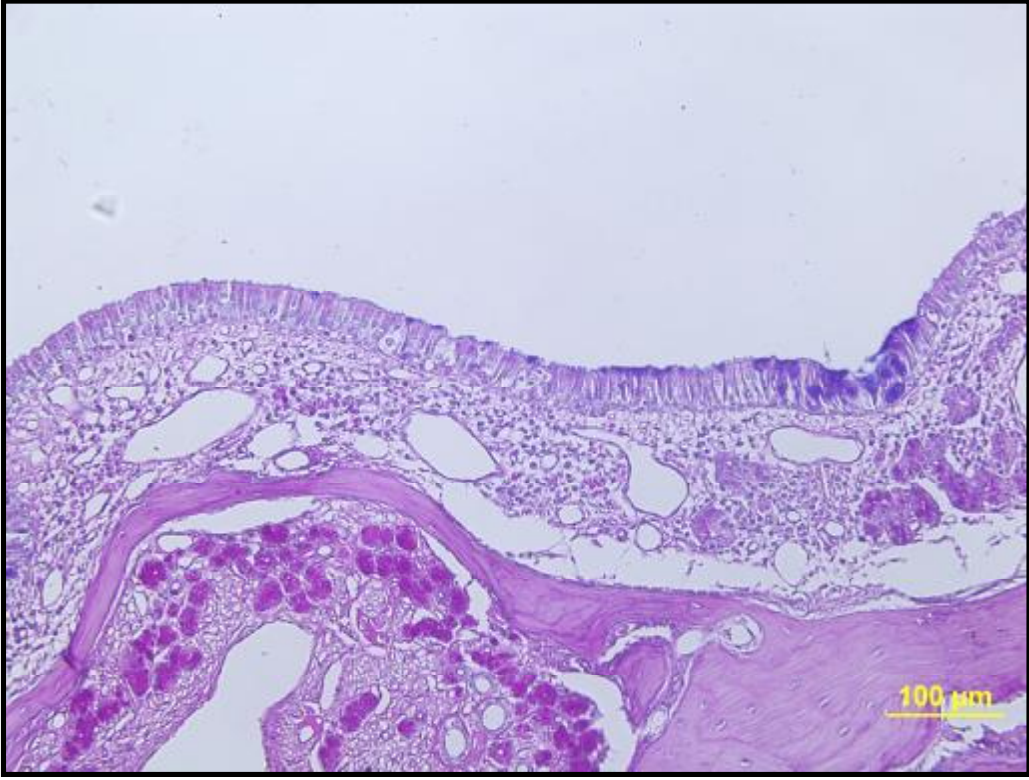




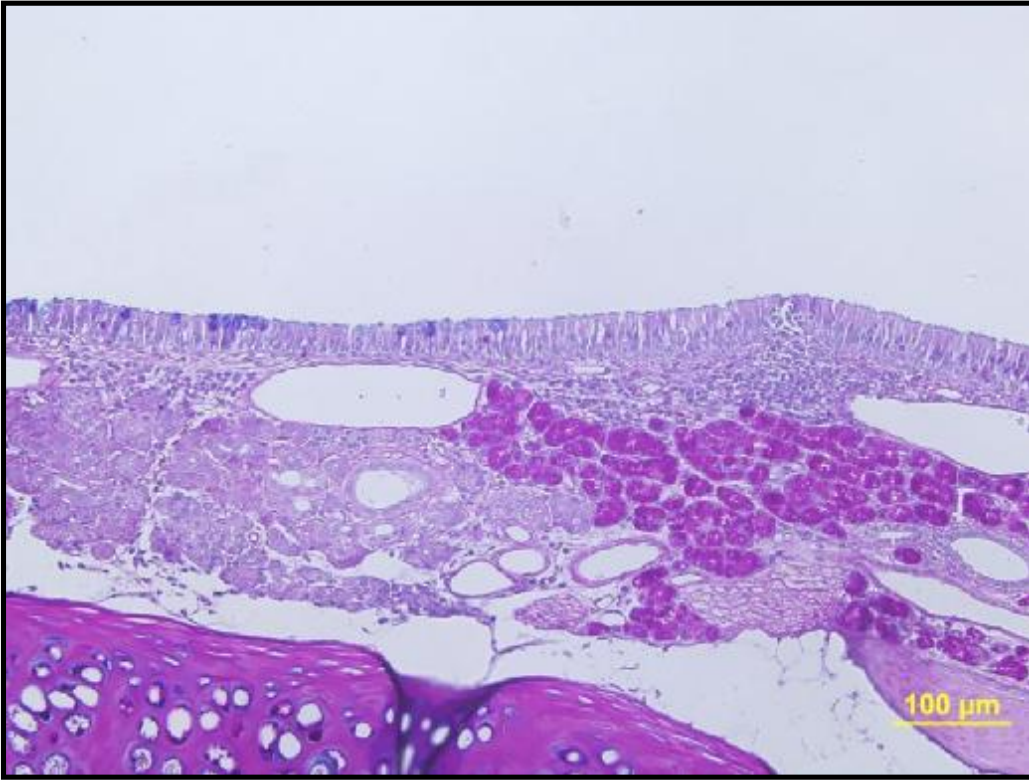
Şekil 35. Allerjik rinit grubu goblet hücrelerinde artış AB/PAS X20



Şekil 36. Allerjik rinit grubu goblet hücrelerinde artış AB/PAS X4

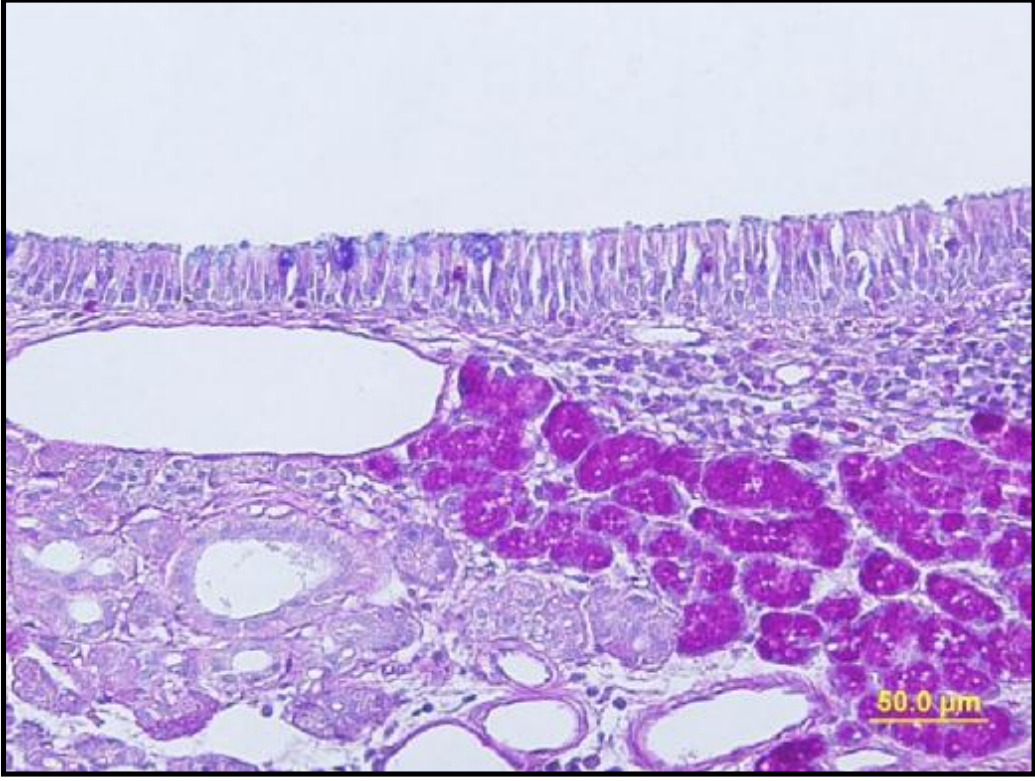


Şekil 37. Tedavi grubu genel görünüm AB/PAS X20

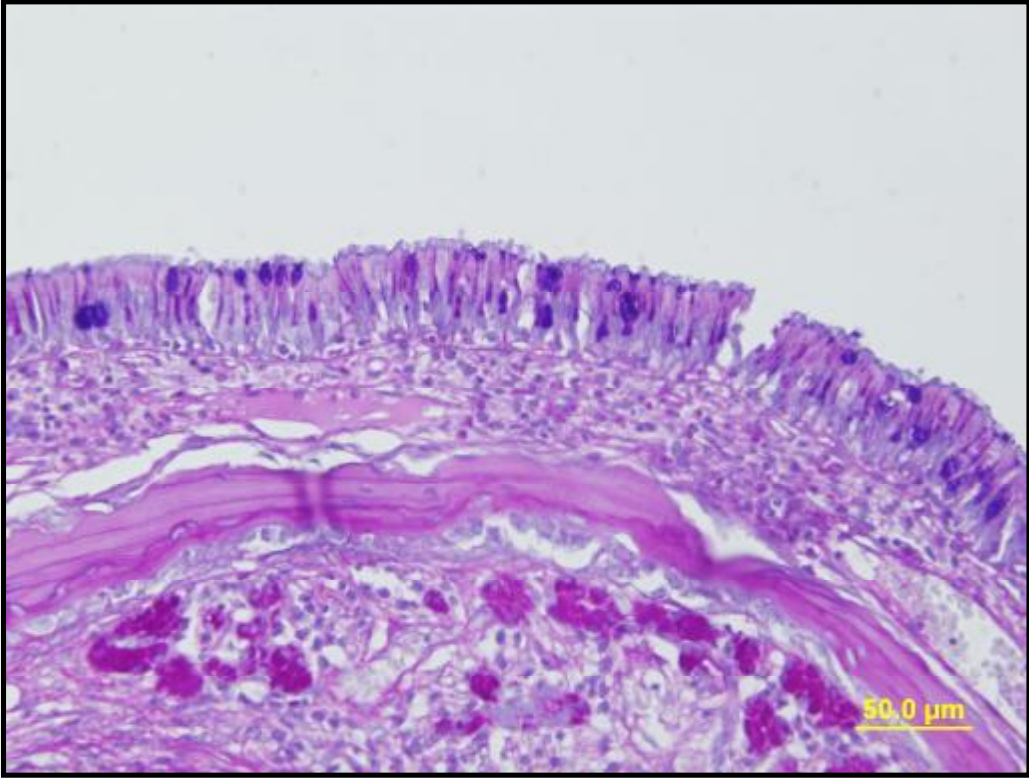


Şekil 38. Tedavi grubu genel görünüm AB/PAS X20





Şekil 39. Tedavi grubu genel görünüm AB/PAS X40



Şekil 40. Tedavi grubu genel görünüm AB/PAS X40

## TARTIŞMA VE SONUC

Alerjik rinit hapşırma, burun akıntısı, burun kaşıntısı, burun tıkanıklığı ile karakterize bir nazal mukoza enflamasyonudur. Dünyadaki teknolojik gelişmeye paralel olarak insidansı giderek artan atopik hastalıklar arasında en sık görülenidir. Genel popülasyonun % 10-30'unu, pediatrik yaş grubunun ise % 35'ini etkilemektedir .

Geçen yüzyılda yapılan araştırmalar alerjik hastalıkların oluşumu ve tedavisi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Alerjik rinit tedavisinde, sorumlu spesifik alerjenden korunma ilk ve en önemli adımdır. Eğer korunma mümkün değilse veya yetersiz kalıyorsa, ilaç tedavisine geçilir. İlaç tedavisinde antihistaminikler, lökotrien inhibitörleri, sistemik ve topikal steroidler, kromolin sodyum ve dekonjestanlar kullanılır. Uygun ilaç ve çevre kontrolünün yetersiz kaldığı durumlarda immunoterapi uygulanabilir (2).

Tedavi arayışları sırasında, alerjik rinit modeli oluşturmak ve bazı ilaçların etkilerini araştırmak için çok sayıda hayvan deneyleri yapılmıştır. Hayvan deneylerinde alerjik rinit oluşturmak için çeşitli maddeler kullanılmıştır. Wen ve ark.'ın (28) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada immünizasyon için ovalbumin önce intraperitoneal 0.3 mg dozda 30 mg alüminyum hidroksit ve 1 ml % 0.9 serum fizyolojik ile birlikte 2 günde bir defa 14 gün boyunca verilmiş; daha sonra alerjik rinit modeli oluşması için yedi gün boyunca 10 µl % 10 ovalbumin intranasal olarak uygulanmıştır. Tedavi grubuna bunlara ek olarak alerjik semptomları önlemeye yönelik olarak 10 U botox uygulanmıştır. OVA ile sensitize edilen grupta hapşırma, burun kaşıma, burun akıntısı gibi tipik alerjik semptomları görülürken tedavi grubunda bu semptomlarda belirgin azalma olduğu saptanmıştır. OVA ile sensitize edilen grupta nazal mukozada eozinofil artışı, vasküler dilatasyon, konjesyon, ödem ve seröz glandlarda hiperplazi saptanırken, botoks uygulamasının bu değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı görülmüştür.

Sugimoto ve ark.'ın (34) farelerde yaptığı çalışmada, immünizasyon için yine ovalbumin önce intraperitoneal olarak 1 mg dozda 2 mg alüminyum hidroksit jel ve pertussis toksin ile birlikte verilmiş ve beş gün sonra uygulama tekrarlanmıştır. Daha sonra 14-42. günler arasında günlük olarak OVA (10 µl, 1 mg/ml) intranasal yolla mikropipet ile uygulanmıştır. Bu hayvanların bir kısmına intranasal sensitizasyonlardan birer saat önce H1 reseptör antagonistleri olan chlorpheniramine, ketotifen, astemizole ve epinastine oral olarak

verilmiş ve bu şekilde tedavi edilen hayvanlarda burun kaşıma hareketi ve hapşırma gibi tipik alerjik rinit semptomlarının belirgin derecede azaldığı bildirilmiştir.

Shimuzu ve ark.'ın (35) fareler üzerinde yaptığı çalışmada immunizasyon için ovalbumin 1, 2, 3 ve 10. günlerde intraperitoneal olarak 200 µg dozda 10 mg alüminyum hidroksit jel ve pertussis toksin ile birlikte verilmiş, ilk immunizasyondan 18 gün sonra üç gün süreyle 0.1 ml serum içinde 5 mg ovalbumin olan solüsyondan intranasal olarak uygulamıştır. Bu hayvanların bir kısmına Th2 sitokin inhibitörü olan suplatast tosilat verilmiş ve bu hayvanlarda nazal eozinofilinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

İnsanlarda alerjik rinitin temel semptomları hapşırma, burun kaşınması ve burun akıntısıdır. Bu yüzden anti-alerjik ilaçların etkinliğini değerlendirebilmemiz için benzer alerjik semptomları gösteren hayvan modellerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışmada tekrarlayan topikal intranasal OVA uygulamaları ile sıçanlarda hapşırma ve burun kaşıma hareketi gibi tipik alerjik rinit semptomlarının ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Tedavi amacıyla verilen doksisisiklinin ise antijen-antikor etkileşimine bağlı gelişen hapşırma ve burun kaşıma hareketini belirgin derecede azalttığı ortaya konmuştur (Tabo 7, 8).

Alerjik rinit hastalarının burun dokularına yönelik yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, lamina propria ve epitel içinde yoğun eozinofil, bazofil/mast hücresi biriktiğini göstermiştir (36). Buna ek olarak alerjik rinitli hastalarının burun salgılarında da yoğun olarak eozinofillerin bulunduğu saptanmıştır (37). Dolaşan enflamatuar hücrelerin enflamasyon alanına nasıl ulaştıkları tam olarak anlaşılmamış olsa da birçok kanıt, enflamatuar hücre adhezyonunu ve ekstrasellüler matris proteinlerinin yıkımının hücre göçünde önemli rol oynadığını göstermiştir (3, 38, 39). Lee ve ark (38), toluene diisocyanate (TDI) ile astım oluşturdukları farelerin bronkoalveolar lavaj sıvılarında enflamatuar hücrelerde (nötrofil, lenfosit, eozinofil gibi), ICAM-1, VCAM-1, MMP-9 proteinlerinde ve m-RNA'larında artış olduğunu saptamışlardır. Bu hayvanların bir kısmına MMP inhibitörleri uyguladıklarında ise enflamatuar hücrelerin yanı sıra ICAM-1, VCAM-1 protein ve m-RNA düzeyinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Braunstahl ve ark. (40) ise, mevsimsel alerjik riniti olan dokuz hastada nazal alerjen ile provakasyon sonrası nazal biyopsi spesmenlerinde nazal provakasyon öncesine göre artmış ICAM-1, VCAM-1 ve eozinofil düzeyleri ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Bu deneysel çalışmalar MMP inhibitörlerinin adhezyon moleküllerini azaltarak enflamatuar hücre migrasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Eozinofiller ve bazofiller gibi dolaşan enflamatuar hücrelerin enflamasyon alanına migrasyonu ve toplanması için bu hücrelerin interstisyum ve kapiller duvarlardan geçmeleri gereklidir (17, 45, 48). Enflamatuar hücreler bu bariyerleri geçmek için ekstrasellüler matriks proteinlerini parçalarlar (3, 38, 41). Ekstrasellüler matriks proteinlerinin yıkımı enflamatuar hücreler tarafından salınan MMP'ler tarafından sağlanır. Alerjik rinitteki enflamatuar hücre göçünden, özellikle nazal mukozadaki ekstrasellüler matriksin ve bazal membranların en önemli bileşenleri olan denature kollajen (gelatin), tip 4 ve 5 kollajen, elastini parçalayan MMP-2 ve MMP-9 (gelatinaz A ve B) sorumlu tutulmuştur (42, 43). Okada ve ark. (44) elektron mikroskopi ile yaptıkları invitro çalışmada yapay bazal membrandan (Bio Coat Matrigel Invasion Chambers) eozinofil transmigrasyonunu incelediklerinde ortama PAF (trombosit aktive edici faktör) ve Il-5 verildiği zaman bazal membrandan eozinofil transmigrasyonu oluştuğunu göstermişlerdir. Ortama bir sentetik MMP inhibitörü olan batimastat veya MMP 9'a spesifik antikorlar verildiğinde ise, eozinofil transmigrasyonunun engellendiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada alerjik rinit modeli oluşturulan grupta in vivo olarak nazal mukozada artan eozinofil ve enflamatuar hücre infiltrasyonunun bir MMP inhibitörü olan doksisisiklin ile tedavi edilen grupta belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 18-21, 25, 26).

Alerjik rinitli hastalarda ayrıca bazal membran kalınlaşması, epitel hücresi kaybı, epitelyal metaplazi, müköz gland hipertrofisi, goblet hücre hiperplazisi, vasküler proliferasyon ve kondrositlerde hipertrofi gibi yapısal değişiklikler olduğu da bildirilmiştir. Bu patolojik değişikliklere doku remodelizasyonu denilir ve epitel hücreleri, fibroblastlar ve enflamatuar hücreler tarafından salınan matriks metalloproteinazları aracılığıyla oluşturulurlar (45). Lim ve ark.'ın (46) yaptığı çalışmada ovalbumin ile alerjik rinit oluşturulan farelerde doku remodelizasyonu ve MMP-9 ekspresyonu araştırılmış, farelerin bir kısmına tedavi amaçlı olarak intraperitoneal deksametazon uygulanmıştır. Alerjik rinit oluşturulan gruptaki farelerde goblet hücre hiperplazisi, submüköz gland hipertrofisi gibi belirgin doku remodelizasyonu bulguları ile belirgin MMP-9 ekspresyonu gözlemlenmiş; deksametazon uygulanan grupta ise bu bulgulara rastlanmamıştır. Bu çalışmada da, alerjik rinit modeli oluşturulan hayvanlarda hematoksilen-eozin boyamalarda respiratuar epitel hücrelerinde sil kaybı, bağ dokusundaki damarlarda belirgin vasküler konjesyon ve vasküler proliferasyon ile kıkırdak dokusunda yer alan kondrositlerde önemli ölçüde hipertrofi izlendi (Şekil 13-23). AB/PAS boyamalarda ise goblet hücrelerinde belirgin artış olduğu görüldü (Şekil 16, 35, 36).

Doksisiklin ile tedavi edilen grupta respiratuar epitel hücrelerinde sil kaybının azaldığı ve kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi: bağ dokusundaki damarlarda az miktarda vasküler konjesyon ve vasküler proliferasyon ortaya çıktığı, kondrositlerdeki hipertrofinin ise azaldığı izlendi (Şekil 24-27). AB/PAS boyamalarda ise alerjik rinit modeli oluşturulan deneklerde görülen goblet hücre artışının doksisiklin ile tedavi edilen grupta gerilediği görüldü (Şekil 35-40).

Matriks metalloproteinazlarının sentez, sekresyon ve aktivitelerinin regülasyonu üç aşamada kontrol edilir; transkripsiyonel regülasyon, proenzim aktivasyonu ve spesifik doku inhibitörleri (TIMP). MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa), interlökin1 (IL-1) gibi enflamatuar sitokinlerin yanı sıra; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile stimüle edilir (Şekil 2). Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-beta (TGF-beta), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (12). Kamba ve ark.'ın (47) yaptığı çalışmada invitro olarak TNF-alfa ile stimüle edilen nazal fibroblastlarda, alerjik rinit tedavisinde etkinliği kanıtlanmış topikal kortikosteroidlerden flutikazon propionatın nazal fibroblastlardan MMP-2 ve MMP-9 salınımını ve MMP-mRNA ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur. Bu sonuç kortikosteroidlerin alerjik rinit tedavisindeki etkinliklerini kısmen de olsa MMP'ler üzerinden gösterdiklerini desteklemektedir. Asano ve ark.'ın (48) alerjik rinit tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir H1-reseptör antagonisti olan feksofenadin hidrokloridin MMP'ler üzerine olan etkilerini incelemek için nazal fibroblastları in vitro olarak TNF-alfa ile stimüle etmişler ve feksofenadin hidrokloridin de benzer şekilde MMP-2, MMP-9 salınımını ve MMP-mRNA transkripsiyonunu azalttığını göstermişler, feksofenadin hidrokloridin alerjik rinit tedavisindeki etkilerinin de bir kısmının MMP aktivitesi inhibisyonu sonucu ortaya çıktığını kanıtlamışlardır. Kamba ve Asono tarafından yapılan çalışmadaki modeller aynı olup, matriks metalloproteinazları gen ekspresyonu aşamasında inhibe edilmiştir.

MMP'lerin transkripsiyonel inhibisyon ve spesifik doku inhibitörleri (TIMP) dışında, Zn<sup>++</sup> atomlarını bağlayarak inaktive olmalarına yol açan sentetik inhibitörleri de mevcuttur. Tetrasiklin gurubu bir antibiyotik olan doksisiklin böyle bir ajandır. Sakakura ve ark.'ın (49) tavşanların üst solunum yollarından doksisiklin emilimini in vitro değerlendirdikleri çalışmada, doksisiklinin tavşan nazal mukozasından diffüzyon ile ve en fazla optimum olan 20 mg/ml dozda emildiğini göstermişlerdir. Bu çalışma, doksisiklinin deneysel alerjik rinit

modelinde tedavi amaçlı olarak topikal intranazal yolla uygulandığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Topikal intranazal olarak 20 mg/ml dozda kullanılan doksisiklinin burun kaşıma, hapşırma gibi tipik alerjik rinit semptomlarını belirgin derecede azalttığının ayrıca tekrarlayan intranazal OVA uygulamaları ile bu semptomlarda artış görülmediğinin belirlendiği bu çalışmada; doksisiklin tedavisi sonrası yapılan histolojik incelemelerde de alerjik rinitte görülen tipik enflamatuar değişikliklerde belirgin azalma olduğu ortaya konmuştur.

Bu sonuçlar MMP'lerin alerjik rinitte önemli fonksiyonları olan proteinazlar olduğunu göstermektedir. Ayrıca topikal intranazal doksisiklinin, özellikle alerjik rinitin geç fazında enflamatuar hücrelerin enflamasyon alanına gelmelerinde etkili olan MMP'leri inhibe ederek alerjik rinitte alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği ortaya konmuştur. Deneysel hayvan modelinden elde edilen kanıtların, çok merkezli çift kör randomize kontrollü klinik çalışmalar ile araştırılması sonrasında alerjik rinit tedavisinde yeni bir seçeneğin ortaya çıkabileceği sonucuna varılmıştır.

## **KAYNAKLAR**

1. Golden PM, Gleason MM, Togias A. Cysteinyl leukotrienes: multifunctional mediators in allergic rhinitis. *Clin and Exp Allergy* 2006;36:689-703.
2. Nagai H, Teremachi H, Tuchiya T. Recent advances in the development of antiallergic drugs. *Allergol Int* 2006;55:35-42.
3. Fenton JE, Jones AS, Nagase H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in nonneoplastic otorhinolaryngological disease. *J Laryngol Otol* 2005;119:436-442.
4. Baltacıoğlu E, Akalın A. Tetrasiklinler ve anti-kollajenaz özellikleri, periodontal tedavide kullanımlarına yeni bir yaklaşım. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 2006;30:97-107.
5. Yücel T. Alerjik rinit fizyopatolojisi, in: Önerci M. Alerjik rinosinüzitler. Ankara 2002:116-122 .
6. Gelardi M, Guidice AM, Candreva T. Nasal resistance and allergic inflammation depend on allergen type. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:384-389.
7. Şahin F, Şahin A. Alerjik rinitte tanı, in: Önerci M. Alerjik rinosinüzitler. Ankara 2002:62-107.
8. Canonica GW, Tarantini F, Penagos M. Efficacy of desloratadine in the treatment of allergic rhinitis: a meta-analysis of randomized, doubleblind, controlled trials. *Allergy* 2007;62:359-366.
9. Aksun S, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin J Med Sci* 2001;21:332-342.
10. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist* 2001;6:415-427.
11. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
12. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
13. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. *T Klin J Med Sci* 2006;26:527-537.
14. Golub LM, Lee HM, Lehrer G. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res* 1983;18:516-526.

- 15.** Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1984;19:651-655.
- 16.** Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-316.
- 17.** Golub LM, Lee HM, Ryan ME. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple nonantimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
- 18.** Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochem Pharmacol* 1988;37:775-778.
- 19.** Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:294-302.
- 20.** Crout RJ, Lee HM, Schroeder K. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol* 1996;67:506-514.
- 21.** Michaelis J, Vissers MC, Winterbourn CC. Human neutrophil collagenase cleaves alpha 1-antitrypsin. *Biochem J* 1990;270:809-814.
- 22.** Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Rifkin B. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:297-321.
- 23.** Burns FR, Stack MS, Gray RD. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1569-1575.
- 24.** Golub LM, Sorsa T, Lee HM. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
- 25.** Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:521-532.
- 26.** Melgert BN, Postma DS, Kuipers I, Geerlings M, et al. Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1496-1503.



27. Brian WP, Kathleen E, Janicle L, Robert L, et al. Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. *Dev Immunol* 2002;9:47–54.
28. Wen WD, Yuan F, Wang JL, Hou YP. Botulinum toxin therapy in the ovalbumin-sensitized rat. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:78–83.
29. Brozmanova M, Calkovsky V, Plevkova J, Bartos V, et al. Early and late allergic phase related cough response in sensitized guinea pigs with experimental allergic rhinitis. *Physiol Res* 2006;55:577–584.
30. Salib RJ, Howarth PH. Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy* 2003;33:1629–1633.
31. Bousquet J, Jacquot W, Vignola A, Bachert C, et al. Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways? *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:43-49.
32. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:119-125.
33. Ercan İ, Cakır B, Başak T, Baltacı G, et al. Effects of topical application of methotrexate on nasal mucosa in rats: a preclinical assessment study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:751-755
34. Sugimoto Y, Kawamoto E, Chen Z, Kamei C. A new model of allergic rhinitis in rats by topical sensitization and evaluation of H1 receptor antagonists. *Immunopharmacology* 2000;48:1–7.
35. Shimizu S, Hattori R, Majima Y. Th2 cytokine inhibitor suplstat tonsilate inhibits antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2009;118:67-72.
36. Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *Allergy Clin Immunol* 1992;89:877-883.
37. Wilson S, Lau L, Howarth PH. Inflammatory mediators in naturally occurring rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1998;28:220-227.
38. Lee KS, Jin SM, Kim H, Lee YC. Matrix metalloproteinase inhibitor regulates inflammatory cell migration by reducing ICAM-1 and VCAM-I expression in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1278-1284.

- 39.** Lee YC, Song CH, Lee HB, Rhee YK, et al. A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1021-1026.
- 40.** Braunstahl GJ, Overbeek SE, Klein A. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:469-476.
- 41.** Delclaux C, Delacourt C, Ortho MP, Boyer V, et al. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;14:288-295.
- 42.** Herouy Y, Mellos P, Bandemir E. Inflammation in stasis dermatitis upregulates MMP-1, MMP-2 and MMP-13 expression. *J Dermatol Sci* 2001;25:198-205.
- 43.** Ohno I, Ohtani H, Nitta Y. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:212-219.
- 44.** Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, et al. Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17:519-528.
- 45.** Nakaya M, Dohi M, Okunishi K, Nakagome K, et al. Prolonged allergen challenge in murine nasal allergic rhinitis: nasal airway remodeling and adaptation of nasal airway responsiveness. *Laryngoscope* 2007;117:881-885.
- 46.** Lim YS, Won TB, Shim WS, Kim YM, et al. Induction of airway remodeling of nasal mucosa by repetitive allergen challenge in a murine model of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:22-31.
- 47.** Namba M, Asano K, Kanai K. Suppression of matrix metalloproteinase production from nasal fibroblasts by fluticasone propionate in vitro. *Acta Otolaryngol* 2004;124:964-969.
- 48.** Asano K, Kanai KI, Suzuki H. Suppressive activity of fexofenadine hydrochloride on metalloproteinase production from nasal fibroblasts in vitro. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1890-1898.
- 49.** Sakakura Y, Majima Y, Mitsui H, Inagaki M, et al. Absorption of various drugs through the rabbit's respiratory mucosa in vitro. *Arch Otorhinolaryngol* 1983;238:87-96.