

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELATONİNİN ALERJİK RİNİT ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ASLI ÇAKIR ÇETİN

FARMAKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2005970151

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELATONİNİN ALERJİK RİNİT ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**FARMAKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

ASLI ÇAKIR ÇETİN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK

BAP Proje Başvuru No: 2016216
(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAG.008 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2005970151

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı,
Farmakoloji Doktora Programı öğrencisi Aslı ÇAKIR ÇETİN, “Melatoninin Alerjik
Rinit Üzerine Etkisinin İncelenmesi” konulu Doktora tezini 08/07/2020 tarihinde
başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa Cenk ECEVİT
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ
ÜYE
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Sedef GİDENER
ÜYE
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Mualla Aylin ARICI
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Barış KARADAŞ
ÜYE
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLOLAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT (İngilizce Özet)	2
1.1. Problemin tanımı ve önemi	3
1.2. Araştırmanın amacı	3
1.3. Araştırmanın hipotezi	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alerjik rinit	4
2.2. Melatonin	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Araştırmanın tipi	12
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	12
3.3. Araştırmanın çalışma grupları	12
3.4. Çalışma materyali	13
3.5. Araştırmanın değişkenleri	13
3.6.1. Davranış deneyleri	14
3.6.1.1. AR oluşturulması	14
3.6.1.2. Semptom skorlaması	15
3.6.2. Biyokimyasal deneyler	16
3.6.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçümü	16
3.6.2.2. Serum IL-13 ölçümü	18
3.6.2.3. Serum melatonin düzeyi ölçümü	20
3.6.3. Histolojik inceleme	23
3.6.3.1. Işık mikroskopik doku takip protokolü	23
3.6.3.2. Hematoksilen&Eozin protokolü	24

3.6.3.3. Alcian Blue Periodik Asid Schiff (AB / PAS) boyaması	25
3.6.3.4. Histolojik değerlendirme	27
3.7. Araştırma planı ve takvimi	28
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	29
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	30
3.10. Etik kurul onayı	31
4. BULGULAR	32
4.1. Nazal semptom skorları	32
4.2. Biyokimyasal bulgular	35
4.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçüm bulguları	35
4.2.2. Serum IL-13 ölçüm bulguları	37
4.2.3. Serum melatonin ölçüm bulguları	38
4.3. Histolojik inceleme	40
5. TARTIŞMA	67
5.1. Ovalbümin ile oluşturulan alerjik rinit modelinin tartışılması	67
5.2. İkinci duyarlılık fazında verilen serum fizyolojik, etanol ve melatoninin alerjik rinit üzerindeki etkilerinin tartışılması	68
5.2.1. Nazal Semptom Skoru Üzerindeki Etkilerin Tartışılması	69
5.2.2. Biyokimyasal ölçümler üzerindeki etkilerin tartışılması	69
5.2.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçümü	69
5.2.2.2. Serum IL-13 ölçümü	71
5.2.2.3. Melatonin düzeyi ölçümü	72
5.2.3. Histolojik incelemeler üzerindeki etkinin tartışılması	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
7. KAYNAKLAR	77
8.1. Etik kurul raporları	84
8.2. ARBİS formatında özgeçmiş ve yayın listesi	87
8.3. Makale örneği ve dergiden alınmış kabul yazısı	91
8.3.1. Makale kabul yazısı	91
8.3.2. Makale metni	92

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Nazal Semptom Skoru	16
Tablo 2. Rütin Doku Protokolü	24
Tablo 3. Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü.....	25
Tablo 4. AB / PAS Protokolü	26
Tablo 5. Grupların toplam nazal semptom skorları	32
Tablo 6. Gruplar arasında bazal, 15., 20., 25. ve 30. günde ölçülen nazal semptom skorlarının karşılaştırılması.....	33
Tablo 7. Gruplar içinde bazal, 15., 20., 25. ve 30. Günlerde ölçülen nazal semptom skorlarının karşılaştırılması.....	34
Tablo 8. Grupların serum ovalbumin spesifik IgE değerleri	35
Tablo 9. Gruplar arasında bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyonda ölçülen serum ovalbumin spesifik IgE değerlerinin karşılaştırılması	36
Tablo 10. Grupların kendi içlerinde serum spesifik ovalbumin IgE değerlerinin bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyondaki değişiminin karşılaştırılması	37
Tablo 11. Grupların serum IL-13 değerleri	37
Tablo 12. Grupların serum melatonin değerleri.....	39
Tablo 13. Grupların histolojik skor ortalamaları.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Alerjik rinit fizyopatolojisinin şematizasyonu.....	6
Şekil 2. Melatoninin etki mekanizması	8
Şekil 3. IFN- γ ve Alerjik Rinit.....	9
Şekil 4. Melatonin ve Alerjik Rinit.....	10
Şekil 5. Melatonin ve IFN- γ	10
Şekil 6. Deney grupları	13
Şekil 7. Alerjik rinit modelinin oluşturulması	14
Şekil 8. Deney hayvanına mikropipetle intranazal ovalbumin uygulanması	15
Şekil 9. Sıçan kuyruk veninden kan alınması.....	16
Şekil 10. Biotin-dedeksiyon antikorlu çalışma çözeltisinin hazırlanması	21
Şekil 11. Araştırma planı ve takvimi.....	28
Şekil 12. Deney gruplarında nazal semptom skorlarının ortalamalarının zamana göre değişimi.....	33
Şekil 13. Deney grupların serum spesifik ovalbumin IgE değerlerinin zamansal değişimi	36
Şekil 14. Deney grupların serum IL-13 değerlerinin zamansal değişimi	38
Şekil 15. Deney grupların serum melatonin değerlerinin zamansal değişimi	39
Şekil 16. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x20	41
Şekil 17. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x40	42
Şekil 18. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x100.....	42
Şekil 19. SF grubu, epitel hücrelerinde sil kaybı ve mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E x40	43
Şekil 20. SF grubu mononükleer hücre infiltrasyonu, eozinofil hücrelerinde artış ve vasküler konjesyon, H&E x100.....	44
Şekil 21. SF grubu eozinofil hücrelerinde artış ve vasküler konjesyon, H&E x100....	45
Şekil 22. SF grubu vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon, H&E x100	46
Şekil 23. SF grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x20	47
Şekil 24. SF grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x40	48
Şekil 25. Etanol grubu epitel hücrelerinde sil kaybı, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vasküler konjesyon, H&E x40	49

Şekil 26. Etanol grubu eozinofil artışı, mononükleer hücre, H&E x100	50
Şekil 27. Etanol grubu eozinofil artışı, mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E x100	51
Şekil 28. Etanol grubu vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon, H&E x100.....	52
Şekil 29. Etanol grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x20.....	53
Şekil 30. Etanol grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x40.....	54
Şekil 31. Melatonin grubu genel görünüm, H&E x20	55
Şekil 32. Melatonin grubunda az miktarda vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon, H&E x40	56
Şekil 33. Melatonin grubunda az miktarda vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon, H&E x100	57
Şekil 34. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, AB / PAS x20	58
Şekil 35. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, AB / PAS x40	59
Şekil 36. SF grubu goblet hücrelerinde artış, AB / PAS x40	60
Şekil 37. SF grubu goblet hücrelerinde artış, AB / PAS x40	61
Şekil 38. Etanol grubu goblet hücrelerinde artış, AB / PAS x40.....	62
Şekil 39. Etanol grubu goblet hücrelerinde artış, AB / PAS x40.....	63
Şekil 40. Melatonin grubu genel görünüm, AB / PAS x40.....	64
Şekil 41. Melatonin grubu goblet hücreleri , AB / PAS x40	65
Şekil 42. Deney gruplarının histolojik skor ortalamaları	66

KISALTMALAR

SF.....	Serum fizyolojik
AR.....	Alerjik rinit
mg.....	miligram
kg.....	kilogram
i.p.....	intraperitoneal
Ig.....	İmmünoglobulin
IL.....	İnterlökin
ANOVA.....	Varyans analizi
Th.....	T helper
GM-CSF.....	Granülosit makrofaj stimüle edici faktör
CD.....	Cluster of differentiation
FC ϵ R1.....	Yüksek afiniteli IgE reseptörü
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
PAF.....	Trombosit aktive edici faktör
LT.....	Lökotrien
VIP.....	Vazoaktif intestinal peptid
CGRP.....	Kalsitonin gen ilişkili peptid
TLSP.....	Tirozin benzeri serin proteaz
Treg.....	T regülatör
pg.....	pikogram
ml.....	mililitre
IFN- γ	İnterferon gama
μ l.....	mikrolitre
°C.....	Santrigrat derece
dk.....	dakika
rpm.....	Revolutions per minute
ELISA.....	Enzyme linked immunosorbent assay
ng.....	nanogram
O.D.....	Optik dansite
nm.....	nanometre
HRP.....	Horseradish peroxidase
SABC.....	HRP- Streptavidin konjugatı
TMB.....	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
EDTA.....	Etilendiamin tetraasetik asit
HE.....	Hematoksilen eozin
AB/PAS.....	Alcian Blue Periodik Asit Schiff
SPSS.....	Statistical Package for the Social Sciences
NF.....	Nükleer faktör
KB.....	kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NO.....	Nitrik oksit
MMP.....	Matriks metalloproteinaz
I- KB.....	İnhibitör of kappa-light-chain-enhancer of activated B cell

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde sonsuz destek ve emeği bulunan, tüm aşamaları titizlikle yöneten ve beni her zaman cesaretlendiren tez danışmanım Prof. Dr. Yeşim Tunçok'a, kritik katkı ve önerilerinden dolayı yardımcı danışmanım Prof. Dr. Mustafa Cenk Ecevit ve Doç. Dr. Mualla Aylin Arıcı'ya, proje ekibimizde yer alarak her aşamada çok değerli görüş ve katkılar sağlayan tüm proje ekibi hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, istatistiksel analize sağladığı eşsiz öneri ve yorumlarından ötürü Prof. Dr. Pembe Keskinoglu'na, doktora yaptığım dönem boyunca hoşgörü ve anlayışlarını eksik etmeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı kıymetli öğretim üyelerine, deneyler sırasında yardımlarını esirgemeyen Deney Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve personeline, tüm bu süreç boyunca ilgi ve şefkatiyle bana destek olan başta sevgili babam ve annem olmak üzere canım aileme ve fedakarlığı ve sevgisiyle stresli zamanları kolayca atlatabilmemi sağlayan biricik yol arkadaşım sevgili eşime çok teşekkür ederim.

MELATONİNİN (BAĞIMSIZ DEĞİŞKEN) ALERJİK RİNİT ÜZERİNE (BAĞIMLI DEĞİŞKEN) ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Aslı ÇAKIR ÇETİN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji,
Balçova, İzmir
asli.cakir@deu.edu.tr

ÖZET

Amaç: Ovalbuminle oluşturulan sıçan alerjik rinit (AR) modelinde melatoninin terapötik etkinliğinin araştırılması.

Yöntem: Ovalbumin ile AR oluşturulan Wistar sıçanlara günlük sırasıyla 10 mg/kg melatonin veya etanol içeren SF veya SF i.p. enjekte edildi. 1,15, 20, 25 ve 30. günde nazal semptom skorları; 1., 15. ve 30. günlerde Ovalbumin-spesifik IgE, IL-13 ve melatonin düzeyleri ölçüldü. Sıçanların nazal mukozası histopatolojik olarak silyum azalması veya kaybı, goblet hücrelerinde artışı, vasküler proliferasyon ve konjesyon, inflamatuvar hücrelerin artışı, kondrosit hipertrofisi ve eozinofil infiltrasyonu açısından skorlandı.

Bulgular:

Grupların bazal ölçümleri benzerken ($p>0.05$); SF, etanol ve melatonin gruplarında, 15. günde, nazal semptom skorları kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$). 30. günde SF ve etanol gruplarının nazal semptom skorları kontrol grubuna göre artmış bulunurken ($p<0.05$), melatonin grubu kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0.05$). Grupların bazal ölçümleri benzerken ($p>0.05$); 15. ve 30. günlerde SF ve etanol gruplarının Ovalbumin-spesifik IgE değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p>0.05$). 30. günde melatonin grubunun Ovalbumin-spesifik IgE değerleri kontrol grubuna benzerken ($p>0.05$), SF ve etanol gruplarının kontrol grubundan yüksekti ($p<0.05$). Serum IL-13 ve melatonin değerlerinde gruplar arası fark saptanmadı ($p>0.05$). Etanol ve SF gruplarının histolojik skorları, kontrol ve melatonin gruplarına göre yüksek bulunurken ($p<0.05$), kontrol ve melatonin grupları benzerdi ($p>0.05$).

Sonuç: Melatonin, ovalbuminle oluşturulan sıçan AR modelinde, toplam nazal semptom skoru, serum Ovalbumin-spesifik IgE ve histolojik inflamasyon parametreleri açısından terapötik etkinliğe sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Alerjik rinit, ovalbumin, melatonin, sıçan, Ovalbumin-spesifik IgE

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MELATONIN (INDEPENDENT VARIABLE) ON ALLERGIC RHINITIS (DEPENDENT VARIABLE)

Aslı ÇAKIR ÇETİN

Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,
Pharmacology, Balçova, İzmir
asli.cakir@deu.edu.tr

ABSTRACT (İngilizce Özet)

Objective: To investigate the therapeutic effects of melatonin in the ovalbumin-induced rat allergic rhinitis (AR) model.

Method: Wistar rats were divided randomly into control, ethanol, saline (SF) and melatonin groups. The experimental AR model was established with ovalbumin in melatonin, ethanol and SF groups; 10 mg/kg melatonin, ethanol, and saline were administered, respectively. Total nasal symptom scores were recorded on days 1,15, 20, 25 and 30; serum Ovalbumin-specific IgE, IL-13, and melatonin were measured on days 1, 15 and 30. Nasal mucosa of rats was scored histopathologically.

Results: All baseline measurements of the groups were similar ($p>0.05$). The nasal symptom scores were higher in SF, ethanol and melatonin groups on day 15 compared to the control group ($p<0.05$). On day 30, the scores of SF and ethanol groups were higher than control ($p<0.05$), while the melatonin group was similar to the control ($p>0.05$). On day 15 and 30, Ovalbumin-specific IgE values of SF and ethanol groups were higher than control ($p>0.05$). On day 30, the results of the melatonin group were similar to the control ($p>0.05$), while those of the SF and ethanol groups were higher than control ($p<0.05$). There was no difference between serum IL-13 and melatonin values between groups($p>0.05$). Histological scores of ethanol and SF groups were higher than the control and melatonin groups ($p<0.05$), while control and melatonin groups were similar($p>0.05$).

Conclusion: Melatonin improved nasal symptom scores, serum ovalbumin specific IgE, and histological inflammation parameters in ovalbumin-induced rat allergic rhinitis model.

Keywords: Allergic rhinitis, ovalbumin, melatonin, rat, Ovalbumin-specific IgE

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin tanımı ve önemi

Alerjik rinit (AR), burun içi mukozanın kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. AR tedavisi semptomatik olup, yalnızca alerjik inflamatuvar reaksiyonun sonucunda açığa çıkan mediyatörlerin istenmeyen etkilerini gidermeye yöneliktir. Hastalığın fizyopatolojisini tamamen ortadan kaldıracabilecek ve hastalığı tümüyle iyileştirebilecek immünoterapi dışında bir tedavi henüz bilinmemektedir. Ancak immünoterapi de endikasyon alanı sınırlı, masraflı ve zahmetli bir tedavidir. AR tedavisinde kullanılan kortikosteroidler gibi antiinflamatuvar ilaçlar da ciddi advers etkileri nedeniyle uzun süreli olarak kullanılamamaktadır. Son yıllarda melatonin, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri nedeniyle çeşitli alerjik inflamatuvar hastalıklarda kullanılmakta olduğu ve deneysel çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edildiği dikkati çekmektedir. Melatonin, fizyopatolojik özelliklerinin diğer alerjik inflamatuvar hastalıklardakine benzer olması nedeniyle alerjik rinit tedavisinde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Alerjik rinitte melatoninin etkililiğini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.2. Araştırmanın amacı

Çalışmamızın amacı, deneysel sıçan alerjik rinit (AR) modelinde melatoninin etkili olup olmadığının araştırılmasıdır.

1.3. Araştırmanın hipotezi

H₁ Hipotezi: Melatonin sıçan alerjik rinit modelinde terapötik etkinliğe sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alerjik rinit

Alerjik rinit (AR), burun içindeki nazal müköz membranların IgE aracılı inflamasyonu ile karakterize, etiyolojisinde atopi ve çevresel faktörlerin rol oynadığı, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşıırma ve/veya burunda kaşıntıya sebep olan üst hava yollarının kronik bir hastalığıdır (1-4).

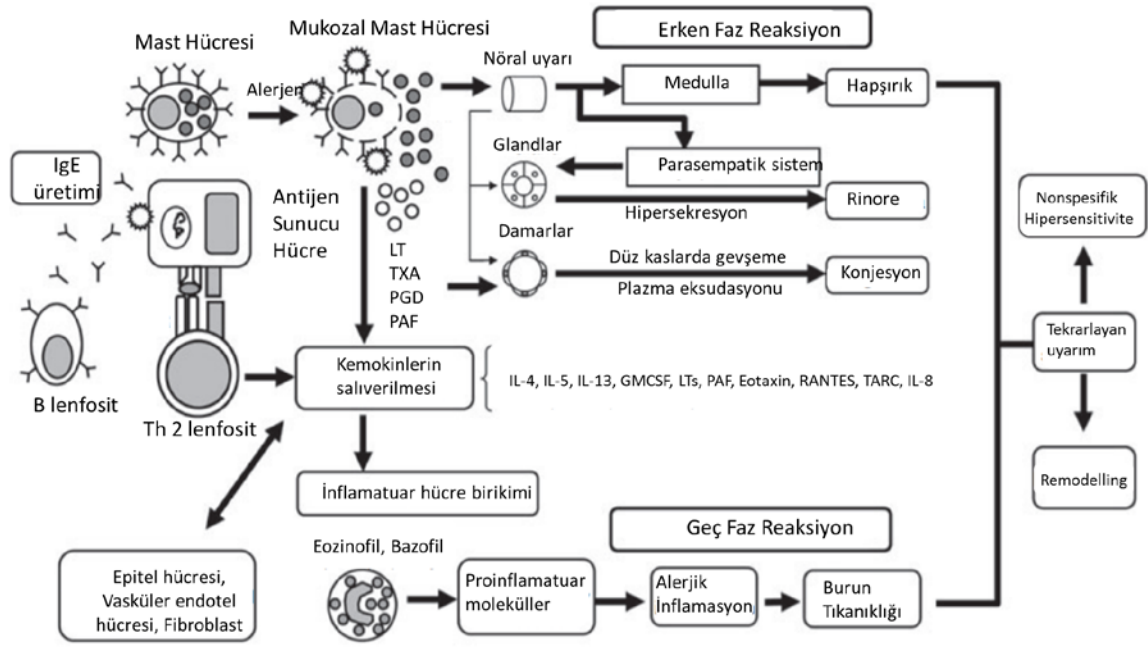
Alerjene maruz kalındığında, burun mukozasındaki antijen sunucu hücreler olan dendritik hücreler (Langerhans hücreleri) alerjeni endositozla alır, proteolizise uğratarak peptid dizilerine ayırır ve alerjenin antijenini kendi yüzeyindeki MHC-Class II antijen tanıma bölgesinde eksprese eder, ardından da bölgesel lenf noduna taşınarak henüz farklılaşmamış T helper 0 (Th0) CD (*cluster of differentiation*) 4+ T lenfositlerle tanıştırlar (1, 5). Bu duruma cevaben, Tip 2 innate lenfoid hücrelerden salıverilen başlıca IL-4 olmak üzere çeşitli sitokin ve transkripsiyon faktörü aracılığıyla Th0 hücreler Th2 lenfositlere farklılaşırlar ve bu hücrelerden de interlökin (IL-3, IL-4, IL-5) ve de granülosit makrofaj stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi sitokinler salgılanarak eozinofillerin matürasyonu, aktivasyonu ve kemotaksisi (IL-5 aracılığıyla) ve B lenfositlerden IgE sentezlenmesi (IL-4 ve IL-13 aracılığıyla) indüklenir. MHC-Class II T lenfosit etkileşimi sonrası T hücre yüzeyinde CD 40 ligandı ortaya çıkar ve bu ligand B hücre yüzeyindeki CD 40 ligandıyla birleşir, ardından da sırasıyla CD 28 ile B7 ligand etkileşimi olur. Bu etkileşim sayesinde bazofillerden ve T lenfositlerden salıverilen başta IL-4 olmak üzere IL-4 ve IL-13, B lenfositleri aktivasyonuna katkı sağlar. Aktive olan B lenfositler ise olgunlaşarak plazma hücrelerine dönüşür. B hücreleri aktive olmuş plazma hücrelerine dönüştükten sonra tanıştırılmış olan alerjene özgü IgE antikorlarını üretirler. Spesifik IgE antikorları dokulardaki mast hücreleri ile dolaşımdaki bazofillerin hücre duvarındaki reseptörlerine (FcεR1) bağlanır. Böylece belli bir alerjene karşı duyarlı hale gelen organizma alerjenle tekrar temas ettiğinde, alerjen, kendisine özgü IgE reseptörleri (FcεR1) ile yüklü mast hücrelerine bağlanır ve bunun sonucunda mast hücrelerinin degranüle olmasına neden olur (Şekil 1, 1, 2, 6-9).

Mast hücrelerinin degranülasyonu ile hücre içerisinde hazırda bulunan çeşitli mediyatörler (histamin, proteazlar, proteoglikanlar ve TNF (tumor necrosis factor)-α ortama hemen salıverilirken trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrienler (LTC4, LTD4, LTE4) ve prostaglandinler (PGD2) sentezlenerek dakikalar içinde açığa çıkar (10, 11). Erken faz olarak bilinen bu süreçte histamin aracılığıyla hem doğrudan, hem de mukozada bulunan trigeminal sinir uçlarının uyarılmasıyla ortaya çıkan aksonal refleks sonucu P maddesi, Nörokinin-A, vazointestinal peptid (VIP) ve kalsitonin geni

ilişkili peptid (CGRP) aracılığıyla vasküler permeabilitede artış, plazma eksüdasyonu, submukozal bezlerden nazal sekresyonların artması (sulu burun akıntısı) ve buna bağlı konjesyon (ödem), hapsirik, kaşıntı ve Nöropeptid Y aracılığıyla nazal kanlanmada azalma (soluk mukoza) görülür (1, 7, 8). Histamin miktarı hapsirik dışında diğer bulgularla her zaman korele olmayabilir, hatta AR olmayan kişilerin nazal sekresyonlarında yüksek miktarda histamin bulunabilir ancak lökotrienler ve prostaglandinlerin miktarı genellikle erken yanıtta ortaya çıkan semptomlarla koreledir (1).

AR geç fazı genellikle alerjenle temastan sonra 4-6 saat içerisinde başlar, 6-12 saat sonra pik yapar. Bu faz genel olarak erken faz semptomlarının uzaması ile karakterize, T lenfositler, bazofiller, eozinofiller ve epitel hücrelerinin başrolü oynadığı bir inflamasyon tablosudur (1, 8). Mast hücrelerinden sentezlenerek açığa çıkan interlökinler (IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13), GM-CSF ve TNF- α gibi sitokin ve kemokinler bu fazda görevlidir (10, 11). Sentezlenen bu mediyatörler, endotel hücrelerinde vasküler adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak nazal mukozanın eozinofilik, bazofilik ve T lenfositik infiltrasyonuna katkıda bulunur (7). Dört-sekiz saat içerisinde, dokudaki bu inflamatuvar hücreler aktif hale geçerek, bu kez kendi inflamatuvar mediyatörlerini salıvermeye başlar. Aktive olmuş epitelyal hücreler timik stromal lipopoetin (TLSP), IL-25 ve IL-33 salıvererek Th2 yanıtına katkıda bulunur, bir kısmı da apoptozise gider (2). IL-5, IL-25 ve IL-33 eozinofiliden sorumludur. Doku hasarı, inflamatuvar (özellikle eozinofilik) hücre infiltrasyonu, epitelyal atrofi, goblet hücre hiperplazisi ve ekstraselüler matriks kalınlaşması ile karakterize, burun tıkanıklığının belirgin semptom olduğu bu remodelling süreci AR'nin geç fazının sonucudur (Şekil 1) (6, 7, 9, 12, 13).

Th2 lenfosit yanıtının baskılanmamasında düzenleyici T lenfositlerin (Treg) de özellikle IL-10 aracılığıyla rolü vardır (2, 13). AR'li hastalarda Treg hücre sayısı ve fonksiyonlarında azalma gösterilmiştir (14).



Şekil 1. Alerjik rinit fizyopatolojisi((15) numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

AR hastalarında alerjene maruz kaldıktan sonra total nazal semptom skorunda artma ve pik nazal inspiratuvar flowmetre değerlerinde belirgin bir düşme gözlenir. Maksimum semptom skoru beşinci dakika civarında elde edilirken pik nazal inspiratuvar flowmetredeki düşüş 30. dakikada en belirgin seviyesine ulaşır. Bu parametrelerdeki değişiklikler ilk iki saat içerisinde azalarak devam eder ve altıncı saate kadar yapılan ölçümlerde bazal değerlere dönmese de plato çizerek devam eder (13). Erken ve geç faz mediyatörlerin burun içi konsantrasyonlarına bakıldığında, nazal sekresyon içerisinde triptaz beşinci dakika maksimum seviyesine ulaştıktan sonra total nazal semptom skorlarında olduğu gibi giderek düşme eğilimindedir. IL-13 30. dakikadan, IL-4 ve IL-5 ise ikinci saatten itibaren giderek artar ve altıncı saatte maksimuma ulaşır (13). IL-5'in nazal konsantrasyonu 1000 pg/ml'e ulaşırken (0-1000 pg/ml) bunu IL-13 takip eder (0-200 pg/ml). IL-5 ve IL-13 arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. IL-4'ün nazal konsantrasyonu ise çok daha düşüktür (0-30 pg/ml, (13).

AR'yi modifiye edebilen tek tedavi yöntemi subkutan veya sublingual yolla uygulanabilen immünoterapidir (16). İki uygulama arasında doz ve süre açısından farklılıklar vardır. Etkin bir immünoterapi ile hastanın spesifik bir alerjene karşı olan cevabı Treg hücreler indüklenerek Th2 aracılığı alerjik yanıtı Th1 aracılı non alerjik yanıtı dönüştürülür (16). Treg hücreler, IL-10 ve TGF- β salıvererek alerjen spesifik IgA seviyelerini artırır, böylece IgE ve IgG4 seviyesi azalır (17). Bununla birlikte, subkutan immünoterapinin genellikle 3-5 yıl boyunca yüksek doz antijen içeren 30-80 enjeksiyon

gerektirmesi nedeniyle tedavi uyumu düşüktür. Ayrıca sistemik alerjik reaksiyon yapma gibi ciddi bir yan etkisi mevcuttur (18). Subkutan immünoterapi uygulanabilmesi için, deri testleri veya serum spesifik IgE ile bir veya iki alerjene olan duyarlılığın tanısının konulması gerekir. Farmakoterapi ile kontrol altına alınamayan şiddetli AR'de, farmakoterapi ile yan etkiler görüldüyse, hasta farmakoterapiye devam etmek istemiyorsa veya hafif-orta AR'ye astım eşlik ediyorsa subkutan immünoterapi endikedir. İmmün yetmezlik, otoimmün hastalık varlığı, <5 ve >60 yaş, gebelik, kardiyovasküler hastalık, beta-blokör kullanımı ve malignite durumlarında subkutan immünoterapi kontrendikedir (18-21). Metaanalizlerde immünoterapi, toplam nazal semptom skorları üzerine en az intranazal mometazon furoat sprey kadar etkili, antihistaminikler ve montelukasttan ise daha etkili bulunmuştur (19, 20).

Bunların dışında AR tedavisinde hastalığın patofizyolojisinde rol oynayan çeşitli sitokin, reseptör ve interlökinlere karşı deneysel olarak geliştirilen bazı antikörlerin etkililiği de uzun yıllardır araştırılmakta olup henüz sonuçlandırılmamıştır (21, 22).

2.2. Melatonin

Epifiz bezindeki suprakiazmatik nükleus'tan salıverilen melatonin (5- metoksi N-asetil triptamin), sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkileri yanı sıra son yıllarda bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri nedeniyle de üzerinde önemle durulmakta olan bir nörohormondur (23, 24). Epifiz dışında memelilerde over, lens ve kemik iliği hücreleri; sıçanlarda da dalak, timus, trombositler ve diğer bağışıklık sistemi hücreleri gibi pek çok dokunun da melatonin sentezlediği bilinmektedir (25-27). Triptofan N-asetiltransferaz enzimiyle N-asetil serotonine ve hidroksiindol-O-metiltransferaz enzimiyle de melatonine dönüştürülür. N-asetiltransferazın aktivitesi ışığa duyarlı olarak periyodik şekilde düzenlenir. Işık varken suprakiazmatik nükleus ve diğer hipotalamik yapılar uyarılırken, karanlıkta noradrenalin aracılığıyla depolardan serotonin ve N-asetiltransferaz salıverilir (26). Gece 20.00-23.00 arası melatonin seviyesi giderek artar ve 01.00-05.00 sularında pik yapar. Normalde serum melatonin seviyesi gündüz koşullarında 0-20 pg/ml, gece ise 20-200 pg/ml (ort. 60-70 pg/ml) civarındadır (26). Hormon yüksek lipofilik ve kısmi hidrofilik özelliktedir. Oral yoldan jelatin kapsül içinde veya etanol içerisinde çözülerek intravenöz veya intraperitoneal yoldan verilebilir.

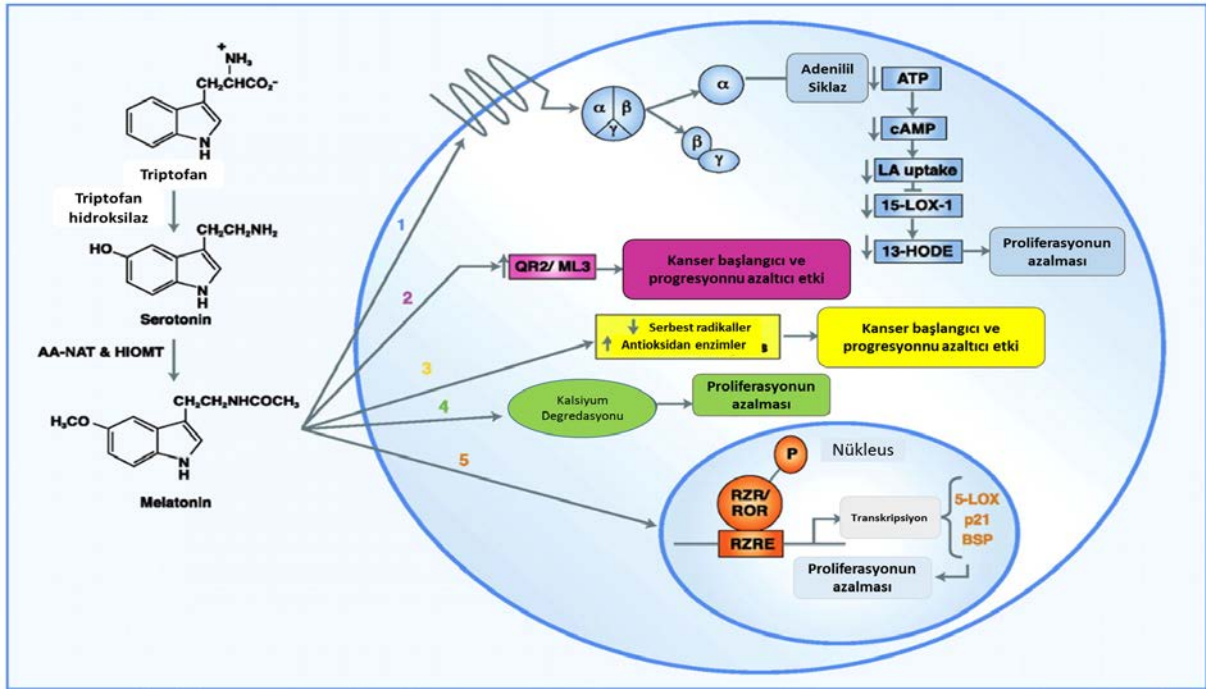
Intraperitoneal olarak sıçanlara 10 mg/kg verildiğinde biyoyararlanımı %74 olup, verilişinden itibaren ilk 1 saatte başlangıç serum konsantrasyonunu çok büyük ölçüde korur ancak sonra hızlıca düşerek yaklaşık 4 saat sonra başlangıç konsantrasyonun 1/1000'ine kadar geriler. Karaciğerde metabolize edilir, %1 oranında da idrarla değişmeden atılır (28). Sıçanlara dışarıdan verilen melatonin (10 mg/kg/gün, p.o, 10 gün) verilmeyenlere göre serum melatonin düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmamış,

benzer şekilde ışıklı ortamda yaşayan grupla kontrol grubu arasında da serum melatonin düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (29).

Işık aktivasyonu ile sentezi azalan melatoninin, bağışıklık sistemi üzerine olan mevsimsel ve gün içi sirkadiyen etkileri fotoimmünomodülasyon içerisinde tanımlanmaktadır. Pek çok omurgalı hayvan ve insan üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, ışığa maruziyet süresi azaldıkça, özellikle kış aylarında uyku sırasında, melatonin düzeyinin daha yüksek olduğu ve artan melatonin düzeyinin, bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir (23).

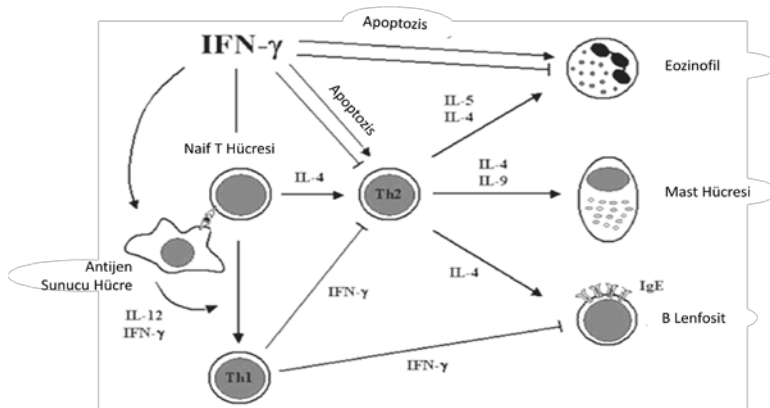
İnsan ve diğer memeli hayvanlarda melatonin etkilerini;

1. G-protein kenetli membran reseptörleri (ML-1 ve ML-2 veya MT1 ve MT2, veya Mel 1a ve Mel1b şeklinde isimlendirilmekte, bazı kaynaklarda ML-3 veya MT3 reseptörlerinden de bahsedilmekte ancak sıçanlarda bu reseptörlerinin varlığı bilinmemektedir),
2. Çekirdek reseptörleri,
3. Kalsiyum kalmodulin,
4. Antioksidan özellikleri aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Şekil 2) (30, 31).

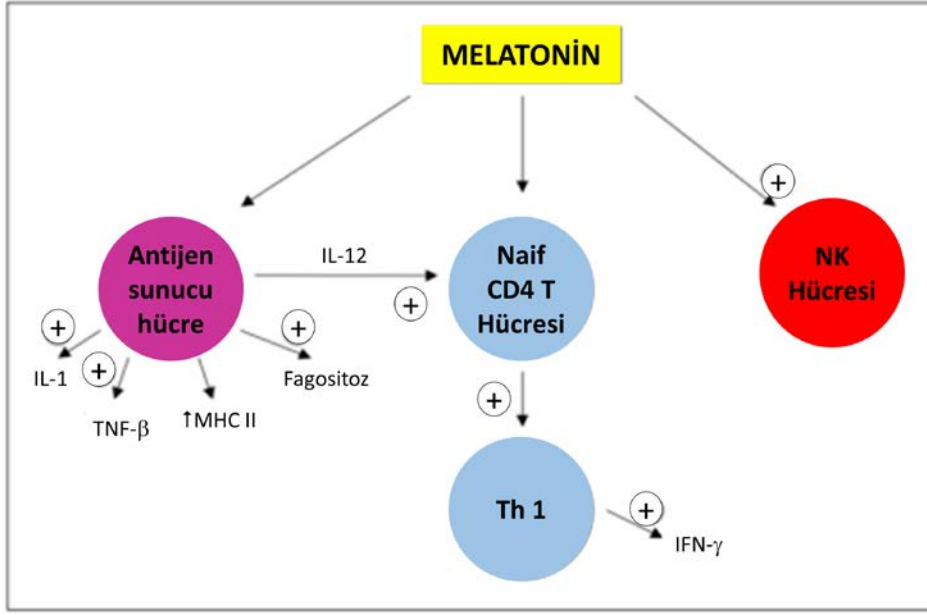


Şekil 2. Melatoninin etki mekanizması ((31) numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.)

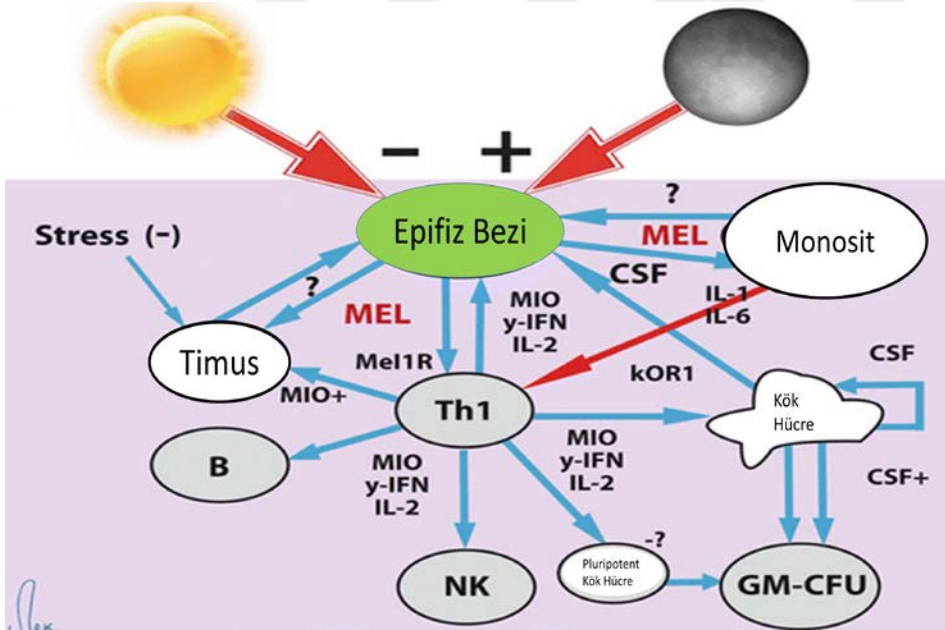
Sıçanlarda ML-1 (MT1 veya Mel1a) reseptörleri, kortekste ve suprakiazmatik nükleusta yaygın olarak yer alırken ML-2 (MT2 veya Mel1b) reseptör yoğunluğu çok daha düşüktür. ML-1 reseptörünün kortikal dağılımı sirkadiyen ritimle ilişkili değilken, suprakiazmatik nükleusta en yoğun olduğu zaman gece yarısıdır (32). Serebral yerleşiminin yanı sıra periferik organlarda (dalak, timus ve buradaki tüm lenfosit tipleri, kaudal arter, vb.) melatonin reseptörleri mevcuttur (33-36). Membran reseptörleri monodimer, homodimer veya heterodimer olarak yerleşebilir (37). Reseptör sonrası sinyal mekanizmaları monomerik durumda genellikle cAMP üzerinden, dimerik durumda ise fosfolipaz C ve proteinkinaz C yolağı üzerinden gerçekleşse de farklı sinyal mekanizmaları olduğu da bilinmektedir (33, 37). Çekirdek reseptörlerinin ise kortikosteroidlerde olduğu gibi inflamasyon, immün cevap, hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmalarında kilit rol oynayan ve mast hücrelerinin tetiklediği sinyal mekanizmalarından biri olan NF-KB'nin transkripsiyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (38). Bu nöroimmünhormon, bazı interlökinlerin (IL-10, IL-6, IL-1 ve IL-2 gibi) üretimini sağlar; T lenfosit aktivitesini artırır ve lenfosit çoğalmasını düzenler; böylece dolaylı olarak antikor üretimini artırır. Melatonin monositlerden, IL-2 varlığında, IL-12 üretimini artırarak T helper lenfositlerin T helper 1'e dönüşmesini sağlar ve böylece T helper 1 hücrelerden üretilen IFN- γ ve IL-2 sitokinlerinin artırılması sağlanmış olur. Artan IFN- γ melatonin sentezini artırır. Artan IL-2 ise IL-12 sentezini artırır ve böylece pozitif feedback kaskadı oluşur (Şekil 3-5). Ayrıca IL-2 seviyesinin artması Natural Killer (NK) aktivitesinin artmasını da sağlar (30, 39-41). IL-2 üretiminin artması, insan T lenfositleri üzerinde de benzer etkilere sahiptir (42). Yüksek dozda (>100mg/kg) ve uzun süre uygulandığında ise reseptör down regülasyonu ile immünoşüpresyon yapmaktadır (43).



Şekil 3. IFN- γ ve Alerjik Rinit ((44) numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.)



Şekil 4. Melatonin ve Alerjik Rinit ((41) numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.)



Şekil 5. Melatonin ve IFN-γ ((45) numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.) .MIO: Melatoninle indüklenen opioidler, CSF: Koloni uyarıcı faktörler, GM-CFU: Granülosit monosit koloni yapıcı ünite, MEL:Melatonin

Melatoninin reseptörler aracılı olmayan etkileri de vardır. Bunlardan biri olan kalmodulin aracılı etkileri genellikle meme kanseri ile ilişkilendirilmekte ve kalsiyumun melatonin aracılığıyla kalmodulinden ayrılmasıyla hücre siklusunun yavaşlayarak meme kanseri büyümesinin durduğu öne sürülmektedir. Sağlıklı hücrelerde ise melatonin antiapoptotik etkiye sahiptir (46).

Melatoninin antioksidan ve sitoprotektif etkilerine bakıldığında ise gerek hidrofilik gerek lipofilik özellikleri sayesinde hücre membranından rahatlıkla geçebilen ve hücre çekirdeğine de ulaşabilen melatonin zaten doğal antioksidan özelliğe sahiptir. Melatonin, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz enzimlerini stimüle eder. Antioksidan enzim stimülasyonu dışında hidrojen peroksit, oksijen radikali, peroksinitrit anyonu, nitrik oksit ve hipoklorik asit gibi molekülleri de nötralize eder (47-50). Prooksidatif aktivitesi olmayan melatoninin hidroksil (OH) radikalini nötralize etme yeteneği glutatyon ve E vitamininden çok daha fazladır. Ayrıca E vitamini, C vitamini ve beta karoten gibi antioksidan maddelerden farklı olarak melatoninin antioksidan reaksiyonları sırasında ortaya çıkan ara ürünler de antioksidan özelliktedir (51, 52). Böylece hücre membranı, çekirdeği ve DNA lipid peroksidasyon ve nötralize edici toksik radikallerden korunur (50, 53). Ancak tüm bu mekanizmaların AR ile ne şekilde ilişkilendirilebileceği konusunda yeterli veri yoktur(Şekil 3-5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi

Araştırmamız deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırmada yer alan davranış deneyleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Laboratuvarında, biyokimyasal deneyler fakültemiz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)'da, histolojik incelemeler ise fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Ön çalışmanın davranış deneyleri 06.07.2017-06.08.2017, çalışmanın davranış deneyleri ise 10.07.2017-09.08.2017 ve 29.11.2017-30.12.2017 tarihlerinde gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın çalışma grupları

Çalışmamızda dört deney grubu vardır (Şekil 6):

GRUP 1:

Kontrol grubu (n=8): AR oluşturulmayan sağlıklı sıçanlara ilk 14 gün gūnaşırı, 15. günden itibaren 15 gün süresince her gün 1 ml fizyolojik serum (SF) intraperitoneal (i.p.) olarak, nazal topikal 20 mikrolitre (μl) SF uygulanmasından 1 saat önce verildi.

GRUP 2:

SF grubu (n=8): AR oluşturulan sıçanlara, ilk 14 günlük birinci duyarlılaştırma fazından sonra ikinci duyarlılaştırma fazına geçildiğinde, ilk uygulamada ölçümleri bozmaması için semptom skorlaması yaptıktan hemen sonra, daha sonraki (16. günden itibaren) uygulamalarda ise, topikal 20 μl SF içerisinde 20mg/ml ovalbumin uygulaması yapılmadan 1 saat önce, 15 gün boyunca 1ml SF i.p. olarak verildi.

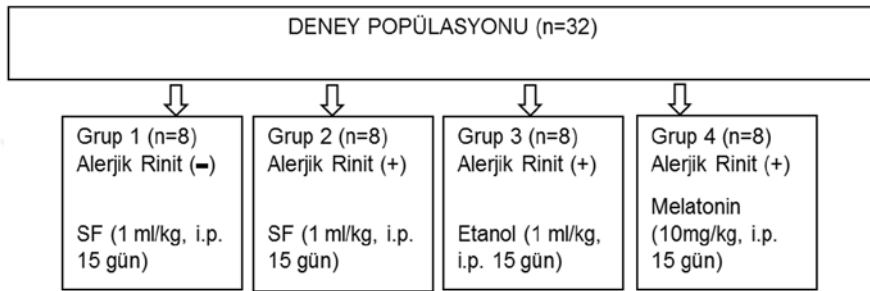
GRUP 3:

Etanol grubu (n=8): AR oluşturulan sıçanlara, ilk 14 günlük birinci duyarlılaştırma fazından sonra ikinci duyarlılaştırma fazına geçildiğinde, ilk uygulamada ölçümleri bozmaması için semptom skorlaması yaptıktan hemen sonra, daha sonraki (16. günden itibaren) uygulamalarda ise, topikal 20 μl SF içerisinde 20mg/ml ovalbumin

uygulaması yapılmadan 1 saat önce, 15 gün boyunca 1ml/kg etanol 1 ml i.p. olarak verildi.

GRUP 4:

Melatonin grubu (n=8): AR oluşturulan sıçanlara, ilk 14 günlük birinci duyarlılaştırma fazından sonra ikinci duyarlılaştırma fazına geçildiğinde, ilk uygulamada ölçümleri bozmaması için semptom skorlaması yaptıktan hemen sonra, daha sonraki (16. günden itibaren) uygulamalarda ise, topikal 20 µl SF içerisinde 20mg/ml ovalbumin uygulaması yapılmadan 1 saat önce, 15 gün boyunca 10 mg/kg melatonin 1 ml/kg etanol içinde 1 ml i.p. olarak verildi.



Şekil 6. Deney grupları

3.4. Çalışma materyali

Çalışmamızda 200-220 g ağırlığında, 32 adet sağlıklı, erişkin, erkek, Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar çalışmaya bazal (1. gün) hapşırma ve kaşıntı skorlamaları yapıldıktan sonra dahil edildi. Tüm sıçanlar deney bitimine kadar Deney Hayvanları Laboratuvarında 20 ile 22 °C arasındaki oda sıcaklığında ve %40-60 nisbi nem makro çevre koşullarında 12 saat süresince aydınlıkta, 12 saat boyunca ise karanlıkta ve standart sıçan kafeslerinde tutuldu. Hayvanların içecek ve yiyeceği dinlendirilmiş olarak sunulan çeşme suyu ve standart şekilde ad libitum olarak sunulan pelet yemden oluşmaktaydı.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Bağımlı Değişkenler:

Hapşırma skoru, burun kaşıma skoru, bu ikisinin toplamından oluşan toplam skor, serum ovalbumin spesifik IgE, melatonin ve IL-13 düzeyleri ve nazal mukozanın ışık mikroskopisi altında değerlendirilen histolojik parametreleri (sil kaybı, goblet hücre

artışı, vasküler proliferasyon, vasküler konjesyon, inflamatuvar hücre artışı, kondrosit hipertrofisi ve eozinofil infiltrasyonu)ve bu parametrelere ait toplam skordur.

Bağımsız değişkenler ise; farklı deney gruplarına uygulanmış olan farklı müdahalelerdir (ovalbumin ile AR oluşturulması, AR oluşturulmaması, melatonin, serum fizyolojik ve etanol uygulanması).

3.6. Veri toplama araçları

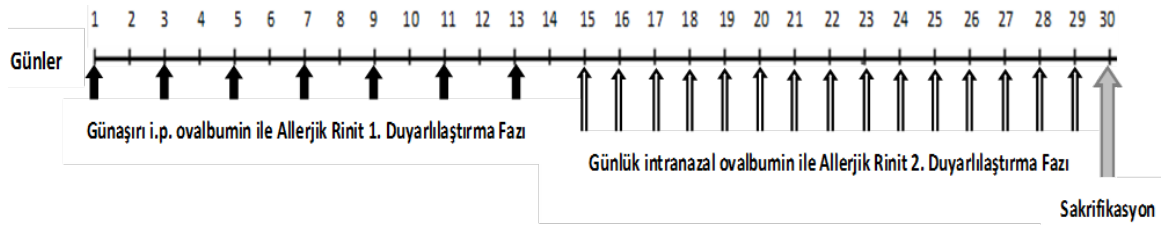
Araştırmamızın deneyleri davranış deneyleri, biyokimyasal deneyler ve histolojik deneyler olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

3.6.1. Davranış deneyleri

3.6.1.1. AR oluşturulması

Birinci Duyarlılaştırma Fazı: 32 sıçana 14 gün boyunca, gūnaşırı, 0.3 mg ovalbumin, 30 mg $AlOH_3$ (alüminyum hidroksit) içeren 1 ml SF içinde i.p. olarak uygulandı. Bu uygulamalar sonucu ovalbuminin antijen olarak tanıtılması sağlandı.

İkinci Duyarlılaştırma Fazı: 15. günden itibaren 15 gün boyunca her gün 11:00-12:00 arasında, bir mikropipet ile, 20 μ l içinde 20 mg/ml ovalbumin topikal intranazal olarak uygulanarak antijen ile yeniden karşılaşma ve AR oluşturuldu (Şekil 7, (54-67).



Şekil 7. Alerjik rinit modelinin oluşturulması(54, 63) numaralı kaynaklardan uyarlanmıştır.)

Deney hayvanlarında kullanılan ilaçlar:

- Melatonin uygulaması: Melatonin tozu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile hazırlanan solüsyonu enjeksiyondan hemen önce taze olarak etanol içinde çözülerek ve serum fizyolojik içerisinde seyreltilerek nihai etanol ve melatonin düzeyleri serum

fizyolojik içinde 2% etanol ve 10 mg/kg melatonin olacak şekilde hazırlandı ve 1 ml i.p. verildi.

- SF: 1 ml i.p. verildi.
- Etanol: Etanol %2'lik solüsyonu SF içinde olacak şekilde 1 ml i.p. verildi.

3.6.1.2. Semptom skorlaması

1, 15, 20, 25 ve 30. günlerde, kontrol grubu dışında tüm sıçanlara topikal intrazal ovalbumin, kontrol grubuna ise topikal intranazal SF verildi (Şekil 7- 8).



Şekil 8. Deney hayvanına mikropipetle intranazal ovalbumin uygulanması

Bu uygulamalardan hemen sonra 10 dakika süreyle her seferinde dört ayrı araştırmacı tarafından nazal semptomlar gözlemlendi ve her hayvanın hapşırık ve kaşıntı skorlarının aritmetik toplamı o hayvana ait toplam skoru verdi (54, 63, 65). Hapşırık skoru 10 dakika içerisindeki sayısına göre; 0 (0 hapşırık/10 dk), 1 (1-3 hapşırık/10 dk), 2 (4-9 hapşırık/10 dk) ve 3 (≥ 10 hapşırık/10 dk) olarak belirlendi. Burun kaşıntısı, ellerin burun üzerinde ileri ve geri gittiği bir harekettir. Burun kaşıntısı bir dakikadaki sayıya göre; 0 (0 kaşıma hareketi/dk), 1 (2 kaşıntı hareketi/dk), 2 (4-6 kaşıntı hareketi/dk) ve 3 (> 6 kaşıntı hareketi/dk) olarak belirlendi. Burun akıntısı ise 0 (akıntı yok), 1 (akıntı burun deliğinin içinde), 2 (akıntı burun deliğinin dışında da var) ve 3 (akıntı sürekli dışarı akıyor) olarak skorlandı ve bu üç parametrenin toplamı ≥ 5 ise AR olduğu kabul edildi (54, 63, 65). Çalışmada, burun akıntısını skorlamadığımız için AR'in oluşması için total nazal semptom skorunun 4'e eşit veya büyük olmasını ölçüt olarak belirledik (Tablo 1).

Tablo 1. Nazal Semptom Skoru

Semptom	Skor			
Hapşırık	0 (0/10 dk)	1 (1-3/10 dk)	2 (4-9/10 dk)	3 ($\geq 10/10$ dk)
Burun kaşıntısı	0 (0/dk)	1 (2/dk)	2 (4-6/dk)	3 (>6/dk)

3.6.2. Biyokimyasal deneyler

Deneyin 1. ve 15. günlerinde, tüm sıçanlardan, eter anestezisi altında, lateral kuyruk veninden ve 30. gününde vena cava caudalis'ten ağırlığının %1'i kadar (ortalama 3-4 ml) kan örneği alındı (Şekil 9). Örnekler 3000 rpm de santrifüj edildi, serumları melatonin, serum ovalbumin spesifik IgE ve IL-13 düzeyleri ölçümü yapıncaya kadar -20° C de saklandı (29, 59, 61, 65, 67-72). Biyokimyasal deneylerde sıçan serum, ovalbumin spesifik IgE, melatonin ve IL-13 enzyime linked immunosorbent assay (ELISA) ölçüm kitleri kullanıldı.



Şekil 9. Sıçan kuyruk veninden kan örneği alınması

3.6.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçümü

Sıçan IL-13 konsantrasyonlarını ölçmek için, My Biosource (My Biosource, Inc.; San Diego, USA) firmasının MBS039847 katalog numaralı 'Rat Ovalbumin Specific Immunoglobulin E (OVASlgE) ELISA Kit' ürünü kullanıldı. Kit içeriğinde;

- 96 kuyulu micro ELISA plaka (8x12 takılıp çıkarılabilir)
- Standart çözeltiler (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml)
- Örnek/standart seyreltme tamponu
- HRP (horseradish peroxidase) konjugatı
- Kromojen çözeltisi A

- f. Kromojen çözeltisi B
- g. Reaksiyonu durdurma çözeltisi
- h. Yıkama tamponu (20X)
- i. Plate yapıştırıcısı

Yıkama tamponunun hazırlanması ve yıkama işleminde kullanımı: Kite bulunan yıkama tamponu, 20X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltili. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Her kuyuya 350 µl yıkama tamponu pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.

1. 1:20 yıkama tamponu: distile su şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml yıkama tamponunu hazırlamak üzere 50 µl konsantre olan yıkama tamponu ve 950 µl distile su kullanılır.)
2. Yıkama işlemi tüm deney boyunca aynı şekilde yapıldı. Kuyuda bulunan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 350 µl yıkama tamponu pipetlendi, birkaç dakika beklenerek yıkama tamponu da uzaklaştırıldı.

Kit malzemeleri kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi, ardından kuyulara pipetlendi. Pipetleme yapılırken kuyuların dibine kesinlikle pipet ucunun değmemesine ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi. Sıçan serumlarının yanı sıra standart çözeltileri de kuyulara pipetlendi, standart grafiği çizildi ve örneklerin ölçülen Optical Density (O.D.) ölçümlerine göre konsantrasyon değerleri bu standart grafiğine göre hesaplandı.

Yöntemde izlenen deney prosedürü:

1. Kör(Örnek/standart seyreltme tamponu), Standart çözelti ve örnekler (herhangi bir seyreltme yapılmadan) her kuyuya 50 µl hacimde pipetlendi, beklemeden yine her kuyuya 100 µl hacimde HRP konjugatı eklendi. Plate yapıştırıcısı ile üzeri örtüldü ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
2. Plate yapıştırıcısı kaldırıldı, içerik boşaltıldı ve her bir kuyu 4 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
3. Her kuyuya karanlıkta 50 µl kromojen A ve de 50 µl kromojen B pipetlendi ve 37°C, yine karanlıkta 15 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.
4. Her kuyuya (karanlıkta) 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklendi. Tüm kuyulara çözelti eklendiğinde kuyuların rengi maviden sarıya dönüştü. (Bu aşamadan sonra deney ışıktan etkilenmediği için karanlık ortama ihtiyaç duyulmamaktadır.)
5. Plate bekletilmeden 450 nm'de O.D. değeri ölçüldü.

3.6.2.2. Serum IL-13 ölçümü

Sıçan serum İnterlökin-13 konsantrasyonlarını ölçmek için, Fine Test firmasının (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.; Wuhan, Hubei, China) ER0034 katalog numaralı 'Rat IL-13(Interleukin-13) ELISA Kit' ürünü kullanıldı. Kit içeriğinde;

- a. 96 kuyulu micro ELISA plaka (8x12 takılıp çıkarılabilir)
- b. Liyofilize standart
- c. Örnek/standart seyreltme tamponu
- d. Biotin-dedeksiyon antikoru (Konsantre)
- e. Antikor seyreltme tamponu
- f. HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) (Konsantre)
- g. SABC seyreltme çözeltisi
- h. TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) substratı
- i. Reaksiyonu durdurma çözeltisi
- j. Yıkama tamponu (25X)
- k. Plate yapıştırıcısı

Liyofilize standart ve konsantre çözeltilerin hazırlanması aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Standart çözeltilerin hazırlanması:

1. Standart çözeltiler hazırlandı. Kite yer alan 1000 pg liyofilize protein içeren tüp içine 1 ml miktarında 'Örnek/standart seyreltme tamponu' koyuldu. 10 dakikalık süre boyunca oda sıcaklığı koşulunda bekletildi ve ardından protein tamamen çözünene kadar karıştırıldı.
2. Sırasıyla 500pg / ml, ardından 250pg / ml, ardından 125pg / ml, ardından 62.5pg / ml, ardından 31.25pg / ml ve ardından 15.625pg / ml ile 6 tüp etiketlendi. Her tüpe 300 µl 'Örnek/standart seyreltme tamponu' pipetlendi. Ardından şekilde görüldüğü gibi 1000 pg/ml konsantrasyonundan başlayarak her tüpe bir önceki tüpten 300 µl çözelti pipetlenerek seri seyreltme yapıldı. Kör olarak da 'Örnek/standart seyreltme tamponu' kullanıldı.

Kitin önerisi; standart çözeltilerin 2 saat içerisinde en iyi sonucu verdiği yönünde olduğu için, taze hazırlandı. Liyofilize standart da +4°C'de muhafaza edildi.

Biotin-dedeksiyon antikoru çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Kite bulunan Biotin-dedeksiyon antikoru 100X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltildi. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı.

Kitin önerisi; en erken bir saat önceden hazırlanması, 1 saatten fazla bekletilmemesi yönündedir.

1. Her kuyuya 100 µl antikor çözeltisi pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.
2. 1:100 antikor:antikor seyreltme çözeltisi şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml çalışma çözeltisi hazırlamak için 10 µl antikor, 990 µl antikor seyreltme çözeltisi kullanılır.)

HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Kitte bulunan SABC, 100X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltildi. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Kitin önerisi; en erken 30 dakika önceden hazırlanması, 30 dakikadan fazla bekletilmemesi yönündedir.

1. Her kuyuya 100 µl antikor çözeltisi pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.
2. 1:100 antikor:antikor seyreltme çözeltisi şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml çalışma çözeltisi hazırlamak için 10 µl antikor, 990 µl antikor seyreltme çözeltisi kullanılır.)

Yıkama tamponunun hazırlanması ve yıkama işleminde kullanımı:

Kitte bulunan yıkama tamponu, 25X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltildi. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Her kuyuya 350 µl yıkama tamponu pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.

1. 1:25 yıkama tamponu: distile su şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml yıkama tamponununun hazırlanması amacıyla 40 µl konsantre edilmiş yıkama tamponu, 960 µl distile edilmiş su kullanılır.)
2. Yıkama işlemi tüm deney boyunca aynı şekilde yapıldı. Kuyuda bulunan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 350 µl yıkama tamponları pipetlendi, birkaç dakika bekletilerek yıkama tamponu da uzaklaştırıldı.

Kit malzemeleri kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi, ardından kuyulara pipetlendi. Pipetleme yapılırken kuyuların dibine kesinlikle pipet ucunun değmemesine ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi.

Sıçan serumlarının yanı sıra standart çözeltileri de kuyulara pipetlendi, standart grafiği çizildi ve örneklerin ölçülen Optical Density (O.D.) ölçümlerine göre konsantrasyon değerleri bu standart grafiğine göre hesaplandı.

Yöntemde izlenen deney prosedürü:

1. Kullanılacak kuyular 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

2. Kör(Örnek/standart seyreltme tamponu), Standart çözelti ve örnekler (herhangi bir seyreltme yapılmadan) her kuyuya 100 µl hacimde pipetlendi, plate yapıştırıcı ile üzeri örtüldü ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
3. Plate yapıştırıcı kaldırıldı, kuyuların içeriği boşaltıldı ve yıkama yapılmadan 100 µl Biotin-dedeksiyon antikoru çalışma çözeltisi kondu, 37°C sıcaklıkta 60 dakika boyunca inkübasyon uygulandı.
4. Plate yapıştırıcı kaldırıldı, içerik boşaltıldı ve her bir kuyu 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Her kuyuya 100 µl miktarında SABC çalışma çözeltisi pipetlendi, plate yapıştırıcı ile kuyuların üzeri örtüldü ve 37°C sıcaklıkta 30 dakikalık süre boyunca inkübasyon uygulandı.
6. Plate yapıştırıcı kaldırıldı, her bir kuyunun içeriği boşaltıldı ve 5 defa yıkama tamponu aracılığıyla yıkandı.
7. Her kuyuya karanlıkta 90 µl TMB substratı pipetlendi ve 37°C, yine karanlıkta 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. (Süre açısından kitin önerisi 15- 30 dakikadır. Bu süreyi kullanıcının özellikle düşük konsantrasyona sahip standart çözeltilerin bulunduğu kuyularda mavi renk görene kadar inkübasyon yaparak optimize etmesi öneriliyor.)
8. Her kuyuya (karanlıkta) 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklendi. Tüm kuyulara çözelti eklendiğinde kuyuların rengi maviden sarıya dönüştü. (Bu aşamadan sonra deney ışıktan etkilenmediği için karanlık ortama ihtiyaç duyulmamaktadır.)
9. Plate bekletilmeden 450 nm'de O.D. değeri ölçüldü.

3.6.2.3. Serum melatonin düzeyi ölçümü

Sıçan serum melatonin konsantrasyonlarını ölçmek için, Elabscience firmasının E-EL-R0031 katalog numaralı 'Rat MT(Melatonin) ELISA Kit' ürünü kullanıldı. Kit içeriğinde;

- a. 96 kuyulu micro ELISA plaka (8x12 takılıp çıkarılabilir)
- b. Liyofilize standart
- c. Örnek/standart seyreltme tamponu
- d. Biotin-dedeksiyon antikoru (Konsantre)
- e. Antikor seyreltme tamponu
- f. HRP konjugatı (Konsantre)
- g. HRP konjugatı seyreltme çözeltisi
- h. Substrat reaktifi
- i. Reaksiyonu durdurma çözeltisi
- j. Yıkama tamponu (25X)
- k. Plate yapıştırıcısı

Liyofilize standart ve konsantre çözeltilerin hazırlanması aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

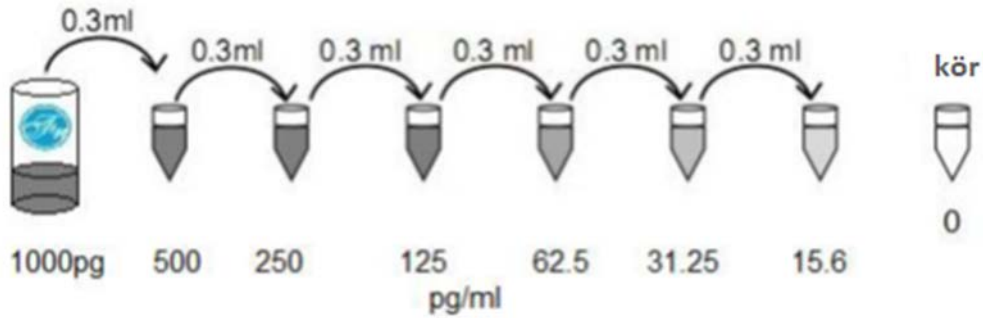
Standart çözeltilerin hazırlanması

1. Standart çözeltiler hazırlandı. Kitte yer alan 1000 pg liyofilize protein içeren tüp içerisine 1 ml miktarında 'Örnek/standart seyreltme tamponu' koyuldu. 10 dakikalık süre boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve ardından protein tamamen çözünene kadar karıştırıldı.
2. Sırasıyla 500pg / ml, ardından 250pg / ml, ardından 125pg / ml, ardından 62.5pg / ml, ardından 31.25pg / ml ve ardından 15.625pg / ml ile 6 adet tüp etiketlendi. Her tüpe 300 µl 'Sample Standart Dilution Buffer'
 1. (Örnek/standart seyreltme tamponu) pipetlendi. Ardından şekilde görüldüğü gibi 1000 pg/ml konsantrasyonundan başlayarak her tüpe bir önceki tüpten 300 µl çözelti pipetlenerek seri seyreltme yapıldı. Kör olarak da 'Örnek/standart seyreltme tamponu' kullanıldı.

Kitin önerisi; standart çözeltilerin 2 saat içerisinde en iyi sonucu verdiği yönünde olduğu için, taze hazırlandı. Liyofilize standart da +4°C'de muhafaza edildi.

Kitte bulunan Biotin-dedeksiyon antikoru 100X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltildi (Şekil 10). Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Kitin önerisi; en erken bir saat önceden hazırlanması, 1 saatten fazla bekletilmemesi yönündedir.

1. Her kuyuya 100 µl antikor çözeltisi pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.
2. 1:100 antikor:antikor seyreltme çözeltisi şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml çalışma çözeltisi hazırlamak için 10 µl antikor, 990 µl antikor seyreltme çözeltisi kullanılır.)



Şekil 10. Biotin-dedeksiyon antikoru çalışma çözeltisinin hazırlanması

HRP konjugatı çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Kitte bulunan HRP konjugatı, 100X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltili. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Kitin önerisi; en erken 30 dakika önceden hazırlanması, 30 dakikadan fazla bekletilmemesi yönündedir.

1. Her kuyuya 100 µl antikor çözeltisi pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.
2. 1:100 antikor:antikor seyreltme çözeltisi şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml çalışma çözeltisi hazırlamak için 10 µl antikor, 990 µl antikor seyreltme çözeltisi kullanılır.)

Yıkama tamponunun hazırlanması ve yıkama işleminde kullanımı:

Kitte bulunan yıkama tamponu, 25X konsantrasyonundan 1X konsantrasyonuna seyreltili. Bu aşamaya gelindiğinde taze hazırlandı ve kullanıldı. Her kuyuya 350 µl yıkama tamponu pipetlenecek şekilde total hacim hesaplandı.

1. 1:25 yıkama tamponu: distile su şeklinde hazırlandı. (örneğin 1 ml kadar yıkama tamponunun elde edilmesi amacıyla 40 µl kadar konsantre yıkama tamponu, 960 µl distile edilmiş su kullanılır.)
2. Yıkama işlemi tüm deney boyunca aynı şekilde yapıldı. Kuyuda bulunan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 350 µl yıkama tamponu pipetlenir, 1-2 dakika beklenir ve yıkama tamponu da uzaklaştırılır.

Kit malzemeleri kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi, ardından kuyulara pipetlendi. Pipetleme yapılırken kuyuların dibine kesinlikle pipet ucunun değmemesine ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi. Sıçan serumlarının yanı sıra standart çözeltileri de kuyulara pipetlendi, standart grafiği çizildi ve örneklerin ölçülen Optical Density (O.D.) ölçümlerine göre konsantrasyon değerleri bu standart grafiğine göre hesaplandı.

Yöntemde izlenen deney prosedürü:

1. Kör(Örnek/standart seyreltme tamponu), Standart çözelti ve örnekler (herhangi bir seyreltme yapılmadan) her kuyuya 50 µl hacimde pipetlendi, beklemeden yine her kuyuya 50 µl hacimde biotin-dedeksiyon antikor ekleni. Plate yapıştırıcı ile üzeri örtüldü ve 37°C'de 45 dakika inkübe edildi.
2. Plate yapıştırıcı kaldırıldı, içerik boşaltıldı ve her bir kuyu 3 defa yıkama tamponu kullanılarak yıkandı.
3. Her kuyuya 100 µl HRP konjugatı çalışma çözeltisi pipetlendi, plate yapıştırıcı ile kuyuların üzeri örtüldü ve 37°C'de 30 dakikalık süre boyunca inkübasyon uygulandı.

4. Plate yapıştırıcı kaldırıldı, her kuyunun içeriği boşaltılarak 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Her kuyuya karanlıkta 90 µl miktarında substrat reaktifi pipetlenerek 37°C, yine karanlıkta 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. (Süre açısından kitin önerisi 15-30 dakikadır. Bu süreyi kullanıcının özellikle derişik konsantrasyona sahip standart çözeltilerin bulunduğu kuyularda mavi renk görene kadar inkübasyon yaparak optimize etmesi öneriliyor.)
6. Her kuyuya (karanlıkta) 50 µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklendi. Tüm kuyulara çözelti eklendiğinde kuyuların rengi maviden sarıya dönüştü. (Bu aşamadan sonra deney ışıktan etkilenmediği için karanlık ortama ihtiyaç duyulmamaktadır.)
7. Plate bekletilmeden 450 nm'de O.D. absorbansı ölçüldü.

3.6.3. Histolojik inceleme

Deneyin 30. gününde tüm sıçanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildikten sonra dekapitasyon uygulandı. Sıçan kafaları formol içinde 3 gün, trikloroasetik asit içinde 7 gün bekletildikten sonra nazal mukozaları çıkartıldı. Mukozalar sil kaybı, goblet hücre artışı, vasküler proliferasyon, vasküler konjesyon, inflamatuvar hücre artışı, kondrosit hipertrofisi ve eozinofil infiltrasyonu açısından değerlendirildi (54, 63, 64, 73-76).

3.6.3.1. Işık mikroskopik doku takip protokolü

Dokular formaldehit (%10) ile sabitlendikten sonra 2 ay Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile dekalsifiye edildi. EDTA'nın uzaklaştırılmasına başlandı. Öncelikle bir akşam boyunca akarsuda yıkandı. Ardından etil alkol ile muamele edildi (altmış santigrat derecede yirmişer dakika boyunca sırasıyla yüzde yetmiş, seksen ve doksan altı oranındaki etil alkol ile) Ardından, aynı sıcaklık ve sürede dört kere asetonda bekletildi ve sonrasında da şeffaflaştırma için ksilolde muamele edildi. Sonrasında, aynı sıcaklıktaki etüvde iki kere altmışar dakika boyunca parafinle immersiyon uygulandı. Doku kesitleri parafine yerleştirildi. Rotary mikrotom kesici (RM 2255, Leica) ile dokudan beş mikronluk kesitler dilimlendi. Histomorfolojik inceleme için Hematoksilen Eozin boyama (HE) uygulandı. Goblet hücreleri Alcian Blue Peryodik Asit Schiff boyası (AB/PAS) ile incelendi (Tablo 2).

Tablo 2. Rütin Doku Protokolü

İşlemler	Maddeler	Süresi
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	24-48 Saat
Fiksatiftten Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dk
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dk
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dk
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dk
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dk
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dk
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dk
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 Dk
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 Dk
	Parafin 1	60 Dk
	Parafin 2	60 Dk
Bloklama	Parafin	

3.6.3.2. Hematoksilen&Eozin protokolü

Parafinden arındırma için yarım saat boyunca altmış derece santigrat sıcaklıktaki etüvde dokular bekletildi. Sonra, ilki yirmi, diğer ikisi onar dakika boyunca 3 kere ksilen ile muamele edildi. Ardından saf alkol ile iki değişim yapıldı ve sonrasında yüzde doksan altıdan yüzde yetmiş varan oranda azalan alkolden seri olarak geçirildi. Bundan da sonra, dokular disitile sudan geçirildi. Ardından on dakika boyunca Hematoxyline boyası (01562E, Surgipath, Bretton, PeterBorough, Cambridgeshire) ve ardından on dakikalık fazla boya yıkanması yapıldı. Sonrasında da iki dakika boyunca kesitler Eosin boyası (01602E, Surgipath, Bretton, PeterBorough, Cambridgeshire) kullanılarak muamele edildi. Dha sonra tekrar yukarıda belirtildiği ile aynı oran ve sürelerde alkole tabi tutularak ardından da yirmişer dakika boyunca 3 kere ksilen ile muamele edildi. Son olarak entellanla (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) kapandı (Tablo 3).

Tablo 3. Hematoksilen&Eozin Boyama Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3	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	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3. Alcian Blue Periodik Asid Schiff (AB / PAS) boyaması

Parafinden arındırma için bir akşam boyunca altmış derece santigrat sıcaklıktaki etüvde dokular bekletildi. Sonra, ilki yirmi, diğer ikisi onar dakika boyunca 3 kere ksilen ile muamele edildi. Ardından saf alkol ile iki değişim yapıldı ve sonrasında yüzde doksan altıdan yüzde yetmiş varan oranda azalan alkolden seri olarak geçirildi. Dokular disitile su ile yıkandıktan sonra beş dakika boyunca alsian mavisi ile boyatıldı ve fazla boyadan kurtulmak için disitile suda yıkandı. Ardından on dakikalık periodik asid boyaması yapıldı ve fazla boyadan kurtulmak için disitile suda yıkandı ile boyandı. Daha sonra yirmi dakikalık süre boyunca schiff ile boyama işlemi yapıldı ve fazla boyadan kurtulmak için disitile suda yıkandı Ardından saf alkol ile iki değişim yapıldı ve sonrasında yüzde doksan altıdan yüzde yetmiş varan oranda azalan alkolden seri

olarak geçirildi. Sonrasında irmişer dakika boyunca 3 kere ksilen ile muamele edildi. Son olarak entellanla kapandı (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany), (Tablo 4).

Tablo 4. AB / PAS Protokolü

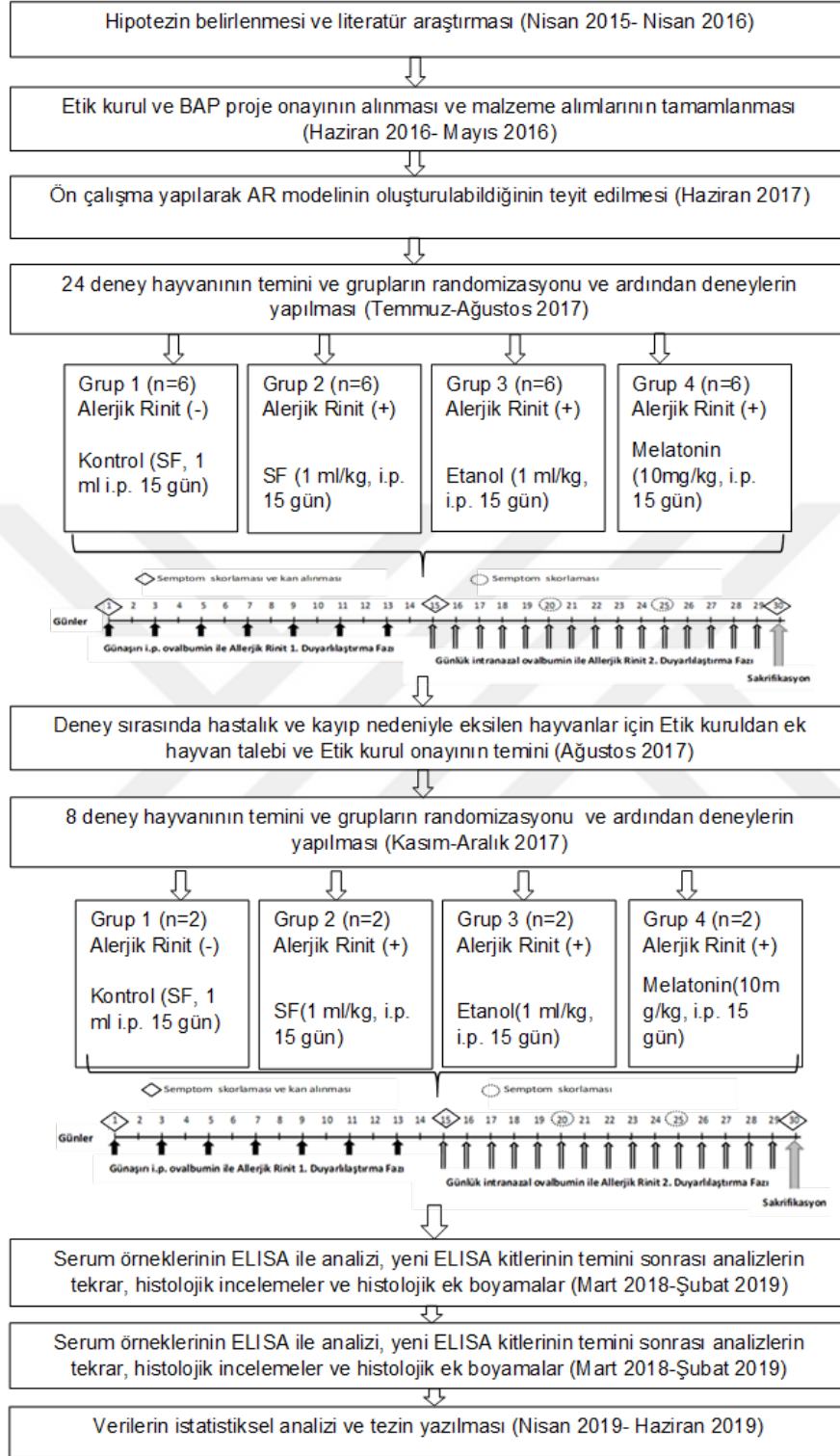
İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3	20 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Alsian 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	Hemotoksilen	3 Dakika
Yıkama	Akarsu	6 Dakika
Dehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.4. Histolojik değerlendirme

HE ve AB / PAS boyası uygulanmış dokular ışık mikroskopisi (Olympus BX-51 Tokyo, Japonya) ile ve çözünürlüğü yüksek video-kamerası (Olympus DP-71, Tokyo, Japonya) entegre edilmiş görüntü arayüz programı ile elde edildi. Tüm hayvanlara ait kesitler tek tek ve iki farklı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi tarafından incelendi.

Işık mikroskobu altında kesitlerde ayrı ayrı, silyum azalması veya kaybolması, goblet hücrelerindeki sayıca artma, damar yapılarındaki konjesyone görünüm, damarsal çoğalma, inflamatuvar hücrelerin dokuyu infiltre etmesi, dokunun eozinofillerce infiltre edilmesi, kondrosit hücrelerinde büyüme derecesi ölçülerek puanlandı. Puanlama yarı kantitatif şekilde yapıldı. İlgili parametrede farklılık olmaması “sıfır”, hafifçe farklılık olması “bir”, belirgince farklılık olması “iki”, ciddi derecede farklılık olması “üç” verilerek skorlandı (90). Tüm parametre skorlarının ortalaması alındı ve istatistiksel yöntemle incelendi.

3.7. Araştırma planı ve takvimi



Şekil 11. Araştırma planı ve takvimi

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Tüm data SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) yazılımı ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Parametrik ölçümlerin karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA, ardından ise post-hoc Tukey Kramer testleri, non parametrik ölçümlerin karşılaştırılmasında bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis ve post hoc Dunn-Bonferroni testi, grupların tekrarlanan ölçümlerinin karşılaştırılmasında ise Friedman ve post hoc Dunn-Bonferroni testi kullanıldı (54, 71, 72). $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.



3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Deney hayvanlarından, vücut ağırlığına göre, en fazla 3 ml kan örneği alınabildi. Bu miktar tam kandan santrifüj edildiğinde, en fazla 0.5 ml serum elde edildi. Biyokimyasal ölçümler sırasında başlangıçta temin edilmiş olan interlökin-4, -5, -13 ve Ig-E ELISA kitleri teknik problemler nedeniyle çalıştırılmadı. Ancak bu kitlerin ölçümü için de serum harcanmış oldu. Bu nedenle, projenin başlangıcında serumda ELISA kitleri ile analiz edilmesi planlanan beş parametrenin (IgE, melatonin, IL-4, IL-5 ve IL-13) tümüne birden bakılamayabileceği anlaşıldı, parametre sayısının azaltılmasının gerekli olduğuna karar verildi ve sadece melatonin, IgE ve IL-13 kitleri yeniden temin edilerek kalan serumlar ile biyokimyasal analizler gerçekleştirildi.

Bunun dışında ilk planda temin edilmiş olan 24 deney hayvanının etanol grubunda biri rektal kanama nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubunda ise bir hayvanın ise deneyler sırasında taşikardi ve takipnesi gelişmesi üzerine çalışma dışı bırakıldı. Eksik hayvanların istatistiksel analize izin vermemesi nedeniyle ek hayvan talebi yapılarak her gruba ikişer hayvan ilave edildi. Dolayısıyla deneyler iki farklı zaman diliminde gerçekleştirilmiş oldu.

3.10. Etik kurul onayı

Bu çalışmanın yapılması, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nda 04.10.2016 tarih ve 02/18/2016 nolu toplantısında 51/2016 no ile onay almıştır(Ek 1). Ayrıca, 27.12.2016 tarih ve 01/24/2016 gündem nolu, 13.06.2017 tarih ve 02/12/2017 nolu kararlar ile de ek deney hayvanı alımı ve araştırıcı eklenmesi uygun görölmüştür.



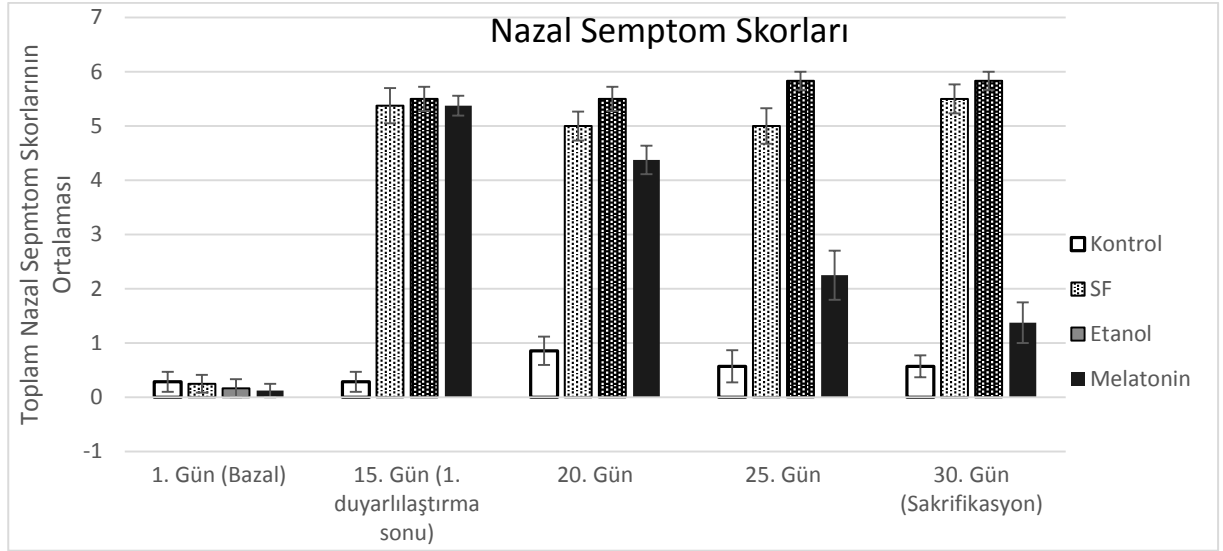
4. BULGULAR

4.1. Nazal semptom skorları

1. Kontrol grubu dışındaki gruplarda (SF, etanol ve melatonin) 1. duyarlılaşma sonunda tüm hayvanların total nazal semptom skorları 4'den büyüktü. Bu durum ovalbuminle alerjik rinit modelinin oluşturulduğunu gösterdi.
2. Grupların bazal semptom skor ortalamaları 0.13 ± 0.35 - 0.29 ± 0.49 arasında değişiyordu. Gruplar arasında bazal semptom skorlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Şekil 12, Tablo 5-6).
3. Semptom skorlarında gruplar arasında istatistiksel analizde anlamlı ölçüde fark bulundu (Şekil 12, Tablo 6).
4. Kontrol grubu dışındaki gruplarda (SF, etanol ve melatonin) 1., 15., 20., 25. ve 30. gün semptom skorlarında istatistiksel analizde anlamlı fark saptandı (Tablo 7).

Tablo 5. Grupların toplam nazal semptom skorları.

Gruplar	Günlere göre total nazal semptom skorları				
	1. Gün (Bazal)	15. Gün (1. duyarlılaştırma sonu)	20. Gün	25. Gün	30. Gün (Sakrifikasyon)
Kontrol	0.29 ± 0.49 (0 (0-1))	0.29 ± 0.49 (0 (0-1))	0.86 ± 0.69 (1.00 (0-2))	0.57 ± 0.79 (0 (0-2))	0.57 ± 0.54 (1.00 (0-1))
SF	0.25 ± 0.46 (0 (0-1))	5.38 ± 0.92 (6.00 (4-6))	5.00 ± 0.76 (5.00 (4-6))	5.00 ± 0.93 (5.00 (4-6))	5.50 ± 0.76 (6.00 (4-6))
Etanol	0.17 ± 0.41 (0 (0-1))	5.50 ± 0.55 (5.50 (5-6))	5.50 ± 0.55 (5.50 (4-6))	5.83 ± 0.41 (6.00 (4-6))	5.83 ± 0.41 (6.00 (4-6))
Melatonin	0.13 ± 0.35 (0 (0-1))	5.38 ± 0.52 (5.00 (5-6))	4.38 ± 0.74 (4.50 (3-5))	2.25 ± 1.28 (2.50 (0-4))	1.38 ± 1.06 (1.50 (0-3))
Veriler ortalama değer $\pm$ standart sapma (ortanca değer (en küçük değer- en büyük değer)) şeklinde ifade edilmiştir.					



Şekil 12. Kontrol ve deney gruplarında nazal semptom skorlarının ortalamalarının bazal, 1. Duyarlılaştırma sonu, 20., 25. ve 30. gündeki değişimi.

Tablo 6. Gruplar arasında bazal, 15., 20., 25. ve 30. günde ölçülen nazal semptom skorlarının karşılaştırılması.

Total nazal semptom skorları	<i>p</i> değeri	İkili grup karşılaştırması	Post-hoc <i>p</i> değeri
1. Gün (Bazal)	0.869		-
15. Gün (1. duyarlılaştırma sonu)	0.001*	Kontrol-SF	0.002**
		Kontrol-Etanol	0.005**
		Kontrol-Melatonin	0.006**
		Melatonin-SF	1.000
		Melatonin-Etanol	1.000
		SF-Etanol	1.000
20. Gün	<0.001*	Kontrol-SF	0.003**
		Kontrol-Etanol	<0.001**
		Kontrol-Melatonin	0.075
		Melatonin-SF	1.000
		Melatonin-Etanol	0.356
		SF-Etanol	1.000
25. Gün	<0.001*	Kontrol-SF	0.002**
		Kontrol-Etanol	<0.001**
		Kontrol-Melatonin	1.000
		Melatonin-SF	0.098
		Melatonin-Etanol	0.013**
		SF-Etanol	1.000
30. Gün (Sakrifikasyon)	<0.001*	Kontrol-SF	0.002**

		Kontrol-Etanol	0.001**
		Kontrol-Melatonin	1.000
		Melatonin-SF	0.019**
		Melatonin-Etanol	0.012**
		SF-Etanol	1.000
<i>p değeri: Kruskal Wallis testi, post-hoc p değeri: Bonferroni-Dunn testi, * Kruskal Wallis testinde $p<0.05$, ** post-hoc Bonferroni--Dunn testinde $p<0.05$</i>			

Tablo 7. Kontrol ve deney grupları içinde bazal, 15., 20., 25. ve 30. günlerde ölçülen nazal semptom skorlarının karşılaştırılması.

Gruplar	<i>p</i> değeri	İkili skor ölçümü karşılaştırması	Post-hoc <i>p</i> değeri
Kontrol	0.156		-
SF	<0.001*	1-15 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.005**
		1-30 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.001**
		15-30 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	1.000
		1-20	0.091
		1-25	0.057
		15-20	1.000
		15-25	1.000
		20-25	1.000
		20-30	1.000
		25-30	1.000
Etanol	0.001*	1-15 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.176
		1-30 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.019**
		15-30 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	1.000
		1-20	0.176
		1-25	0.019**
		15-20	1.000
		15-25	1.000
		20-25	1.000
		20-30	1.000
		25-30	1.000
Melatonin	<0.001*	1-15 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	<0.001**
		1-30 (Bazal-Sakrifikasyon)	1.000
		15-30 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	0.003**
		1-20	0.003**
		1-25	0.578
		15-20	1.000
		15-25	0.072
		20-25	0.820

		20-30	0.072
		25-30	1.000
<i>p değeri: Friedman testi, post-hoc p değeri: Bonferroni-Dunn testi, * Friedman testinde p<0.05 , ** post-hoc Bonferroni- Dunn testinde p<0.05</i>			

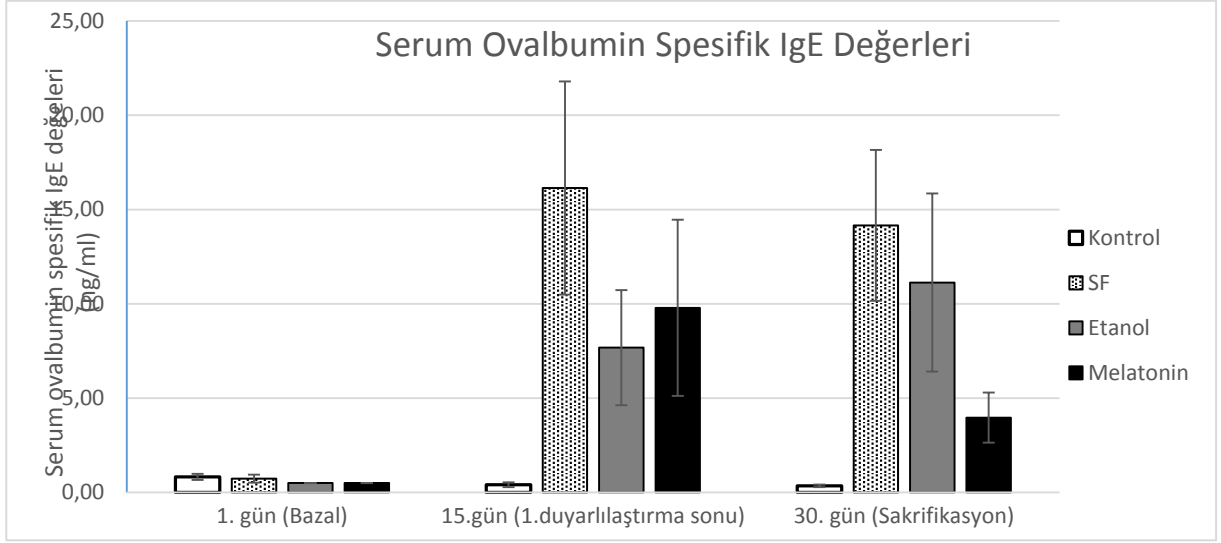
4.2. Biyokimyasal bulgular

4.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçüm bulguları

1. Kontrol grubu dışındaki gruplarda (SF, etanol ve melatonin) 1. duyarlılaşma sonunda serum ovalbumin spesifik IgE değerleri belirgin şekilde arttı (Tablo 8, Şekil 13). Bu durum ovalbuminle alerjik rinit modelinin oluştuğunu biyokimyasal olarak kanıtladı.
2. Grupların bazal serum ovalbumin spesifik IgE ortamları 0.50 ± 0.01 - 0.83 ± 0.43 arasında değişiyordu. Gruplar arasında serum bazal ovalbumin spesifik IgE değerleri bakımından istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı (Tablo 8-9).
3. Serum ovalbumin spesifik IgE değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık saptandı (Tablo 9).
4. Kontrol grubu dışındaki gruplarda (SF, etanol ve melatonin) 1., 15. ve 30. gün serum ovalbumin spesifik IgE değerlerinde istatistiksel analizde anlamlı fark saptandı (Tablo 10).

Tablo 8. Grupların serum ovalbumin spesifik IgE değerleri.

Gruplar	Ovalbumin Spesifik IgE (ng/ml)		
	1. ölçüm (1. gün (bazal))	2. ölçüm (15. gün (1. duyarlılaştırma sonu))	3. ölçüm (30. gün (sakrifikasyon))
Kontrol	0.83 ± 0.43 (1.06 (0.29-1.37))	0.41 ± 0.34 (0.26 (0.13-0.99))	0.35 ± 0.17 (0.35 (0.13-0.57))
SF	0.73 ± 0.56 (0.48 (0.24-1.74))	16.14 ± 14.95 (11.59 (2.96-41.30))	14.16 ± 9.79 (15.12 (3.64-26.94))
Etanol	0.50 ± 0.02 (0.50 (0.48-0.54))	7.68 ± 7.47 (3.06 (2.51-18.75))	11.13 ± 10.56 (3.96 (3.27-25.18))
Melatonin	0.50 ± 0.01 (0.50 (0.49-0.51))	9.78 ± 11.44 (3.36 (2.07-29.41))	3.96 ± 3.24 (3.11 (1.56-10.20))
Veriler ortalama değer $\pm$ standart sapma (ortanca değer (en küçük değer- en büyük değer)) şeklinde ifade edilmiştir.			



Şekil 13. Kontrol ve deney gruplarının serum spesifik ovalbumin IgE değerlerinin bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyondaki değişimi.

Tablo 9. Gruplar arasında bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyonda ölçülen serum ovalbumin spesifik IgE değerlerinin karşılaştırılması.

Serum ovalbumin spesifik IgE	<i>p</i> değeri	İkili grup karşılaştırması	Post-hoc <i>p</i> değeri
1. Ölçüm (1. Gün (Bazal))	0.663		
2. Ölçüm (15. Gün (1. duyarlılaştırma sonu))	0.001*	Kontrol-SF	0.001**
		Kontrol-Etanol	0.046**
		Kontrol-Melatonin	0.041**
		Melatonin-SF	1.000
		Melatonin-Etanol	1.000
		SF-Etanol	1.000
3. Ölçüm (30. Gün (Sakrifikasyon))	0.002*	Kontrol-SF	0.002**
		Kontrol-Etanol	0.024**
		Kontrol-Melatonin	0.170
		Melatonin-SF	0.923
		Melatonin-Etanol	1.000
		SF-Etanol	1.000

p değeri: Kruskal Wallis testi, post-hoc *p* değeri: Bonferroni-Dunn testi, * Kruskal Wallis testinde $p < 0.05$, ** post-hoc Bonferroni-Dunn testinde $p < 0.05$

Tablo 10. Grupların kendi içlerinde serum spesifik ovalbumin IgE değerlerinin bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyondaki değişiminin karşılaştırılması.

Gruplar	<i>p</i> değeri	İkili skor ölçümü karşılaştırması	Post-hoc <i>p</i> değeri
Kontrol	0.042*	1-2 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.063
		1-3 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.130
		2-3 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	1.000
SF	0.009*	1-2 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.012**
		1-3 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.063
		2-3 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	1.000
Etanol	0.007*	1-2 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.342
		1-3 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.005**
		2-3 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	0.342
Melatonin	0.006*	1-2 (Bazal-1.duyarlılaştırma sonu)	0.004**
		1-3 (Bazal-Sakrifikasyon)	0.130
		2-3 (1.duyarlılaştırma sonu-Sakrifikasyon)	0.745
<i>p</i> değeri: Friedman testi, post-hoc <i>p</i> değeri: Bonferroni-Dunn testi, * Friedman testinde <i>p</i> <0.05 , ** post-hoc Bonferroni-Dunn testinde <i>p</i> <0.05			

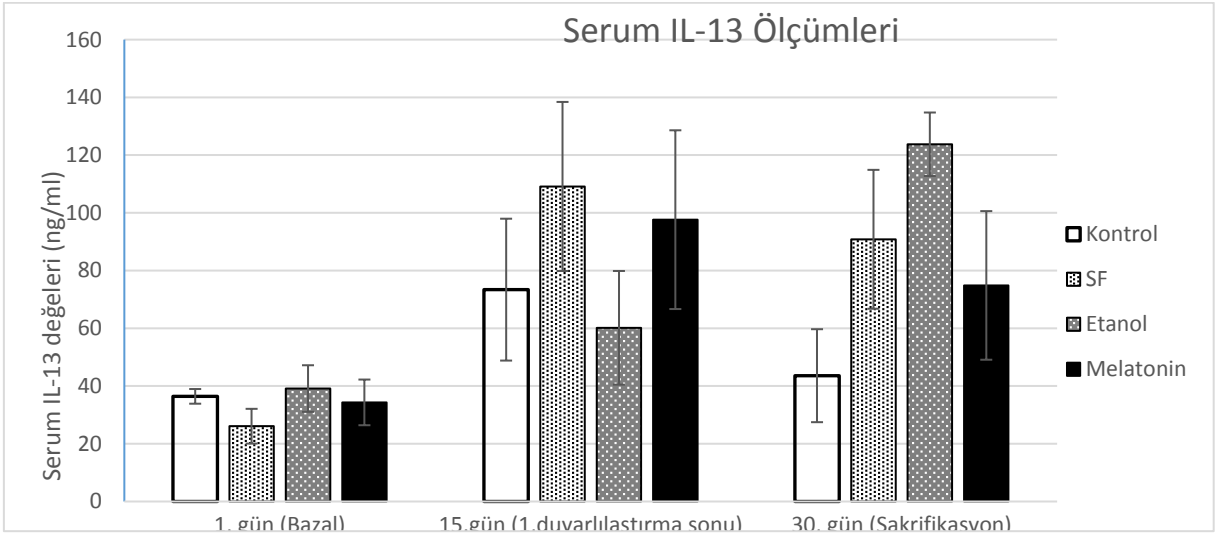
4.2.2. Serum IL-13 ölçüm bulguları

1. Grupların bazal serum IL-13 ortamları 26.08 ± 17.03 - 39.13 ± 22.82 arasında değişiyordu. Gruplar arasında serum bazal IL-13 değerlerinde istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı (Tablo 11, Şekil 14).
2. Serum IL-13 değerleri açısından grupların arasında istatistiksel analizde anlamlı ölçüde fark saptanmadı (Tablo 11).
3. Bütün gruplarda 1., 15. ve 30. gün serum IL-13 ölçümlerinde istatistiksel analizde anlamlı fark saptanmadı (Tablo 11).

Tablo 11. Grupların serum IL-13 değerleri.

Gruplar	IL-13 (pg/ml)			<i>p</i> değeri
	1. gün (bazal)	15. gün (1. duyarlılaştırma sonu)	30. gün (sakrifikasyon)	
Kontrol	36.42 ± 7.19 (36.25 (26.25-47.75))	73.39 ± 69.50 (51.75 (10.75-195.75))	43.58 ± 45.55 (26.25 (7.75-129.25))	0.274

SF	26.08 ± 17.03 (21.00 (10.75-56.25))	109.13 ± 82.83 (116.50 (12.25-220.25))	90.83 ± 68.04 (86.75 (25.25-184.75))	0.311
Etanol	39.13 ± 22.82 (35.00 (16.25-70.25))	60.17 ± 55.67 (37.00 (12.25-154.25))	123.75 ± 31.11 (123.75 (101.75-145.75))	0.223
Melatonin	34.33 ± 22.38 (41.25 (0.25-56.25))	97.63 ± 87.57 (68.50 (0.00-219.25))	74.85 ± 72.80 (47.25 (9.75-198.75))	0.779
<i>p</i> değeri	0.598	0.699	0.353	
Veriler ortalama değer ± standart sapma (ortanca değer (en küçük değer- en büyük değer)) şeklinde ifade edilmiştir. Sağ sütundaki <i>p</i> değeri: <i>Kruskal Wallis Testi</i> , En alt satırdaki <i>p</i> değeri: <i>Friedman Testi</i>				



Şekil 14. Kontrol ve deney gruplarının serum IL-13 değerlerinin bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyondaki değişimi.

4.2.3. Serum melatonin ölçüm bulguları

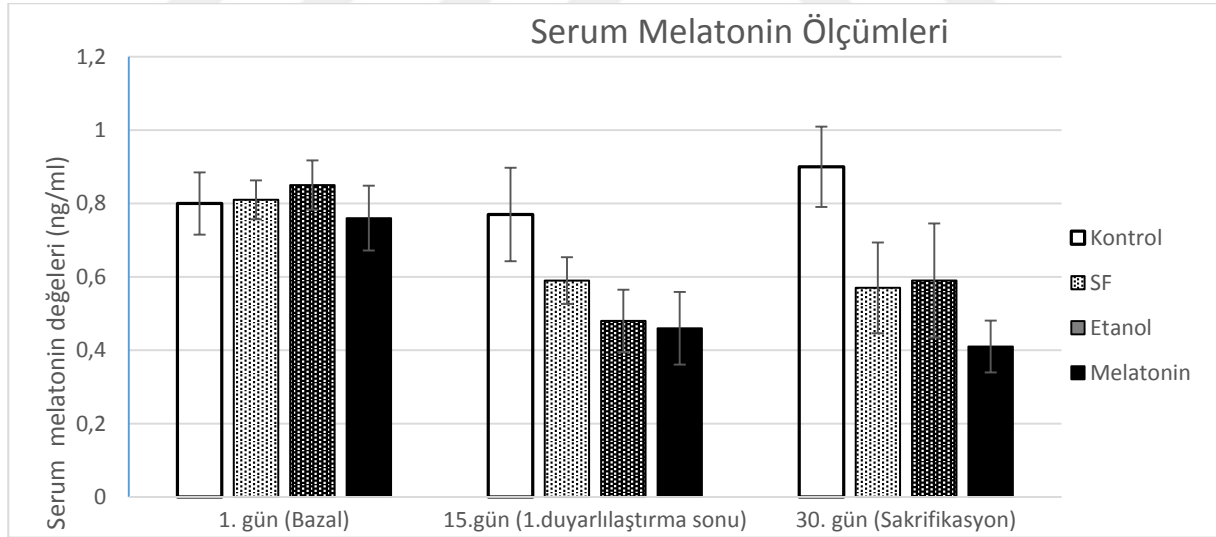
1. Grupların bazal serum melatonin ortalamaları 0.76 ± 0.25 - 0.85 ± 0.19 arasında değişiyordu. Gruplar arasında serum bazal melatonin değerlerinde istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı (Tablo 12, Şekil 15).
2. Serum IL-13 değerleri açısından grupların arasında istatistiksel analizde anlamlı fark bulunmadı (Tablo 12).

3. Bütün gruplarda 1., 15. ve 30. gün serum IL-13 değerlerinde istatistiksel analizde anlamlı fark saptanmadı (Tablo 12).

Tablo 12. Grupların serum melatonin değerleri.

Gruplar	Melatonin (ng/ml)			<i>p</i> değeri
	1. gün (bazal)	15. gün (1. duyarlılaştırma sonu)	30. gün (sakrifikasyon)	
Kontrol	0.80 ± 0.24 (0.79 (0.49-1.05))	0.77 ± 0.36 (0.65 (0.37-1.23))	0.90 ± 0.31 (0.73 (0.56-1.33))	0.223
SF	0.81 ± 0.15 (0.80 (0.60-1.02))	0.59 ± 0.18 (0.61 (0.30-0.88))	0.57 ± 0.35 (0.58 (0.02-0.97))	0.368
Etanol	0.85 ± 0.19 (0.84 (0.56-1.11))	0.48 ± 0.24 (0.54 (0.16-0.71))	0.59 ± 0.44 (0.56 (0.12-1.32))	0.115
Melatonin	0.76 ± 0.25 (0.79 (0.39-1.03))	0.46 ± 0.28 (0.40 (0.15-0.85))	0.41 ± 0.20 (0.38 (0.12-0.72))	0.223
<i>p</i> değeri	0.887	0.442	0.083*	

Veriler ortalama değer ± standart sapma (ortanca değer (en küçük değer- en büyük değer)) şeklinde ifade edilmiştir. Sağ sütundaki *p* değeri: *Kruskal Wallis Testi*, En alt satırdaki *p* değeri: *Friedman Testi*



Şekil 15. Kontrol ve deney gruplarının serum IL-13 değerlerinin bazal, 1. duyarlılaştırma sonu ve sakrifikasyondaki değişimi.

4.3. Histolojik inceleme

Kontrol grubu:

Kontrol grubunda, nazal kavite, septum ve lateral duvarların ışık mikroskopik incelemesinde normal histolojik yapı izlendi. Aralarında goblet hücreleri içeren pseudostrafiyel silindirik hücreler ile döşeli respiratuvar epitel izlendi. Lamina propriada inflamatuvar hücreler ve eozinofil infiltrasyonu yoktu. Bağı dokusunda vasküler konjesyon ve proliferasyon saptanmadı. Bağı dokudaki glandlar ve kondrositler doğal ve normaldi (Şekil 14-16, 31-33).

Serum Fizyolojik (SF) Grubu:

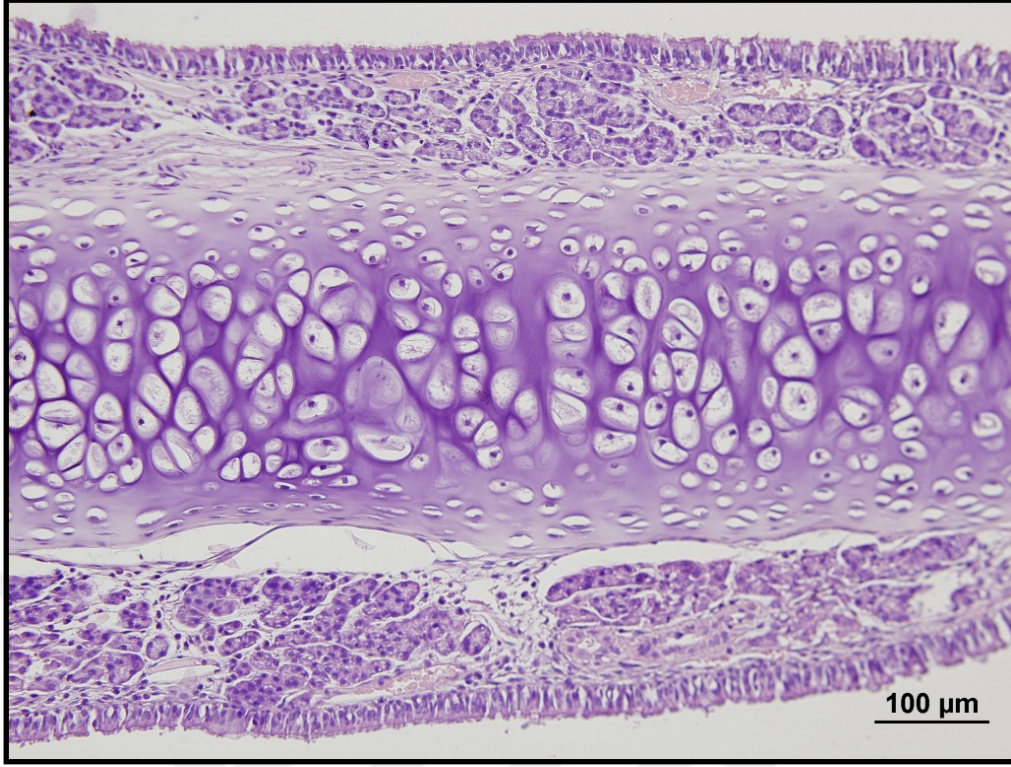
Serum fizyolojik verilen sıçanlarda, H&E boyamada solunum yolu epitelinde silyumlarda azalma ve yer yer kayıp ile inflamatuvar ve eozinofilik hücre infiltrasyonu görüldü. Bağı dokuda vasküler konjesyon ve proliferasyon belirgindi. Kondrositler hipertrofikti (Şekil 17-22). AB/PAS serileri goblet hücre sayısındaki çoğalmayı ortaya koydu (Şekil 34 ve 35).

Etanol Grubu:

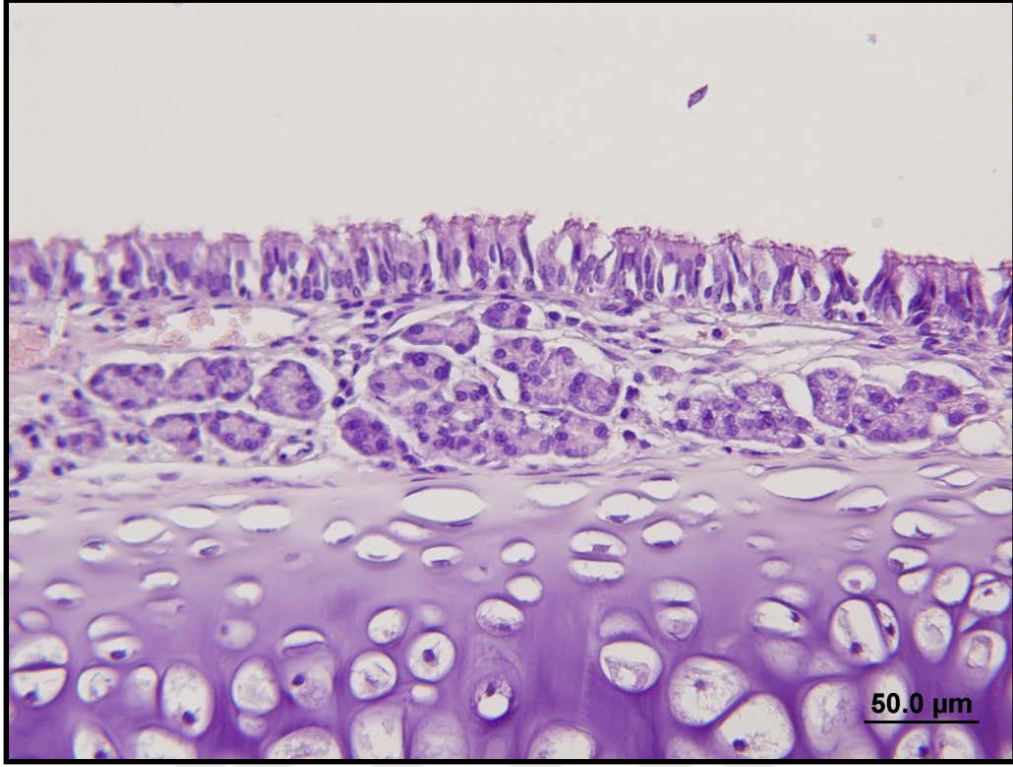
Etanol grubunda, SF grubundakilere benzer şekilde, H&E boyamada solunum yolu epitelinde silyumlarda azalma ve yer yer kayıp ile inflamatuvar ve eozinofilik hücre infiltrasyonu görüldü. Bağı dokuda vasküler konjesyon ve proliferasyon belirgindi. Kondrositler hipertrofikti (Şekil 23-28). AB/PAS serileri goblet hücre sayısındaki çoğalmanın oldukça aşıkardı (Şekil 36-37).

Melatonin Grubu:

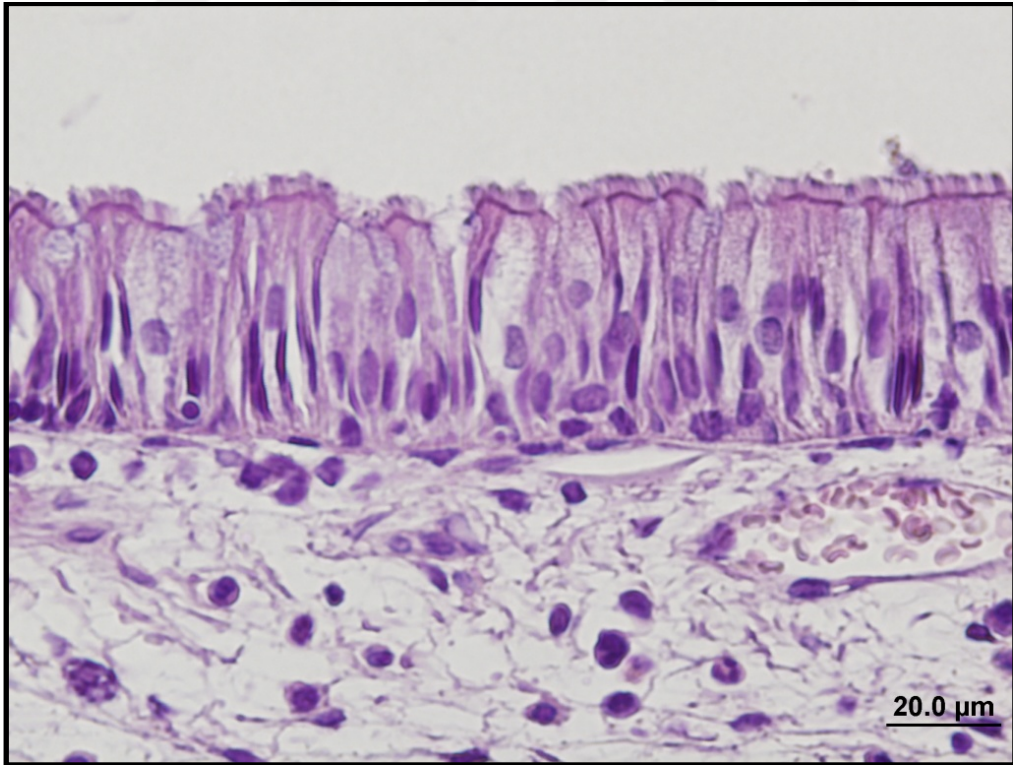
Melatonin grubunda solunum yolu epitelinde silyumlardaki azalma çok az ve görünüm hemen hemen kontrol grubu gibiydi. SF ve Etanol gruplarında artan eozinofil ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun melatonin grubunda çok daha az olduğu belirlendi. Bağı dokuda çok az miktarda vasküler konjesyon ve proliferasyon vardı. Kondrositler ise çok az oranda hipertrofikti (Şekil 29-31). AB/PAS serilerindeyse SF ve Etanol gruplarındaki sıçanlarda görülen goblet hücrelerindeki artışın azaldığı ve kontrol grubuna yaklaştığı görüldü (Şekil 38-39).



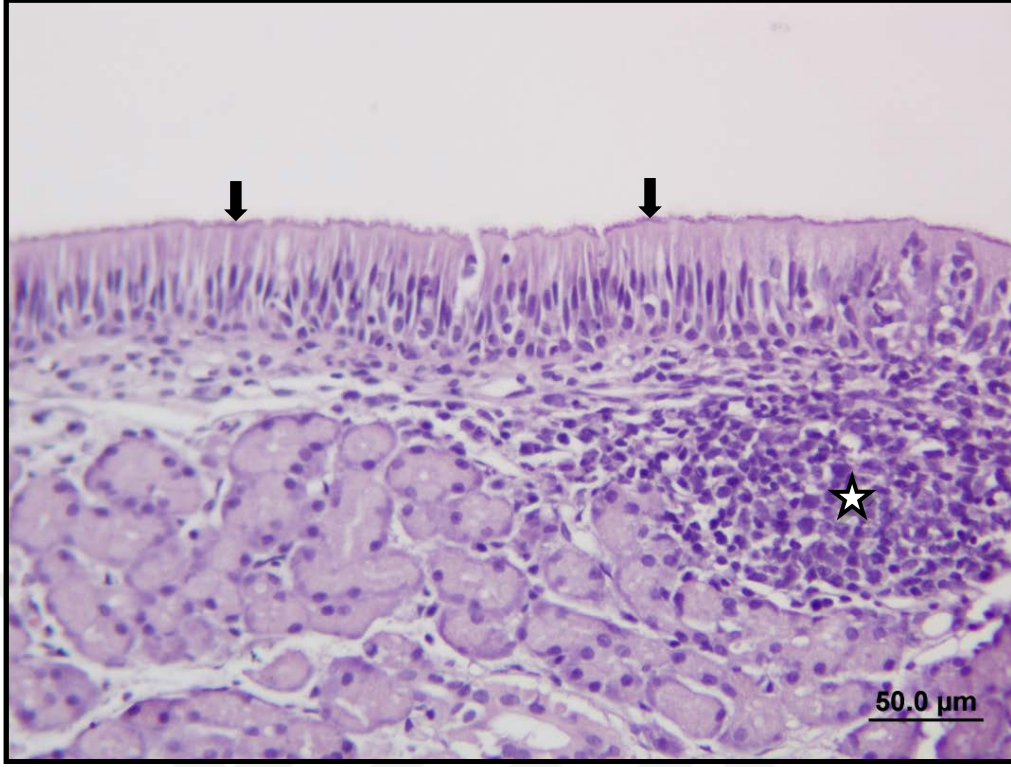
Şekil 16. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x20



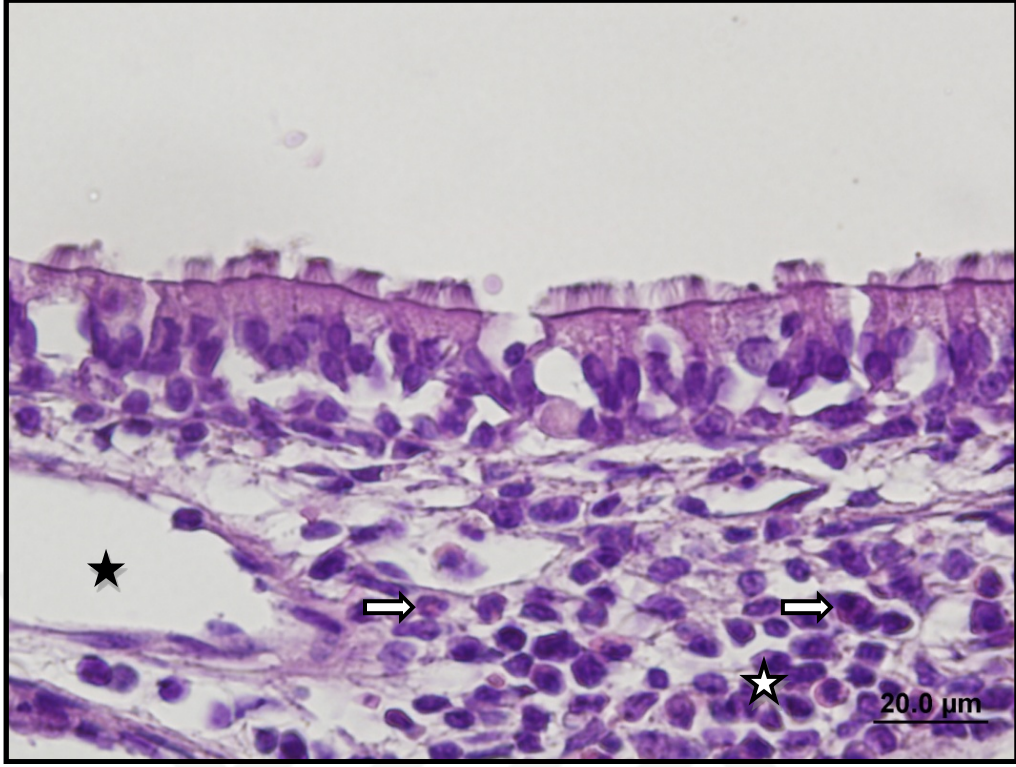
Şekil 17. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x40



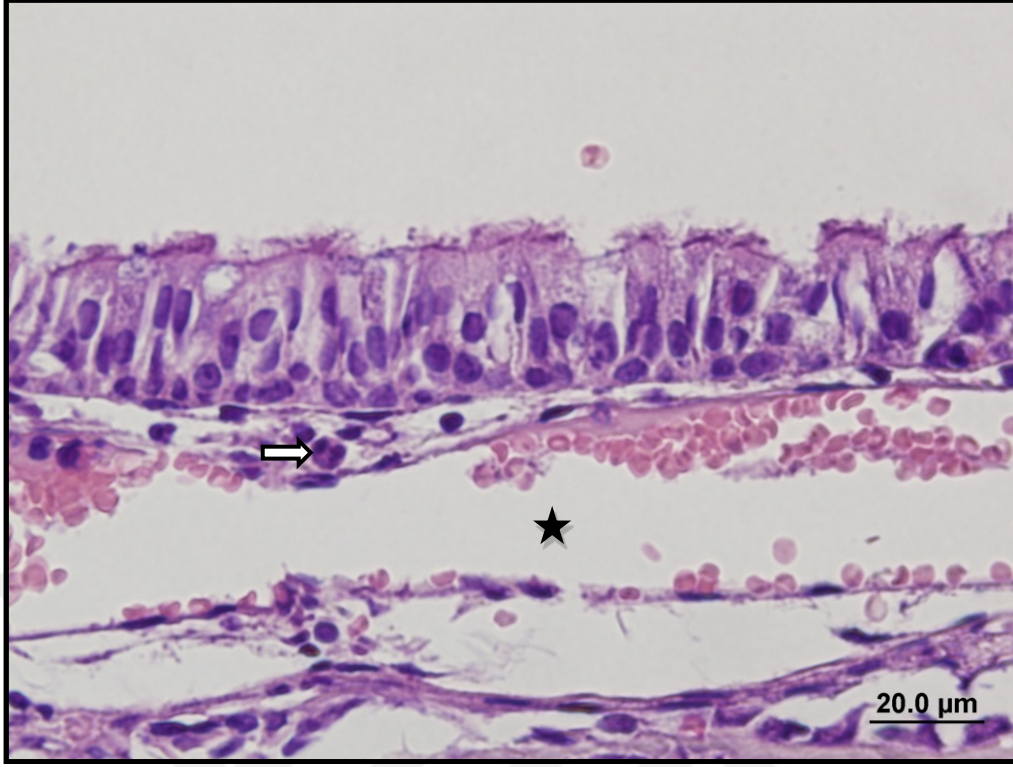
Şekil 18. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, H&E x100



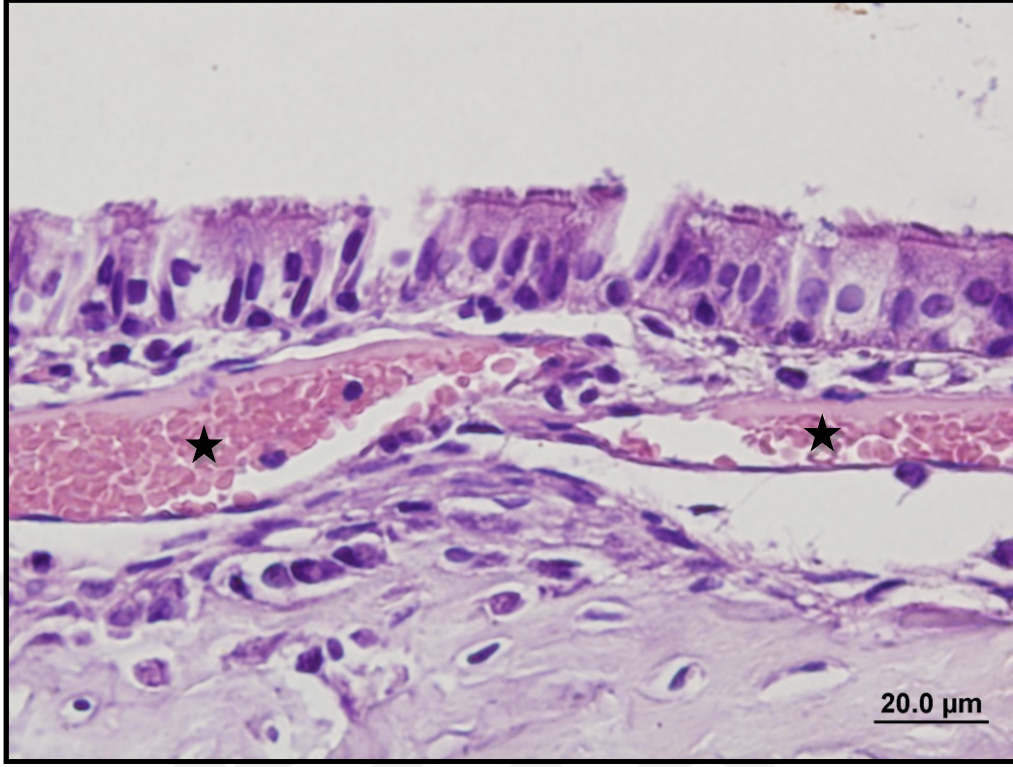
Şekil 19. SF grubu, epitel hücrelerinde sil kaybı (➡) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (★), HE X40



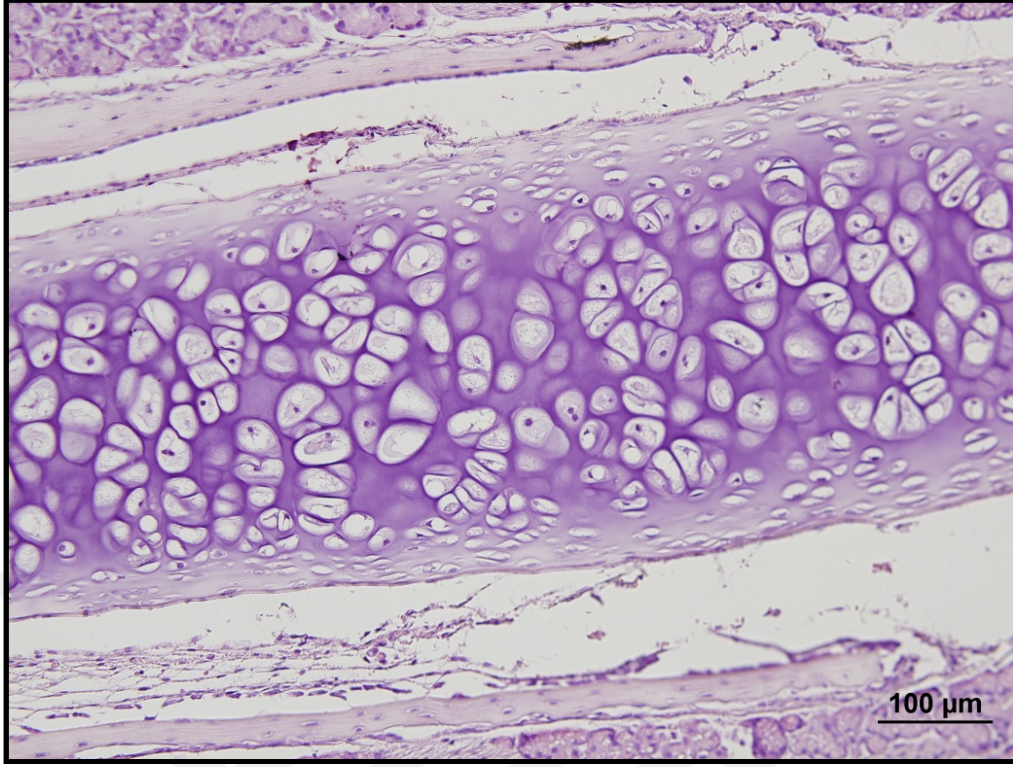
Şekil 20. SF grubu mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eozinofil hücrelerinde (⇒) artma ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



Şekil 21. SF grubundaki eozinofil infiltrasyonu (⇒) ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



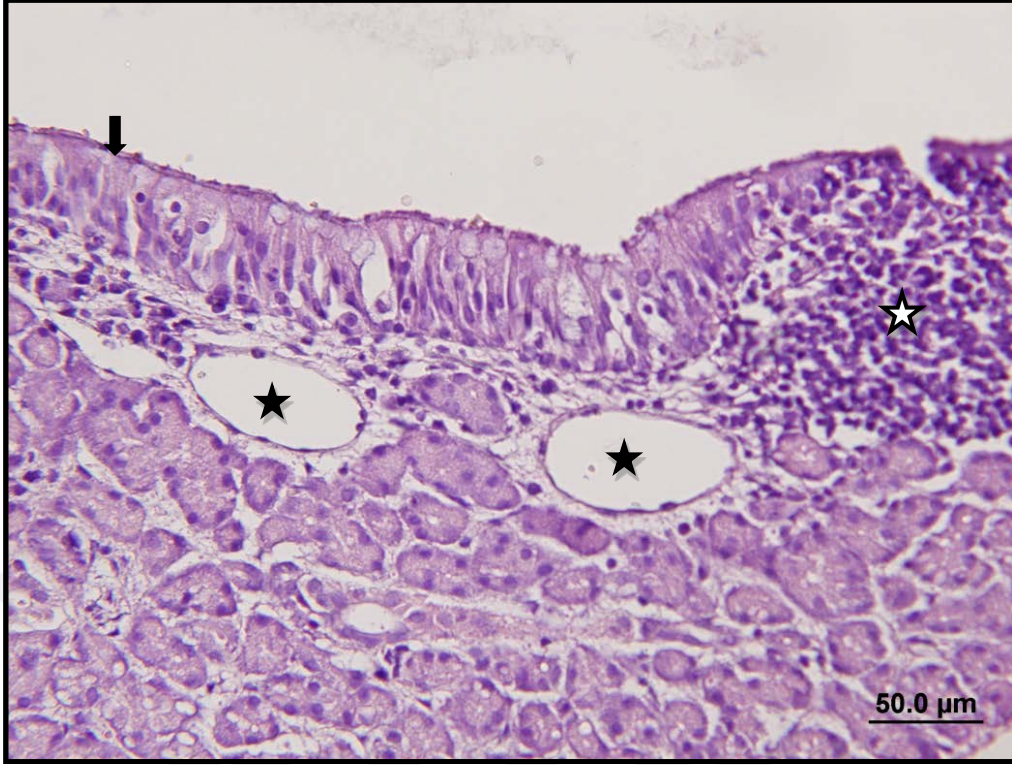
Şekil 22. SF grubu vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



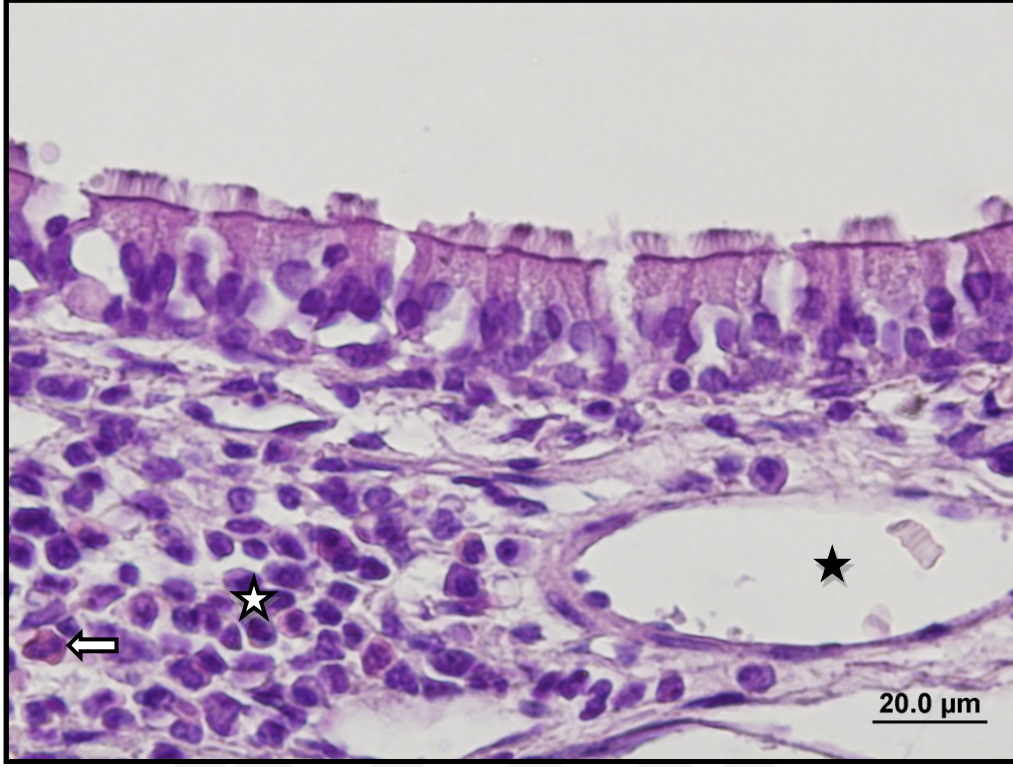
Şekil 23. SF grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x2



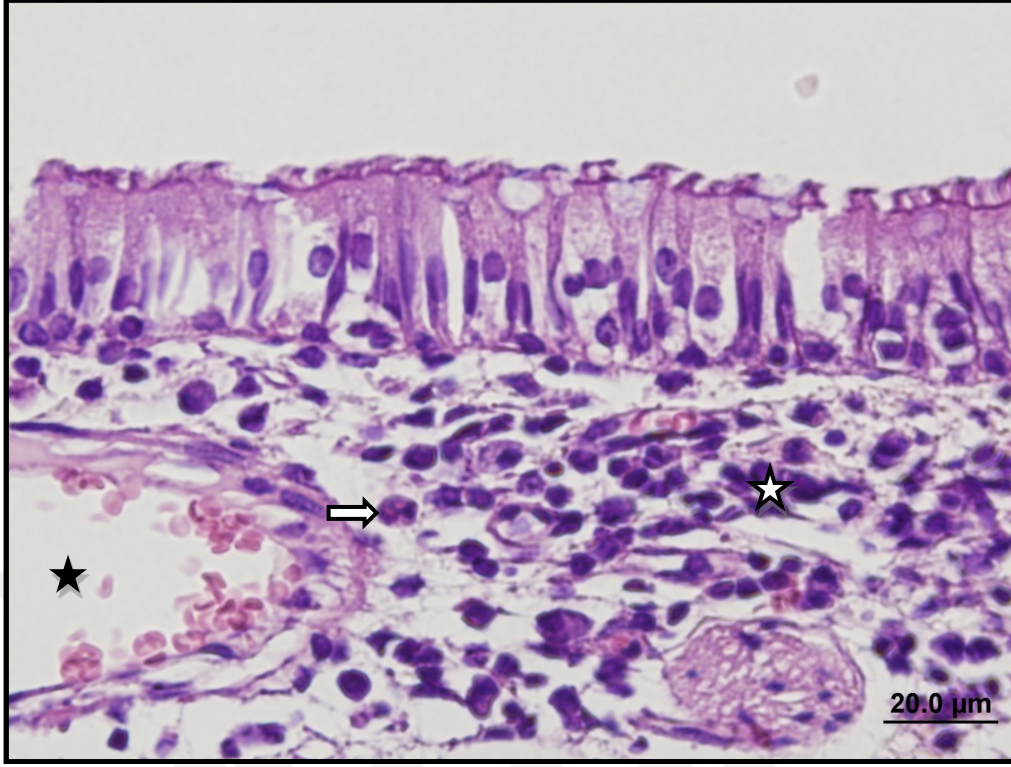
Şekil 24. SF grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x40



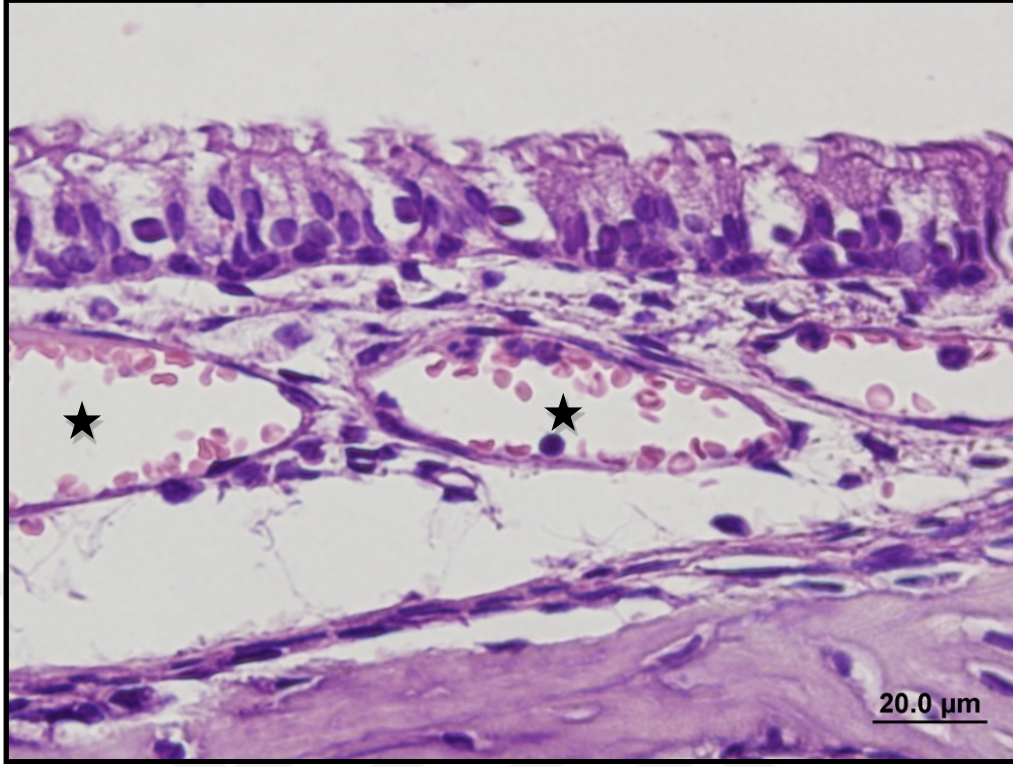
Şekil 25. Etanol grubu epitel hücrelerinde silyum kaybı (➡), mononükleer hücre infiltrasyonu (★) ve vasküler konjesyon (★), H&E x40



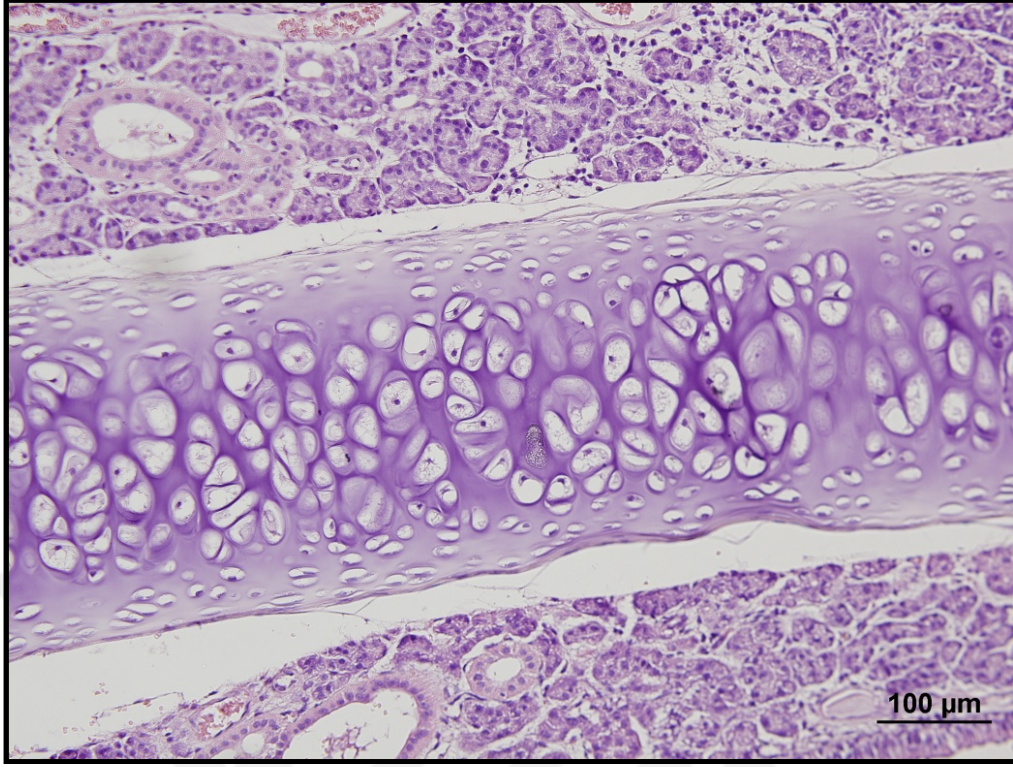
Şekil 26. Etanol grubu eozinofil (⇨) artışı, mono-nükleer hücre infiltrasyonu (☆) ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



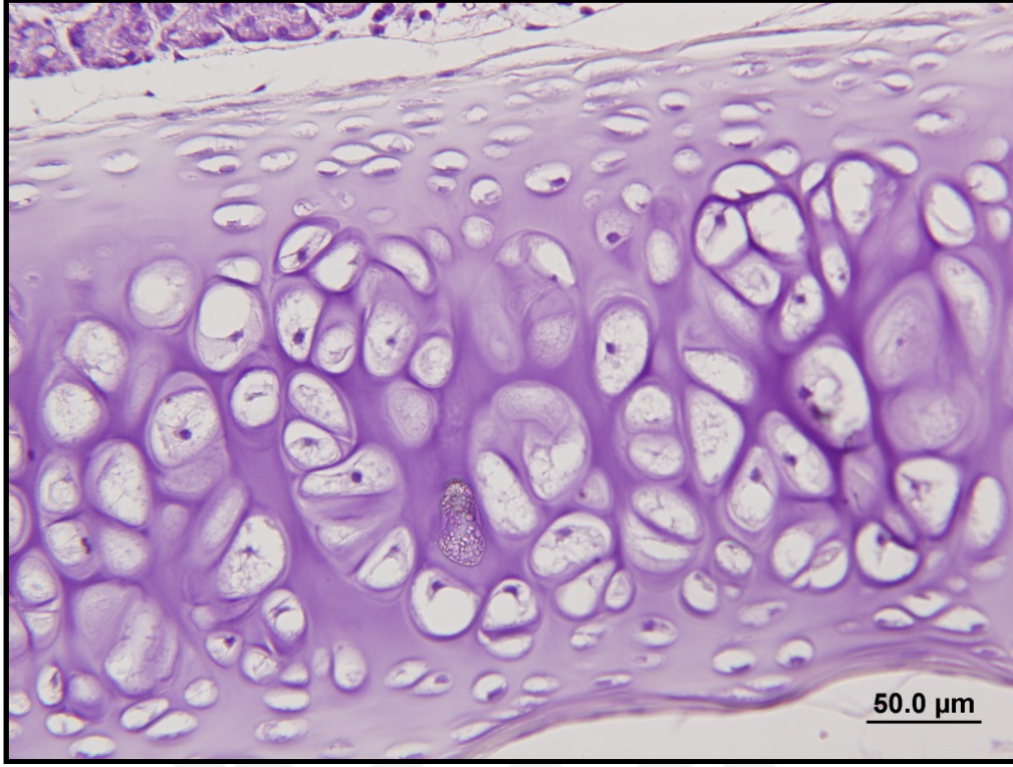
Şekil 27. Etanol grubunda eozinofillerde (⇨) artış, mono-nükleer hücre infiltrasyonu (★) ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



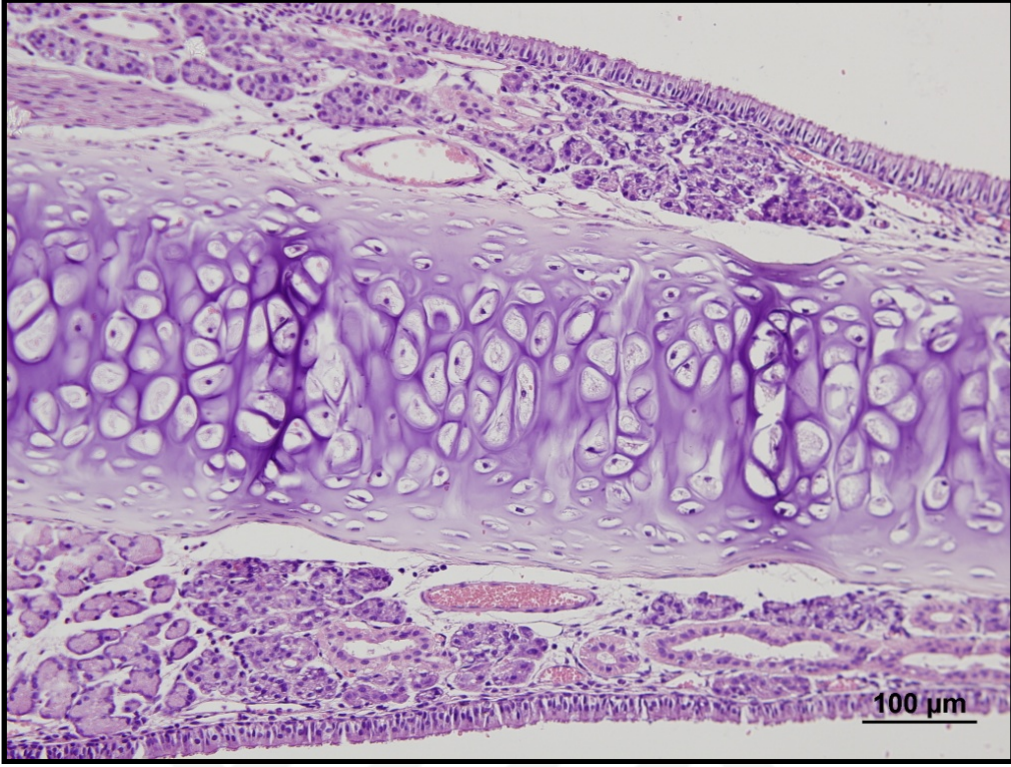
Şekil 28. Etanol grubu vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon (★),
H&E x100



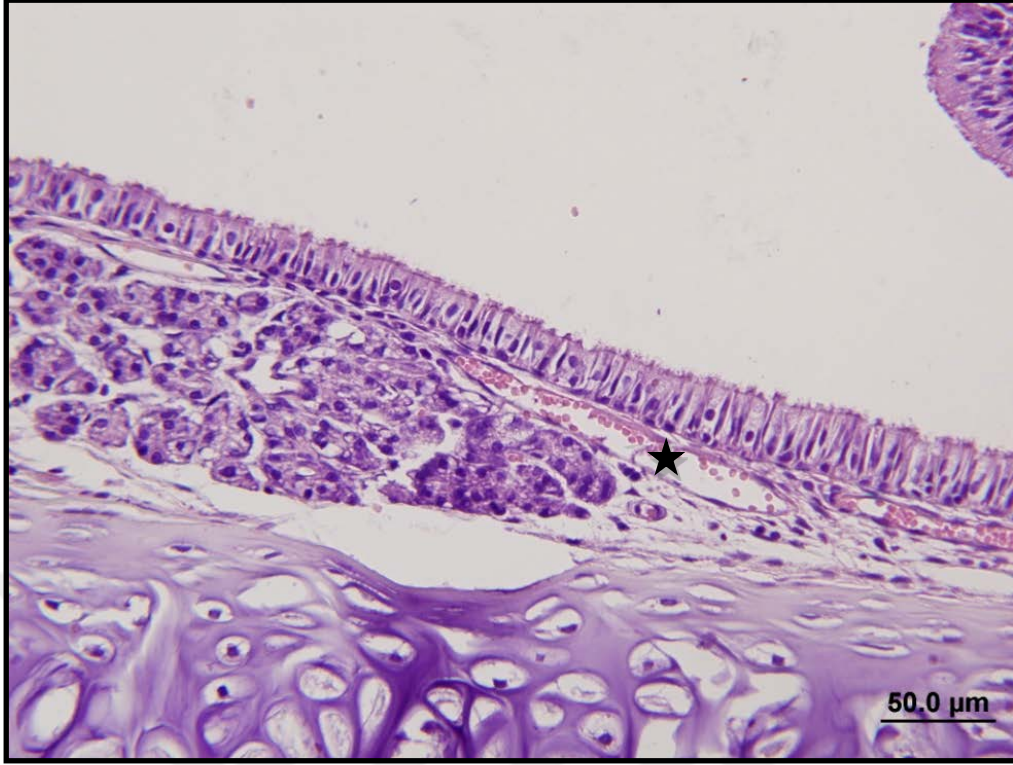
Şekil 29. Etanol grubu kondrosit hipertrofisi, H&E x20



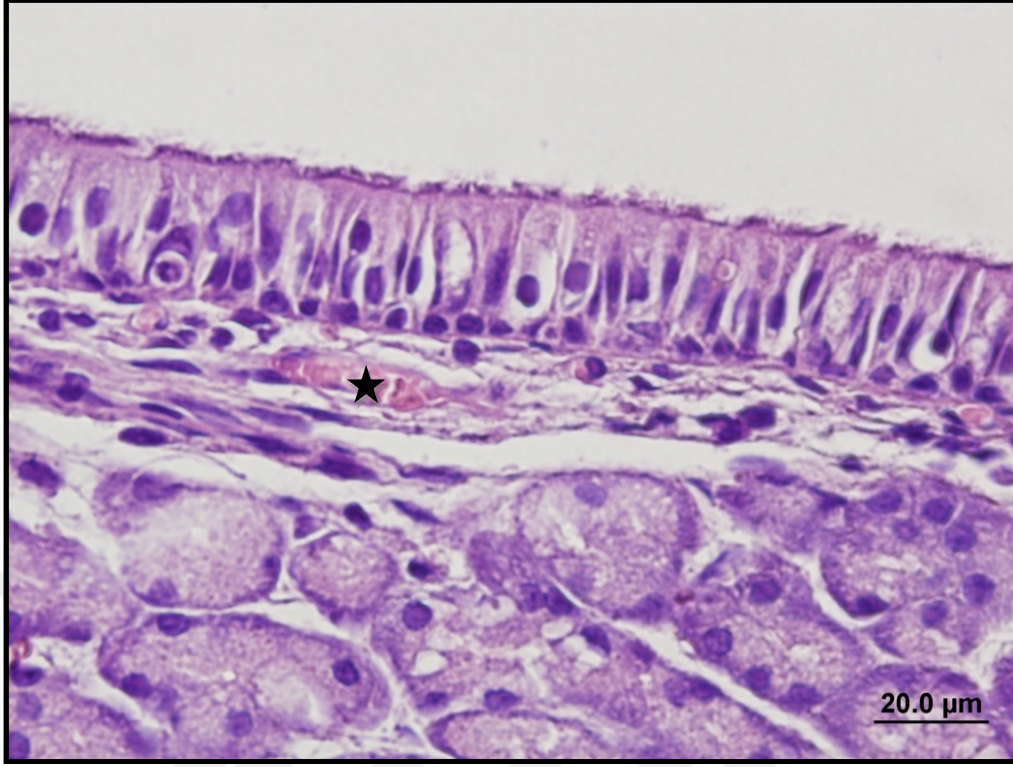
Şekil 30. Etanol grubunda kondrosit hipertrofisi, H&E x40



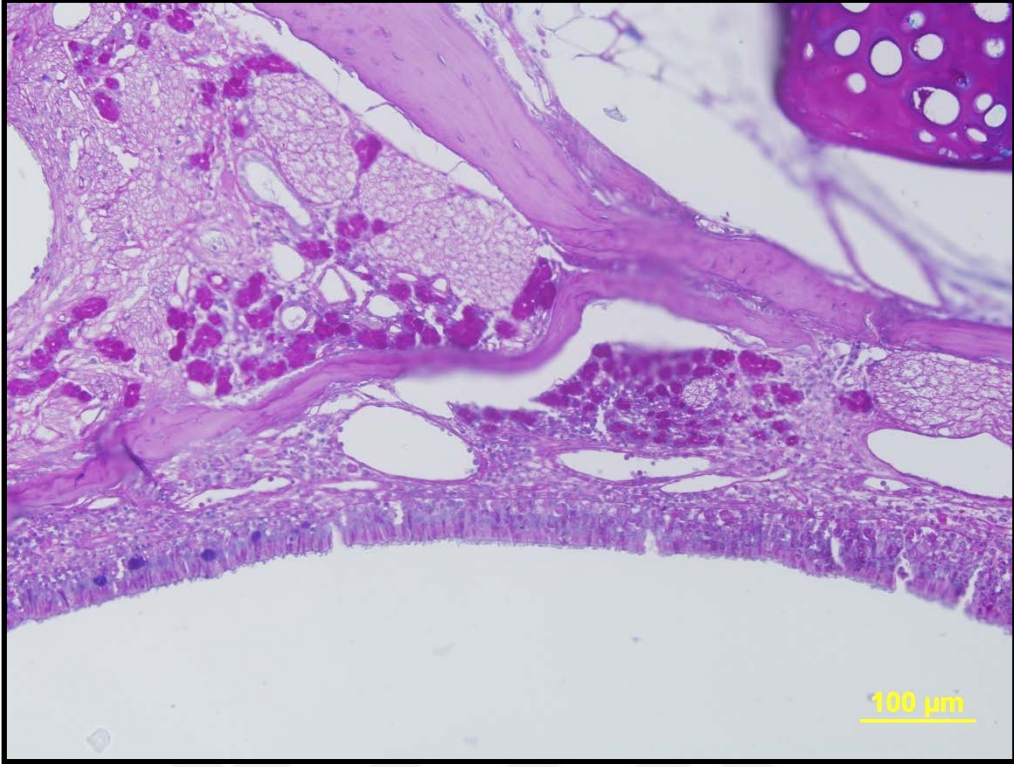
Şekil 31. Melatonin grubunda genel görünüm, H&E x20



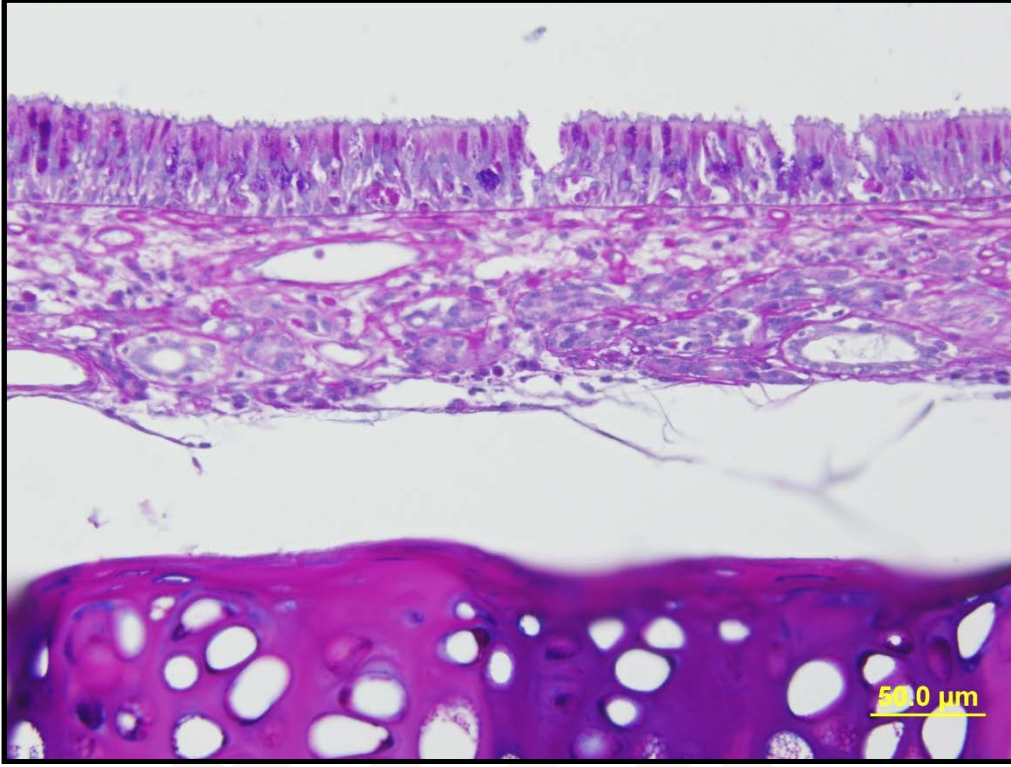
Şekil 32. Melatonin grubunda az miktarda vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon (★), H&E x40



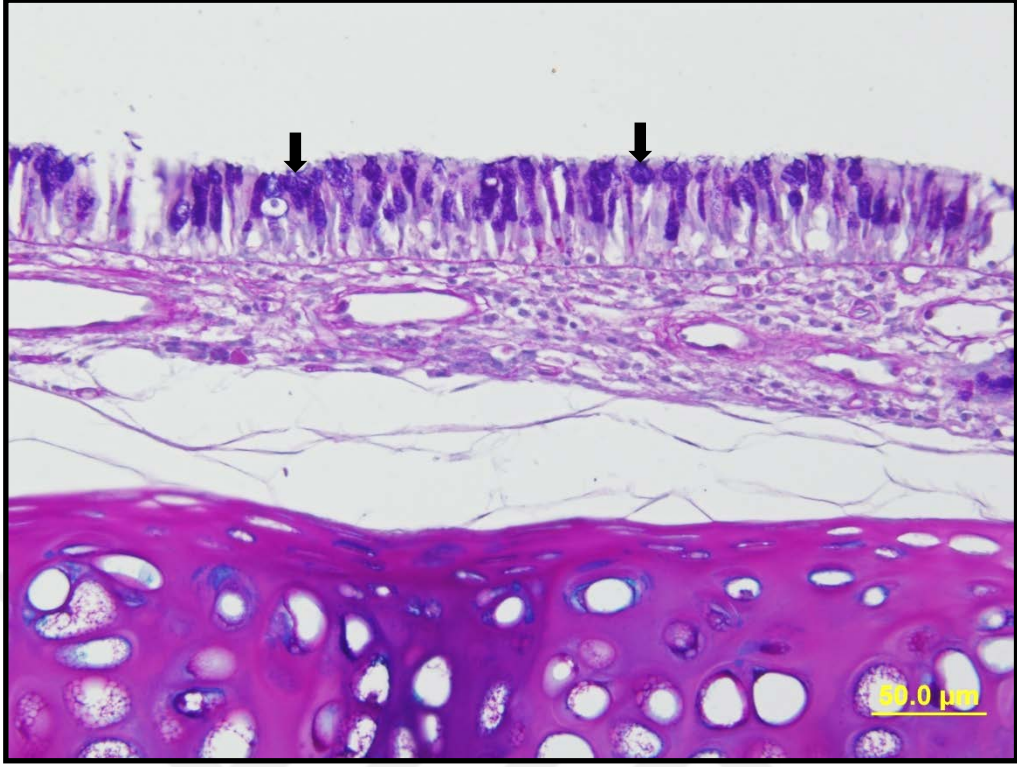
Şekil 33. Melatonin grubunda az miktarda vasküler proliferasyon ve vasküler konjesyon (★), H&E x100



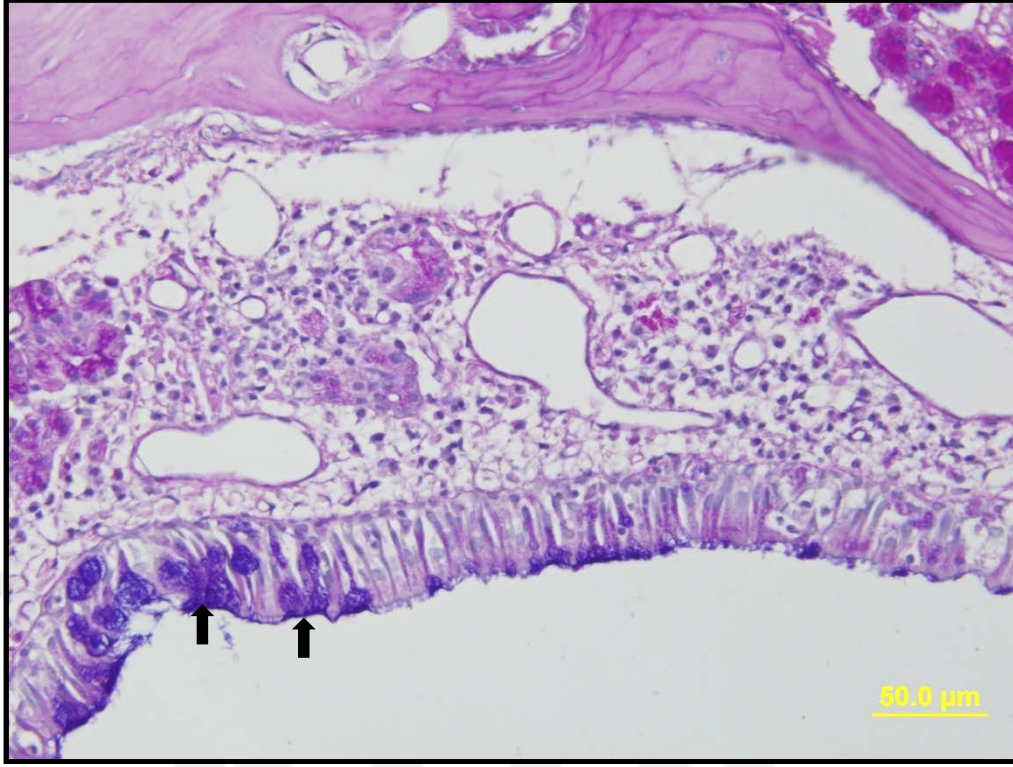
Şekil 34. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, AB / PAS x20



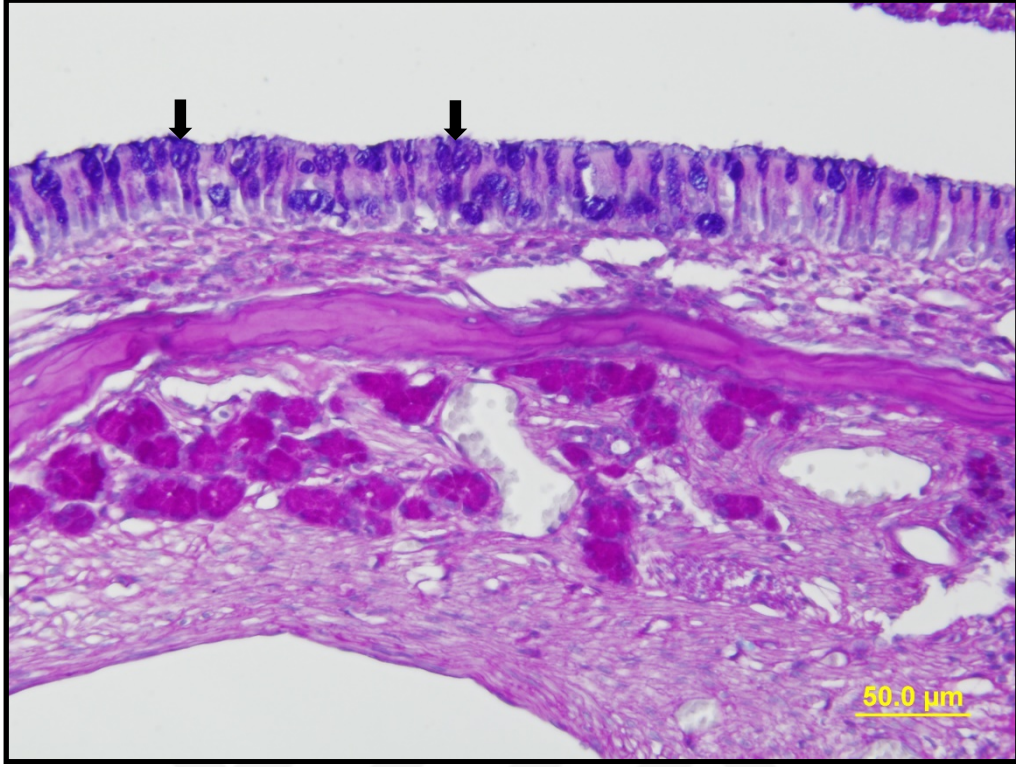
Şekil 35. Kontrol grubunda normal histomorfoloji, AB / PAS x40



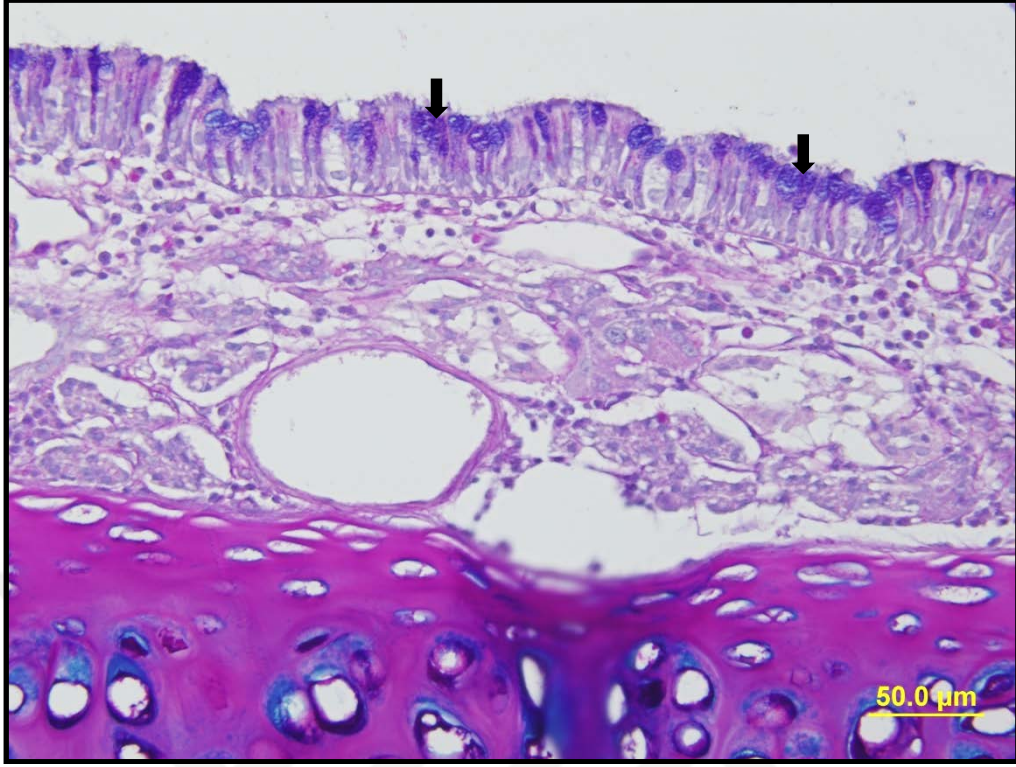
Şekil 36. SF grubunda goblet hücrelerindeki artma (➡), AB / PAS x40



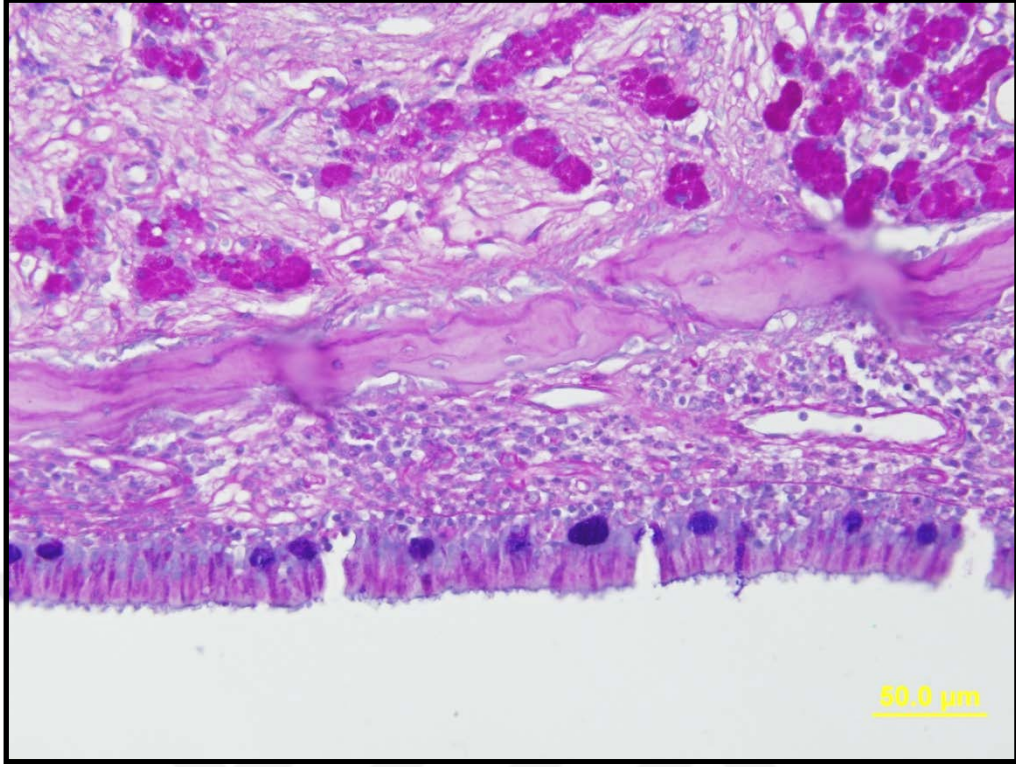
Şekil 37. SF grubunda goblet hücrelerindeki artma (➡), AB / PAS x40



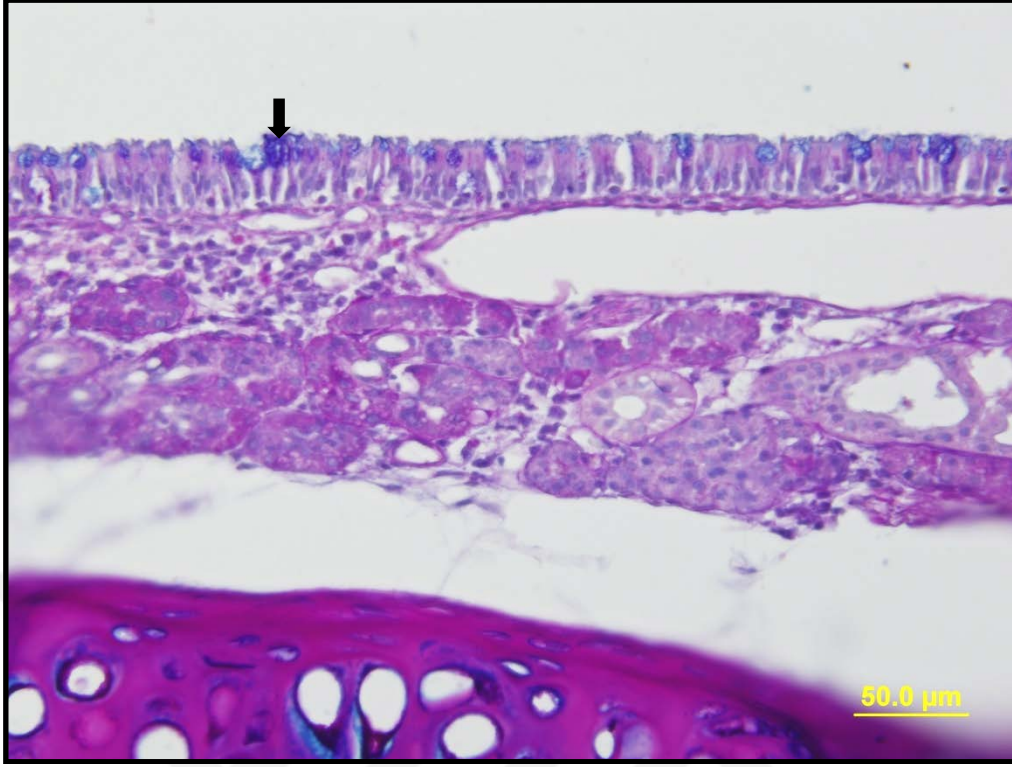
Şekil 38. Etanol grubunda goblet hücrelerinde (➡) artış, AB / PAS x40



Şekil 39. Etanol grubunda artmış goblet (↔) hücreler, AB / PAS x40



Şekil 40. Melatonin grubundaki görünüm, AB / PAS x40



Şekil 41. Melatonin grubunda goblet hücreleri (➡), AB / PAS x40

Histolojik Skorlar

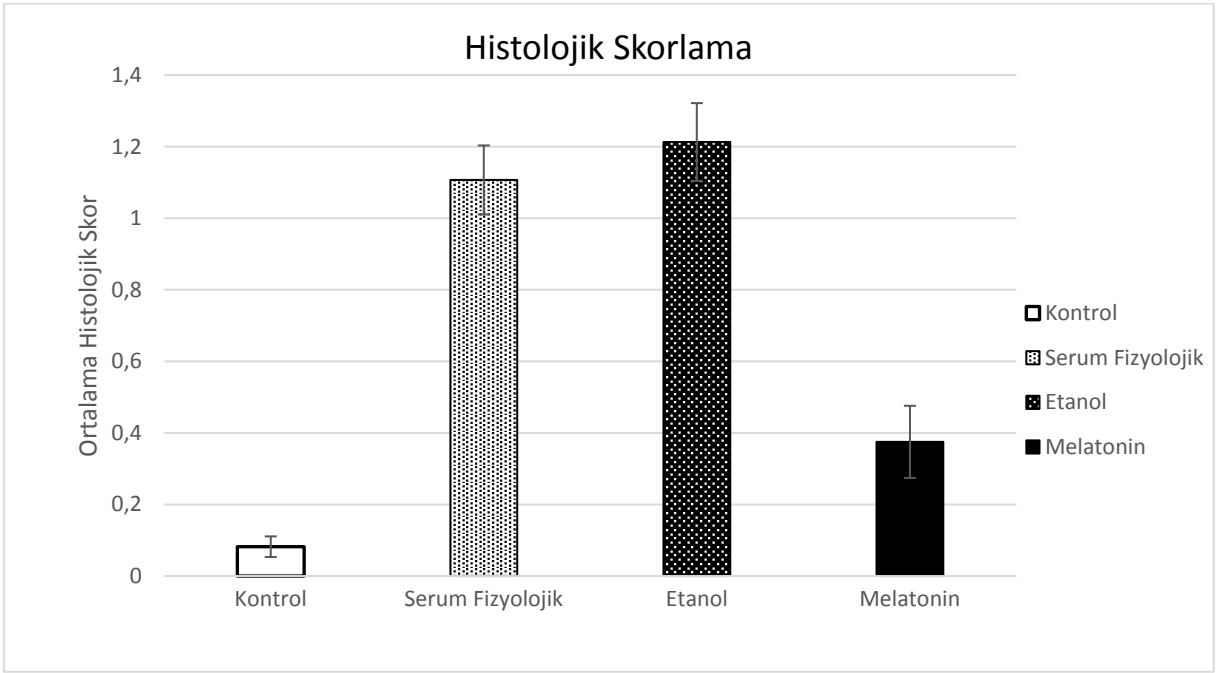
Histolojik skorlar, bu çalışmadan elde edilen veriler içerisinde normal dağılıma uyan tek veri setiydi. Bu nedenle istatistiksel analizleri ANOVA ve post-hoc Tukey testi ile gerçekleştirildi. Deney gruplarının histolojik skorları istatistiksel analizde kıyaslandığında anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$, Tablo 13, Şekil 40). Kontrol grubuna ait histolojik skor, istatistiksel analiz sonucunda SF ve etanol grubundan anlamlı şekilde düşük saptandı ($p < 0.001$, Tablo 13). Kontrol ve melatonin grubu arasında histolojik skor açısından anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p = 0.122$, Tablo 13). Melatonin grubunun histolojik skoru, istatistiksel analiz sonucunda, SF ve etanol grubundan anlamlı şekilde düşüktü ($p < 0.001$, Tablo 13).

Tablo 13. Gruplarının histolojik skor ortalamaları.

Grup	Ortalama histolojik skor	<i>p</i> değeri	İkili grup karşılaştırması	Post-hoc <i>p</i> değeri
Kontrol	0.082 ± 0.076	$<0.001^*$	Kontrol-Serum fizyolojik	$<0.001^{**}$
	1.107 ± 0.273		Kontrol-Etanol	$<0.001^{**}$

Serum fizyolojik		Kontrol-Melatonin	0.118
Etanol	1.213 ± 0.266	Melatonin-Serum fizyolojik	<0.001**
Melatonin	0.375 ± 0.285	Melatonin-Etanol	<0.001**
		Serum fizyolojik -Etanol	0.850

Veriler ortalama değer ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. p değeri: ANOVA testi, *ANOVA testinde p değeri 0.05, **post-hoc Tukey Kramer testi p değeri<0.05



Şekil 42. Kontrol ve deney gruplarının histolojik skor ortalamaları.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ovalbumin ile indüklenen sıçan alerjik rinit modelinde melatoninin etkisi araştırılmış ve melatoninin alerjik rinitin klinik semptomları ve histolojik bulgularını geriletmediği bulunmuştur.

5.1. Ovalbümin ile oluşturulan alerjik rinit modelinin tartışılması

Çalışmada, sıçanlara 14 gün süre ile günaşırı verilen ovalbumin deney gruplarında (serum fizyolojik, etanol ve melatonin grupları) AR'nin 1. Duyarlılaştırma fazını oluşturdu. Bazal ölçümlerde total nazal semptom skorları tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken deney gruplarının    nde de total nazal semptom skorları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Bu bulgu, çalışmada AR modelinin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir. Deney hayvanlarında AR, alerjenin intranazal provakasyonu ile taklit edilebilir. Ancak bu yöntemle tek bir alerjenle oluşturulan AR, klinik pratikte polen mevsiminde hastanın pek çok alerjene maruz kalması sonucu oluşan AR'nin doğal seyrinden farklıdır (1, 77).

Deney hayvanlarında AR intraperitoneal ovalbumin sensitizasyonunu izleyen intranazal pipetle ovalbumin sensitizasyonu yapılması ile oluşturulur (54-67). Sıçanlarda AR oluşturmak için intraperitoneal yolla verilen ovalbumin dozları 0.1-1 mg/ml arasında değişmektedir (55, 56, 58, 59, 61). Bununla birlikte, en sık kullanılan intraperitoneal ovalbumin dozu, çalışmamızda da tercih ettiğimiz 0.3 mg/ml'dir (62-64). Birinci duyarlılık fazından sonra ikinci duyarlılığı oluşturmak için verilen intranazal ovalbumin dozu da 0.1ml'ye kadar çıkmaktadır (57, 62, 66). Çalışmamızda, ikinci duyarlılık fazını oluşturmak için en sık kullanılan 20 mg/ml ovalbumin tercih edilmiştir (54, 63).

Deney hayvanlarında AR modelleri 2019 yılında bir konsensüs makalesi ile açıklanmıştır (67). Bununla birlikte, gerek bu makalede gerekse literatürdeki diğer deneysel AR çalışmalarında semptomların hangilerinin, ne kadar süre ile ve nasıl skorlanacağına ilişkin bir standardizasyon yoktur. Sıçan modelleri dikkate alındığında, bazı yazarlar sadece hapşırık sayısını saymışlar (66), bazı yazarlar hapşırık ve burun kaşıntısını skorlamışlar (58), bazıları ise hapşırık, burun kaşıntısı ve burun akıntısını skorlamışlardır (54, 63, 65). Bu skorlamalar, alerjenin intranazal uygulamasını izleyen ilk 10 dakikalık sürede gözlemle yapılmıştır. Hapşırık skoru 10 dakika içerisindeki sayısına göre şöyle belirlenmektedir: 0 (0 hapşırık/10 dk), 1 (1-3 hapşırık/10 dk), 2 (4-9 hapşırık/10 dk) ve 3 ( 10 hapşırık/10 dk). Burun kaşıntısı, ellerin burun üzerinde ileri ve geri gittiği bir harekettir. Burun kaşıntısı bir dakikadaki sayıya göre; 0 (0 kaşıma hareketi/dk), 1 (2 kaşıntı hareketi/dk), 2 (4-6 kaşıntı hareketi/dk) ve 3 (>6 kaşıntı hareketi/dk) olarak skorlanmıştır. Burun akıntısı ise 0 (akıntı yok), 1 (akıntı burun

deliğinin içinde), 2 (akıntı burun deliğinin dışında da var) ve 3 (akıntı sürekli dışarı akıyor) şeklinde skorlanmış, bu üç parametrenin toplamı ≥ 5 ise AR olduğu kabul edilmiştir (54, 63, 65). Çalışmamızda burun akıntısını skorlamadığımız için AR'in oluşması için total nazal semptom skorunun 4'e eşit veya büyük olmasını ölçüt olarak belirledik.

Nazal semptom skorlarından hapşırıkların gözlenmesi ve sayılması oldukça kolay olsa da kaşıntının skorlanması kobaylar dışında kolay ve objektif değildir. Hapşırıklar ile birlikte görülen kaşıntıların gözlenmesi daha önemlidir (78). Burun akıntısı ve konjesyona bağlı oluşan geçici tıkanıklık da erken faz yanıtlar içerisinde olup kobay ve sıçanlar gibi bazı hayvanlarda burundan çıkan çatırtı benzeri ses (nazal crackle, akustik fenomen) gözlenebilir (67). Her ne kadar burun akıntısı da semptom skorlarına dahil edilmiş olsa da, aslında tıpkı burun tıkanıklığında olduğu gibi objektif yöntemlerle yani gravimetrik olarak toplanan akıntı miktarındaki artışın (78) veya histolojik olarak goblet hücre degranülasyonu ve artmış mukus salgılamasının gösterildiği çalışmalara (73, 74) da rastlanmaktadır. Çalışmamızda, kontrol grubunda yaklaşık 0.3 olan total nazal semptom skorunun, 14 gün boyunca ovalbumin verilen deney gruplarında (serum fizyolojik, etanol ve melatonin) 5'in üzerinde olduğu saptanması deney modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.

AR modelinde alt solunum yoluna alerjen kaçıışının minimum düzeyde olması, alerjenin nazal kavite içerisinde kalması istenmektedir. İntranazal uygulama ile, özellikle de deney hayvanı anestezi altında değilken verilen alerjenin %95'i nazal kavite içinde kalmaktadır (79). Sıçanlarda baş ve burnun farelere göre daha büyük olması ve bu nedenle oluşacak uygulama avantajı sayesinde intranazal uygulamanın daha kolay yapılabileceği, böylece alerjenin burun içine tam olarak verilmesinin sağlanacağı ve modelin başarısının daha yüksek olacağı ön görülmektedir. Ayrıca, kemirgenlerde insan burun mukozasından farklı olarak nazal kavitenin %50'si sensöriyal (koku) epiteli, kalan %50 ise solunum yolu epiteleridir. İnsanlarda ise koku epiteli sadece %3 oranındadır. Büyüklük farkı nedeniyle, oran benzer olsa da sıçanlarda nazal kavite içindeki solunum epitel alanı daha fazladır. Ayrıca insandakine benzer geçiş zonu da bulunmaktadır. Çalışmamızda, AR modeli sonrasında histolojik inceleme de yapılacağı için solunum yolu epitelinin net bir şekilde gözlenebilmesi ve çıkartılması gerekmektedir. Bu açıdan bakıldığında da kafanın ve nazal kavite içinin büyük olması ve insan morfolojisine daha yakın olması çalışma sonuçlarının elde edilebilmesi için son derece önemliydi (77, 80-82).

5.2. İkinci duyarlılık fazında verilen serum fizyolojik, etanol ve melatoninin alerjik rinit üzerindeki etkilerinin tartışılması

5.2.1. Nazal Semptom Skoru Üzerindeki Etkilerin Tartışılması

İkinci duyarlılık fazının sonunda, melatonin verilen sıçanların nazal semptom skorları, istatistiksel analiz sonucunda kontrol grubuna benzer bulundu ancak serum fizyolojik ve etanol grubundan anlamlı şekilde düşüktü (Tablo 6). Bu durum sıçanlara ikinci duyarlılaştırma fazında melatonin verilmesinin AR klinik belirtilerinin göstergesi olan nazal semptom skorunu hafiflettiği veya ortadan kaldırdığını göstermektedir. Grupların kendi içindeki karşılaştırmalarında da (Tablo 7) bulgular melatoninin etkililiğini desteklemektedir. Etanol grubunda sayısal olarak farklılık olmasına (Tablo 5) ve post-hoc analizde anlamlılık çıkmamasına (Tablo 7) karşın, kontrol grubu dışında tüm grupların bazal ve 1. duyarlılaştırma sonu ölçümleri ile bazal ve 2. duyarlılaştırma sonu ölçümleri birbirinden farklıdır. Melatonin grubunda bazal ve 2. duyarlılaştırma sonu değerleri arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Öte yandan, Etanol ve SF gruplarında, AR oluşmuş, skorlar bazale göre belirgin artmış ama deneyin sonunda değişmemiştir. Melatonin grubunda ise deneyin sonundaki skor AR oluştuktan sonraki skordan belirgin derecede düşüktür (Tablo 7).

Her ne kadar melatoninin AR'de kullanımı ile ilgili literatürde deneysel ve klinik çalışmaya rastlanmasa da sıçan ovalbumin AR modelinin kullanıldığı çalışmalarda kontrol gruplarında nazal semptom skorlarının çalışmamızda olduğu gibi deney boyunca benzer ve düşük olduğu, sham gruplarında ise (çalışmamızdaki etanol ve SF grupları gibi) 1. duyarlılaşma fazında anlamlı şekilde arttığı, hatta deneyin ilerleyen dönemlerinde de giderek arttığı bildirilmiştir. Tedavi gruplarında ise çalışmamızda melatonin grubunda gördüğümüze benzer şekilde semptom skorlarında genellikle zamana bağlı seyir gösteren bir düşüş paterni saptanmıştır (54, 63, 83). Yapılan bir çalışmada serum fizyolojik(SF) verilen grupta 1. duyarlılaşma fazından deney sonuna kadar nazal semptom skorlarının kontrol grubuna göre 14, 17, 20, 23, 26, ve 28. günde yapılan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı, doksisisiklin tedavisi verilen grupta ise 14. günde SF grubu ile benzer saptanırken 17, 20, 23, 26 ve 28. günde SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşme saptandığı gösterilmiştir (54). Tedavi olarak botulinum toksini (63) ve bir flavanoid olan quercetin (83) verilen başka diğer iki çalışmada ise semptom skorlarının AR grubuna göre belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle bulgularımız literatürle uyumludur.

5.2.2. Biyokimyasal Ölçümler Üzerindeki Etkilerin Tartışılması

5.2.2.1. Serum ovalbumin spesifik IgE ölçümü

Serum ovalbumin spesifik IgE düzeyi, SF ve melatonin verilen grupta birinci duyarlılaştırma fazı sonunda bazal değerlere göre belirgin olarak arttı. Etanol grubunda ise bu artış birinci duyarlılaştırma fazı sonunda değil ikinci duyarlılaştırma fazı sonunda

ortaya çıktı. Bu gruplarda birinci ve ikinci duyarlılık fazlarındaki ölçüm değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmaması ve her üç grupta da AR modeli ile serum IgE değerlerinin arttığı dikkati çekmektedir (Tablo 9). Serum ovalbumin spesifik IgE değerleri bazal ölçümde tüm gruplarda benzer bulunurken, 1. duyarlılaştırma fazı sonunda SF ve melatonin verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak belirgin şekilde artmıştır. Etanol grubunda da kontrol grubuna göre artış olduğu gözlenirse de post-hoc analizde anlamlılık çıkmamıştır. Öte yandan ikinci duyarlılaştırma fazı sonundaki ölçümlerde etanol verilen grupta IgE değerlerinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu izlenmektedir. SF verilen grupta da artmış IgE değerlerini ikinci duyarlılık fazı sonundaki ölçümde de korunmuştur. Melatonin verilen grubun IgE değerleri ise ikinci duyarlılık sonunda düşmüş ve kontrol değerlerle benzer hale gelmiştir (Tablo 10). Bu bulgular ovalbuminle indüklenen deneysel sıçan AR modelimizin başarısını desteklemektedir. Bununla birlikte, her ne kadar melatonin grubunun IgE değerleri ikinci duyarlılaştırma fazı sonundaki ölçümlerde düşük saptansa ve kontrol grubuna benzer bulunsada post-hoc analizlere göre SF ve Etanol grubundan farklı değildir (Tablo 10). Son yıllarda, IgE aracılı atopik ve alerjik hastalıkların tedavisinde melatoninin kullanıldığı deneysel hayvan modellerine ve insanlarda yapılan klinik araştırmalara sıklıkla rastlanmaktadır. Atopik egzema ve alerjik astımda melatoninin serum total IgE ve IL-4 düzeyini düşürdüğü saptanmıştır (24, 84).

Deneysel AR modellerinde, AR oluştuğunun gösterilebilmesi için en sık başvuru olan yöntem ovalbumin spesifik IgE'nin serumda ELISA ile ölçümüdür (59, 61, 65, 67). IgE ve Th2 sitokinlerinin ELISA yöntemiyle gösterildiği çalışmalarda serum IgE, IL-4, miktarında AR ile anlamlı artış saptanırken, serum IFN gamma düzeyinde azalma (60, 61), nazal sekresyonlarda IL-5 ve IL-13 seviyelerinde artma (64) izlenmiştir. Bu açıdan araştırmamızda sıçan tercih edilmesinin bir diğer nedeni, sıçan AR modellerinde oluşan alerjiye bağlı otoantikorların çoğunlukla insandakine benzer şekilde IgE şeklinde ve hücresel yanıtın Th2 aracılı olması (78, 85, 86) öte yandan farelerde daha farklı immün yanıtlar gözlenebilmesiydi (77, 87, 88). Yine de, FcεR1 reseptörü olmayan farelerde nazal eozinofili olabileceği ve IL-5 eksik farelerde eozinofiller bulunmasa da AR oluşabileceği de hayvan modellerinin insandakinden daha farklı patofizyolojik mekanizmalara sahip olabileceğini akla getirmektedir (86).

AR modeli ve patofizyolojik benzerlikleri açısından düşünüldüğünde bir diğer ilginç durum da deneysel astım modellerinde semptom şiddeti ile IgE titrasyonları ve inflamatuvar hücre veya inflamasyon miktarının birbiriyle uyumsuz olabileceği gerçeğidir (81). Bu durumun benzerine hastalarda da rastlanmaktadır. Klinik olarak mevsimsel veya yıl boyu AR tablosu göstermesine karşın ciltte ve kan testlerinde serumda spesifik IgE yüksekliği saptanamayan idiyopatik rinitli hastalardaki durumun, inflamasyonun sadece burun içinde lokalize kalabileceği iddiasıyla, lokal AR olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (89-91). Bu durum iki şekilde açıklanmaktadır; ilki, B

lenfositlerin IgE üretiminden esas sorumlu hücrelerin dolaşımdaki Th2 lenfositler ve bunlardan salıverilen IL-4 ve IL-13 olduğu düşünülse de, dokuda bulunan mast hücrelerinin T lenfositlerden çok daha fazla oranda IL-4 ve IL-13 salıverdiği (92), ikincisi de, mukozada bulunan B lenfositlerin (plazma hücreleri) de nazal IgE üretmesidir (93, 94). Dolayısıyla, AR ön tanılı hastalarda serumda spesifik IgE yüksekliği görülmemesi AR tanısını dışlamak için yeterli değildir (89). Öte yandan, alerjen maruziyeti sonrası AR semptomu gösteren idiyopatik rinitli ve serum spesifik IgE yüksekliği saptanamayan hastaların % 22-30'unda burun mukozasında spesifik IgE yüksekliği gösterilmiştir (95, 96).

Bazı araştırmacılar serum ovalbumin spesifik IgE titrasyonlarını alerjik hava yolu modellerinde anlamlı şekilde yüksek bulmuş olsa da (61, 68, 69, 71, 72) bunların aslında çoğu alerjik astım modelidir (61, 68, 69). Alerjik astımın AR'den daha ağır bir inflamasyon olması nedeniyle biyokimyasal tablo da belirginleşmiş olabilir. Çünkü sıçanda AR modeli açısından ele alındığında, serum ovalbumin spesifik IgE'de artış saptayan araştırmalar (71, 72) olduğu gibi, herhangi bir değişiklik saptamayan çalışmalar da mevcuttur (57). Nazal inflamatuvar hücrelerde mast hücresi hakimiyeti olmamasının bu duruma olabileceği öne sürülmüştür (57).

Çalışmamızda, etanol verilen sıçanlarda 1. duyarlılaştırma fazı sonundaki serum IgE düzeyi her ne kadar bazal değerlere göre yüksek olsa da istatistiksel analiz sonucunda saptanan fark anlamlı değildir (Tablo 9). Serum IgE değerlerinde istatistiksel anlamlılık yaratacak kadar belirgin bir artış gözlenmemesinin nedeni, bu grupta lokal AR veya mast hücre azlığından kaynaklanabilir. Yine de alerjene maruziyet devam ettikçe serum IgE düzeyinin artarak ikinci duyarlılaştırma sonundaki ölçümde istatistiksel anlamlılığa ulaştığı saptanmıştır (Tablo 9). Bununla birlikte, kesin kanıt elde etmek için IgE düzeylerinin lokal olarak, nazal sekresyonda da ölçülebilir. Bu açıdan nazal sekresyonda IL-4, IL-5 gibi Th2 sitokinlerin ölçümü yapılmıştır (59). Teknik zorluklar nedeniyle biz çalışmamızda lokal IgE düzeyi ölçümü yapmadık.

5.2.2.2. Serum IL-13 ölçümü

DeneySEL AR modelleri genellikle akut modeller olup erken faz yanıtları değerlendirmek için geliştirilmiştir. Değerlendirilen semptomlar genellikle hapşırık ve kaşıntı olup, burun tıkanıklığının dolaylı olarak hava yolu rezistansı ölçümüyle gösterilmesi zor ve pahalıdır (77, 81). DeneySEL modellerde erken faz, histamin aracılı bir yanıt ve genellikle burun kaşıntısı ve hapşırık semptomlarının alerjene maruziyet sonrası 3-10 dakika boyunca sayısal olarak skorlanması ile tanınır ve ölçülür (86). Erken faz yanıtların genellikle IgE ve mast hücre aracılı, geç fazın ve özellikle geç fazda gözlenen artmış hava yolu rezistansının ise eozinofiliden bağımsız ve IL-13 aracılı olduğu düşünülmektedir (82, 86). Bununla birlikte klinik pratikte özel bir durum

olarak lokal AR'de hastaların az bir kısmında (13) ve bazı yayınlarda da %50-70 (97, 98) oranında AR'de geç fazın görülmediği, yalnızca erken fazın ortaya çıktığı belirtilmiştir. Her ne kadar güncel yayınlarla serum IL-13 açısından başarılı sonuçlar sunulmuş olsa da (71, 72) çalışmamızda IL-13 değerlerinde gerek gruplar arası, gerekse grup içi tekrarlanan ölçümlerde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 11). Bu durum modelimizde AR'nin geç fazının oluşmamış olabileceği şeklinde de yorumlanabilir.

5.2.2.3. Melatonin düzeyi ölçümü

Çalışmamızda melatonin, literatürdeki örneklerinde olduğu gibi, birinci duyarlılaştırma fazı sonrasında verilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, gerek melatonin (69) gerekse diğer tedavi ajanları (54, 63) ilk duyarlılaştırma fazından sonra uygulanmaktadır. Normalde, CD4+ T lenfositler, IFN- γ ve IL-2 üreten Th1 ve IL-4, IL-9, IL-10 ve IL-13 üreten ve bu sayede eozinofillerin matürasyonu ve aktivasyonunu sağlayan Th2 lenfositlere dönüşürler. AR'de bu yolak daha çok Th2 artması, Th1 azalması ve IFN- γ seviyesinde düşmeye kayar. Sözü edilen bu sitokinlerin tümü AR'nin ilk duyarlılaşma fazında klinik ve deneysel çalışmalarda ortaya çıkmaktadır (44, 59, 99). Bilindiği gibi IFN- γ başlıca Th1, sitotoksik T, naif CD4+ T ve NK hücrelerden olmak üzere dendritik hücre, makrofaj ve hatta B lenfositlerden bile salıverilmektedir. IFN- γ genini promoter bölgesinde NF-KB gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi vardır. IFN- γ yaklaşık 500 adet geni düzenler. Bunlar arasında antijen sunumu ile ilgili genlerin transkripsiyonunun artırılması, naif CD 4+ T lenfositlerin Th1 hücre yönünde farklılaşması, apoptozun ve B lenfosit yanıtının artması, immünoglobulin ağır zincir yapımının artması (IgG'nin artması ve IgE'nin azalması) ve çeşitli inflamatuvar hücre, sitokin ve adhezyon moleküllerinin düzenlenmesi yer alır (44, 100). IFN- γ yetersizliğinin alerjik hastalıklara zemin hazırladığı ve semptomları şiddetlendirdiği, Th2 sitokinlerin azalarak IFN- γ seviyesinin normale dönmesinin ise alerjinin iyileşmesiyle uyumlu olduğu ve ilginç şekilde çocukluk çağında hücre içi patojenlerle meydana gelen IFN- γ dominansı ile astım insidansı arasında ters orantı bulunduğu belirtilmektedir (101, 102). IFN- γ Th1 yanıtı artırırken Th2 yanıtı baskılar (44), eotaksin reseptör ekspresyonunu azaltarak eozinofil farklılaşmasını engeller ve eozinofilik yanıtı regüle eder (103). IFN- γ aynı zamanda indüklenmiş nitrik oksit (NO) sentaz enzimini indükleyerek NO sentezini artırır böylece de mast hücrelerinin IgE aracılı degranülasyonunu engeller (100, 104).

Alerjik rinitli hastalarda serum melatonin düzeyinin düşük olduğu saptanmıştır (105). Melatonin düzeyinin düşük olması IFN- γ sentezini azaltmakta, bu durum da melatonin sentezini azaltmaktadır (39, 84, 106). IFN- γ stimülasyonunun ise melatonin sentezini artırdığı bilinmektedir (25). Çalışmamızın hipotezinde, melatoninin tedavi mekanizmasının AR'nin birinci duyarlılaşma fazının patogeneğinde gözlenen IFN- γ

düşüklüğünü gidermek olduğu varsayılmıştır. Bu nedenle melatonin 1. duyarlılaşma fazı bitiminde, AR skorlaması ile AR tanısı konulan hayvanlara uygulanmıştır.

Ekzojen melatoninin endojen melatonin miktarını artırabileceği de (29) azaltılabileceği de, ama endojen melatoninin azaltıcı etkinin olası bir doku hasarlanması sırasında görüldüğü (38) bildirilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı olduğu için çalışmamızdan elde edilen bulgularla tam bir kıyaslama yapılamamaktadır. Çalışmamızda her ne kadar gruplar arası veya grup içi tekrarlanan ölçümlerde serum melatonin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiş olsa da (Tablo 12), melatonin verilen grupta serum melatonin düzeylerinin sayısal olarak diğer tüm gruplara göre azalmış olduğu dikkati çekmektedir (Tablo 12).

Alerjik hastalıklarda, CD4+ T lenfositler daha çok Th2 lenfositlere dönüşme eğilimindedir ve IFN- γ seviyesinde düşme gözlenir. Atopik egzemalı hastalarda melatonin sentezini artırdığı bilinen IFN- γ seviyelerinde düşme gözlenmiştir. Bu hastalarda serum melatonin düzeyi de düşük bulunmuştur. Melatonin düzeyinin düşük olması IFN- γ sentezini azaltmakta, bu durum da melatonin sentezini azaltmaktadır. AR'li hastaların tükrük melatonin düzeyi ölçümlerinin sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, AR'de melatoninin gerek bazal gerekse pik düzeylerinin kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük olduğu ve sirkadian ritm paterninin bozulduğu görülmüştür (105). Aynı metodolojinin Th2 aracılı bir diğer rinolojik hastalık olan nazal polipoziste kullanıldığı bir çalışmada ise hem bazal hem de pik düzeylerinin kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük olduğu ve sirkadian ritm paterninin bozulduğu saptanmıştır (107).

5.2.3. Histolojik incelemeler üzerindeki etkinin tartışılması

Histolojik inceleme bulgularına göre, ikinci duyarlılık fazı sonunda etanol ve serum fizyolojik verilen gruplarda tüm inflamasyon parametrelerinde hem kontrol hem de melatonin grubuna göre belirgin yüksek skorlar izlenmiş, melatonin grubunun histolojik skorları ise beklendiği gibi kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Bu durum, birinci duyarlılaştırma fazından hemen sonra ve alerjenle ikincil temastan hemen önce verilmiş olan melatoninin 15 günlük süreçte inflamasyonu başarılı bir şekilde baskıladığının kanıtlarından biridir melatoninin AR tedavisindeki etkililiğini desteklemektedir (Tablo 13). Daha önce melatoninle gerçekleştirilen bir deneysel AR modeli, nazal histolojinin çalışıldığı bir araştırma ya da klinik bir çalışma olmadığı için bu konuda da ek bir yorum yapılamamaktadır.

Son yıllarda, IgE aracılı atopik ve alerjik hastalıkların tedavisinde melatoninin kullanıldığı deneysel hayvan modellerine ve insanlarda yapılan klinik araştırmalara sıklıkla rastlanmaktadır. Bulgularımızın aksine, atopik egzema ve alerjik astımda melatoninin serum total IgE ve IL-4 düzeyini düşürdüğü saptanmıştır (24, 84).

Melatoninin antiinflamatuvar etkileri nedeniyle atopik dermatit tedavisinde de yararlı olabileceği belirtilmektedir (84, 106). Melatoninin tedavide etkili olmasının ön görüldüğü diğer atopik hastalık alerjik astımdır (68, 69, 108). Alerjik astımın alevlenme dönemlerinde, ya da orta ve şiddetli hastalık grubunda, hem bazal melatonin düzeyi hem de melatonin pik düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu ve semptomların şiddetiyle melatonin düzeyindeki azalmanın uyumlu olduğu gösterilmiştir (108). Ayrıca astımın alevlenmesinde serum melatonin düzeylerinin, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerle birlikte azaldığı gözlenmiştir (109). Melatoninin çeşitli inflamatuvar sitokinlerin salınımını ve inflamatuvar hücrelerin davranışını modüle ederek alerjik astımda semptomları iyileştirdiği belirtilmiştir (110). Bunlara ilaveten, immünoterapi almakta olan bireylerde serum melatonin düzeylerinin daha düşük olduğunun bulunması da, melatoninin immünostimülan etkilerinin immünoterapi ile ortadan kaldırılabilceği şeklinde yorumlanmaktadır (111). Melatoninin antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinin (112) yanı sıra transkripsiyon üzerine olan etkileri ile mukus sekresyonunu engellemesi de alerjik astımın deneysel modellerinde saptanan tedavi edici etki mekanizmaları arasındadır (70). Ayrıca melatoninin, Th 2 hücrelerin yapımının indüklediği bazı matriks metalloproteinazları (MMP 9) inhibe etmesinin de alerjik astımdaki antiinflamatuvar etkiye katkıda bulunduğu bilinmektedir (69). AR'li hastaların tükürük melatonin düzeyi ölçümlerinin sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, AR'de melatoninin gerek bazal gerekse pik düzeylerinin kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük olduğu ve sirkadian ritm paterninin bozulduğu görülmüştür (105). Aynı metodolojinin Th2 aracılı bir diğer rinolojik hastalık olan nazal polipoziste kullanıldığı bir çalışmada ise hem bazal hem de pik düzeylerinin kontrol olgularına göre anlamlı derecede düşük olduğu ve sirkadian ritm paterninin bozulduğu saptanmıştır (107).

Bunun dışında, genetik melatonin reseptör varyantlarının kalıtsal olarak AR ve astım birlikteliğine neden olabileceği açıklanmıştır (113). AR'li hastaların ve farelerin burun mukozalarında artmış melanokortin reseptörü (melatonin stimüle edici hormonun bağlandığı reseptör) içeren bazofil birikimi izlenmiştir (114). Atopik dermatit ve uyku bozukluğu olan çocuklarda 4 hafta boyunca 3mg/g oral melatoninin plaseboya göre atopik dermatit şiddetini belirgin şekilde azalttığı rapor edilmiştir (115).

AR fizyopatolojisinin alerjik astım ve alerjik dermatitinkine benzer olması nedeniyle, melatoninin AR tedavisinde de etkili bir ilaç olabileceği düşünülmektedir. AR'de sirkadiyen ritm ve tükürük melatonin düzeylerinin araştırıldığı ve normal popülasyona göre bu hasta grubunda melatonin düzeylerinin düşük olduğunu gösteren bir klinik

Çalışma dışında (105) herhangi bir deneysel veya klinik araştırmaya rastlanmamıştır. Melatoninin antioksidan ve diğerk immünolojik etkileri de deneysel sıçan AR modelimizde gözlenen terapötik etkide payı olabilir.  rneğink çekirdek reseptörleri aracılığıyla da mast hücrelerine etki edebileceği bilinmektedir. Normalde mast hücre sitoplazmasında inhibitör bir molekülle (I-kB) bağlı olan transkripsiyon faktörü NF-kB; mast hücreleri stimüle olunca I-kB fosforile ve değrede olmasıyla aktive olur. İnflamasyon sırasında NF-kB inflamatuvar hücrelerden endojen melatonin (MEL-n) sentezini arilalkiamin –asetiltransferaz enzimini muhtemelen bu enzimi kodlayan genin promotor ve intron bölgelerinde NF elemanları bulunduğu için uyararak indükler ve endojen artmış melatonin de mast hücrelerini regüle eder (116, 117). Ekzojen verilen melatonin, uyarılmamış mast hücreleri varlığında endojen melatonin seviye üzerine herhangi bir etki göstermezken, uyarılmış mast hücreleri varlığında, NF-KB'yi inhibe ederek doza bağlı şekilde endojen melatonin seviyesini azaltır. Bu etkinin abartılmış inflamatuvar cevabı baskılamaya da yarayacağı  n görülmektedir (38). Bunun dışında melatonin, monosit ve makrofajlardaki reseptörler üzerinden GMCSF ve makrofaj üretimini de artırır (118).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızın amacı, melatoninin AR tedavisinde etkili olup olmadığının araştırılmasıydı.
- Elde ettiğimiz bulgulara göre melatonin verilen grupta nazal semptom skorlarının ve serum ovalbumin spesifik Ig-E değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve histolojik skoların kontrol grubuyla benzer olduğu gösterilerek melatoninin ovalbumin ile oluşturulmuş sıçan AR modelinde etkili olduğu kanıtlandı.
- Bununla birlikte çalışmamız literatürde konu ile ilgili yapılan ilk araştırmadır. Gerek antiinflamatuvar, antioksidan ve immünolojik etkilerini kanıtlayacak diğer biyokimyasal parametrelerin ölçüleceği deneysel çalışmalar gerekse klinik çalışmalarla sonuçlarımızın desteklenmesi gerekmektedir. Bu koşulların sağlanmasıyla melatonin AR tedavisinde umut vadeden bir ilaç olarak klinik uygulamalarda kullanılabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, Michel FB. Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;110:207-18.
2. Broide DH. Allergic rhinitis: Pathophysiology. *Allergy Asthma Proc*. 2010;31:370-4.
3. Seidman MD, Gurgel RK, Lin SY, Schwartz SR, et al. Clinical practice guideline: Allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152:S1-43.
4. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8-160.
5. Jahnsen FL, Gran E, Haye R, Brandtzaeg P. Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:31-7.
6. Matsushita K, Kato Y, Akasaki S, Yoshimoto T. Proallergic cytokines and group 2 innate lymphoid cells in allergic nasal diseases. *Allergol Int*. 2015;64:235-40.
7. Min Y-G. The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010;2:65-76.
8. Pawankar R, Mori S, Ozu C, Kimura S. Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy*. 2011;1:157-67.
9. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:984-1010.
10. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med*. 2012;106:9-14.
11. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2016;6:620-.
12. Feng H, Yang Y, Zhou H, Bai S. [To study of the nasal mucosa remodeling of allergic rhinitis patients]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2012;26:205-8.
13. Scadding G. Cytokine profiles in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14:435.
14. Saad K, Zahran AM, Elsayh KI, Abdelmoghny A, et al. Variation of regulatory T lymphocytes in the peripheral blood of children with allergic rhinitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66:307-13.
15. Okano M. Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol*. 2009;158:164-73.
16. Ricketti PA, Alandijani S, Lin CH, Casale TB. Investigational new drugs for allergic rhinitis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017;26:279-92.
17. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:621-31.
18. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European

Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:1288-96.e3.

19. Durham SR, Creticos PS, Nelson HS, Li Z, et al. Treatment effect of sublingual immunotherapy tablets and pharmacotherapies for seasonal and perennial allergic rhinitis: Pooled analyses. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:1081-8.e4.

20. Devillier P, Dreyfus JF, Demoly P, Calderon MA. A meta-analysis of sublingual allergen immunotherapy and pharmacotherapy in pollen-induced seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *BMC Med.* 2014;12:71.

21. Castillo J, Dimov V. Investigational drugs for the treatment of allergic rhinitis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23:823-36.

22. Foster PS, Martinez-Moczygemba M, Huston DP, Corry DB. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol Ther.* 2002;94:253-64.

23. Haldar C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *J Photochem Photobiol B.* 2010;98:107-17.

24. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Salpietro C, et al. Melatonin and atopy: Role in atopic dermatitis and asthma. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13482-93.

25. Finocchiaro LM, Nahmod V, Launay J. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J.* 1991;280:727-31.

26. Şener G. Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010;14:112-20.

27. Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* 2001;30:243-7.

28. Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J Pineal Res.* 1997;22:45-51.

29. Farhadi N, Gharghani M, Farhadi Z. Effects of long-term light, darkness and oral administration of melatonin on serum levels of melatonin. *Biomed J.* 2016;39:81-4.

30. Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 2000;29:129-37.

31. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res.* 2006;66:9789-93.

32. Waly NE, Hallworth R. Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Circadian Rhythms.* 2015;13:1-.

33. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, et al. MT1 and MT2 melatonin receptors: A therapeutic perspective. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:361-83.

34. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* 1994;24:101-46.

35. Dubocovich ML. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med.* 2007;8:34-42.

36. Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos J, Calvo J, et al. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *The FASEB journal*. 1997;11:466-73.
37. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrè P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*. 2008;154:1182-95.
38. Maldonado MD, Moreno-Garcia H, Gonzalez-Yanes C, Calvo JR. Possible involvement of the inhibition of NF-k β factor in anti-inflammatory actions that melatonin exerts on mast cells. *J Cell Biochem*. 2016;117: 1926-33.
39. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci*. 1999;65:2143-50.
40. Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi-Perumal SR, et al. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15:93-101.
41. Szczepanik M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58:115-24.
42. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal*. 2004;18:537-9.
43. Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*. 1993;14:1-10.
44. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100 Suppl 1:137-44.
45. Maestroni GJ, Conti A. Melatonin and the immune-hematopoietic system therapeutic and adverse pharmacological correlates. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3:325-32.
46. Ozben T, Hanikoglu A, Kucuksayan E, Akduman R. Effects of melatonin in cancer: Potential Mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18:985-92 .
47. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009;44:175-200.
48. Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*. 2010;278:55-67.
49. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *J Biomed Sci*. 2000;7:444-58.
50. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016;61:253-78.
51. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, et al. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*. 1994;55:PI271-6.
52. Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett*. 1997;230:147-50.

53. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, et al. Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuroparmacol*. 2017;15:434-43.
54. Avincsal MO, Ozbal S, Ikiz AO, Pekcetin C, et al. Effects of topical intranasal doxycycline treatment in the rat allergic rhinitis model. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2014;7:106.
55. Chand N, Pillar J, Diamantis W, Sofia RD. Inhibition of IgE-mediated allergic histamine release from rat peritoneal mast cells by azelastine and selected antiallergic drugs. *Agents Actions*. 1985;16:318-22.
56. El-Naggar MM, Ukai K, Takeuchi K, Sakakura Y. Expression of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-5 mRNA in the nasal mucosal membrane of rats with allergic rhinitis. *Scand J Immunol*. 1998;47:554-60.
57. El-Naggar MM, Ukai K, Takeuchi K, Sakakura Y. Effect of allergen-specific immunotherapy on interleukin-4, interleukin-5 and interferon-gamma mRNA expression in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *Scand J Immunol*. 1998;48:629-34.
58. Fu LJ, Dai Y, Wang ZT, Zhang M. Inhibition of experimental allergic rhinitis by the n-butanol fraction from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis*. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:974-7.
59. Haczku A, Macary P, Haddad EB, Huang TJ, et al. Expression of Th-2 cytokines interleukin-4 and -5 and of Th-1 cytokine interferon-gamma in ovalbumin-exposed sensitized Brown-Norway rats. *Immunology*. 1996;88:247-51.
60. Li YX, Chen D, Li TY, Feng LQ, et al. Effect of garlicin on the serum levels of interleukin 4 and interferon gamma in allergic rhinitis model in rats. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008;43:447-50.
61. Underwood SL, Kemeny DM, Lee TH, Raeburn D, et al. IgE production, antigen-induced airway inflammation and airway hyperreactivity in the brown Norway rat: the effects of ricin. *Immunology*. 1995;85:256-61.
62. Wang W, Zheng M. Mucin 5 subtype AC expression and upregulation in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;147:1012-9.
63. Wen W-D, Yuan F, Wang J-L, Hou Y-P. Botulinum toxin therapy in the ovalbumin-sensitized rat. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14:78-83.
64. Xu YY, Liu X, Dai LB, Zhou SH. Effect of Tong Qiao drops on the expression of eotaxin, IL-13 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *J Chin Med Assoc*. 2012;75:524-9.
65. Aoishi K, Takahashi H, Hato N, Gyo K, et al. Treatment of allergic rhinitis with intranasal infusion of botulinum toxin type A in mice. *Life Sci*. 2016;147:132-6.
66. Tamura T. Investigation of the antiallergic activity of olopatadine on rhinitis induced by intranasal instillation of antigen in sensitized rats using thermography. *Asia Pac Allergy*. 2011;1:138-44.
67. Kar M, Bayar Muluk N, Bafaqeeh SA, Cingi C. Consensus on the methodology for experimental studies in allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019;121:68-71.
68. Martins E, Jr., Ligeiro de Oliveira AP, Fialho de Araujo AM, Tavares de Lima W, et al. Melatonin modulates allergic lung inflammation. *J Pineal Res*. 2001;31:363-9.

69. Shin IS, Park JW, Shin NR, Jeon CM, et al. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology*. 2014;219:901-8.
70. Shin IS, Park JW, Shin NR, Jeon CM, et al. Melatonin inhibits MUC5AC production via suppression of MAPK signaling in human airway epithelial cells. *J Pineal Res*. 2014;56:398-407.
71. Sakat MS, Kilic K, Kandemir FM, Yildirim S, et al. The ameliorative effect of berberine and coenzyme Q10 in an ovalbumin-induced allergic rhinitis model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018;275:2495-505.
72. Kilic K, Sakat MS, Yildirim S, Kandemir FM, et al. The amendatory effect of hesperidin and thymol in allergic rhinitis: an ovalbumin-induced rat model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276:407-15.
73. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Majima Y. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:119-25.
74. Shimizu T, Hirano H, Majima Y, Sakakura Y. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats. A comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1648-54.
75. Guibas GV, Lakis S, Gkimpas C, Manda M, et al. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66:469-75.
76. Ercan I, Cakir BO, Basak T, Ozbal EA, et al. Effects of topical application of methotrexate on nasal mucosa in rats: a preclinical assessment study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134:751-5.
77. Wagner JG, Harkema JR. Rodent models of allergic rhinitis: relevance to human pathophysiology. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7:134-40.
78. Szelenyi I, Marx D, Jahn W. Animal models of allergic rhinitis. *Arzneimittelforschung*. 2000;50:1037-42.
79. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L833-9.
80. Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA. Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat*. 1982;135:83-8.
81. Pauluhn J, Mohr U. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Exp Toxicol Pathol*. 2005;56:203-34.
82. McCusker CT. Use of mouse models of allergic rhinitis to study the upper and lower airway link. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:11-6.
83. Sagit M, Polat H, Gorgen SG, Berk E, et al. Effectiveness of quercetin in an experimental rat model of allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274:3087-95.
84. Chang YS, Chou YT, Lee JH, Lee PL, et al. Atopic dermatitis, melatonin, and sleep disturbance. *Pediatrics*. 2014;134:e397-405.
85. Rhee C-S. Allergic Rhinitis Model. *Korean Academy of Pediatric Allergy & Respiratory Disease - Korean Academy of Asthma, Allergy, and Clinical Immunology*

KAPARD-KAAACI and West Pacific Allergy Symposium Joint International Congress 2013 May 10-11. 2013;127-33.

86. Takeda K, Gelfand EW. Mouse models of allergic diseases. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:660-5.

87. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*. 2004;305:1776-9.

88. Singer M, Lefort J, Vargaftig BB. Granulocyte depletion and dexamethasone differentially modulate airways hyperreactivity, inflammation, mucus accumulation, and secretion induced by rml-13 or antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:74-84.

89. James LK, Durham SR. Rhinitis with negative skin tests and absent serum allergen-specific IgE: More evidence for local IgE? *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1012-3.

90. Alvares ML, Khan DA. Allergic rhinitis with negative skin tests. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11:107-14.

91. Rondon C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, et al. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1460-7.

92. Pawankar R, Yamagishi S, Yagi T. Revisiting the roles of mast cells in allergic rhinitis and its relation to local IgE synthesis. *Am J Rhinol*. 2000;14:309-17.

93. Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2:231-8.

94. Fokkens WJ, Vinke JG, KleinJan A. Local IgE production in the nasal mucosa: a review. *Am J Rhinol*. 2000;14:299-303.

95. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, et al. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. *Allergy*. 2004;59:204-12.

96. Rondon C, Romero JJ, Lopez S, Antunez C, et al. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:899-905.

97. deShazo R, Kemp SF. Pathogenesis of allergic rhinitis (rhinosinusitis). UpToDate [database on the internet] Waltham (MA): UpToDate. 2014.

98. Rondon C, Fernandez J, Lopez S, Campo P, et al. Nasal inflammatory mediators and specific IgE production after nasal challenge with grass pollen in local allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1005-11.e1.

99. Liao SY, Liao TN, Chiang BL, Huang MS, et al. Decreased production of IFN gamma and increased production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk of allergy. *Clin Exp Allergy*. 1996;26:397-405.

100. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.

101. Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, et al. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:450-6.

102. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. 1997;275:77-9.

103. Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, Muntel EE, et al. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-gamma (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1987-92.
104. Eastmond NC, Banks EM, Coleman JW. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *J Immunol*. 1997;159:1444-50.
105. Fidan V, Alp HH, Gozeler M, Karaaslan O, et al. Variance of melatonin and cortisol rhythm in patients with allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol*. 2013;34:416-9.
106. Kim TH, Jung JA, Kim GD, Jang AH, et al. Melatonin inhibits the development of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Pineal Res*. 2009;47:324-9.
107. Fidan V, Alp HH, Kalkandelen S, Cingi C. Melatonin and cortisol rhythm in patients with extensive nasal polyposis. *Am J Otolaryngol*. 2013;34:61-4.
108. Fei GH, Liu RY, Zhang ZH, Zhou JN. Alterations in circadian rhythms of melatonin and cortisol in patients with bronchial asthma. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25:651-6.
109. Gumral N, Naziroglu M, Ongel K, Beydilli ED, et al. Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cell Biochem Funct*. 2009;27:276-83.
110. Sutherland ER, Martin RJ, Ellison MC, Kraft M. Immunomodulatory effects of melatonin in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1055-61.
111. Giron-Caro F, Munoz-Hoyos A, Ruiz-Cosano C, Bonillo-Perales A, et al. Melatonin and beta-endorphin changes in children sensitized to olive and grass pollen after treatment with specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:91-6.
112. Lu T, Galijasevic S, Abdulhamid I, Abu-Soud HM. Analysis of the mechanism by which melatonin inhibits human eosinophil peroxidase. *Br J Pharmacol*. 2008;154:1308-17.
113. Sarnowski C, Laprise C, Malerba G, Moffatt MF, et al. DNA methylation within melatonin receptor 1A (MTNR1A) mediates paternally transmitted genetic variant effect on asthma plus rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:748-53.
114. Kleiner S, Braunstahl GJ, Rudrich U, Gehring M, et al. Regulation of melanocortin 1 receptor in allergic rhinitis in vitro and in vivo. *Clin Exp Allergy*. 2016;46:1066-74.
115. Chang YS, Lin MH, Lee JH, Lee PL, et al. Melatonin Supplementation for Children With Atopic Dermatitis and Sleep Disturbance: A Randomized Clinical Trial. *JAMA pediatrics*. 2016;170:35-42.
116. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14:10979-97.
117. Hu ZP, Fang XL, Fang N, Wang XB, et al. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF-kappaB system in high-fat-fed rabbits. *J Pineal Res*. 2013;55:388-98.
118. Maestroni GJ, Covacci V, Conti A. Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res*. 1994;54:2429-32.

8. EKLER

8.1. Etik kurul raporları

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

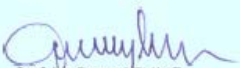
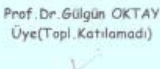
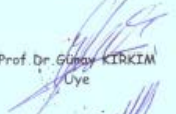
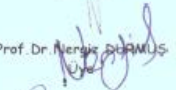
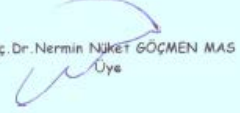
35340 İncuath İsmr-732 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/12/2017
Toplantı Tarihi : 13 Haziran 2017

Sayın, Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

51/2016 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Melatoninin Alerjik Rinit Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli; Aslı Çakır, Mukaddes Gümüştekin, Mustafa Çenk Ecevit, Aslı Çelik, Çetin Pekçetin, Seda Özbalın araştırmacı olduğu 24 adet Wistar sıçanın talep edildiği projede; gönderilen belgeler incelenerek, talep edilen 3(üç) adet hayvanın verilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof. Dr. Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
 Prof. Dr. Safiye AKTAŞ Üye	 Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN Üye
 Prof. Dr. Gülgün OKTAY Üye (Topl. Katılmadı)	 Prof. Dr. Güney KIRKIM Üye
 Prof. Dr. Türkan ERTAY Üye	 Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Danışman
 Prof. Dr. Nermin ŞAHMUS Üye	 Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye
 Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN Üye	 Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMCİ Üye (Topl. Katılmadı)
 Zehra KINAM Üye	 Vet. Hekim Adnan SERPEN Üye

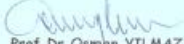
NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/18/2016
Toplantı Tarihi : 04 Ekim 2016

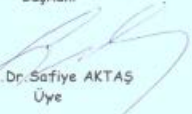
35340. İnciraltı, İzmir-232 4122234

Sayın, Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

51/2016 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Melatoninin Alerjik Rinit Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli; Aslı Çakır, Mukaddes Gümüştekin, Mustafa Cenk Ecevit, Aslı Çelik, Çetin Pekçetin, Seda Özbal'ın araştırmacı olduğu 24 adet Wistar sıçanın talep edildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

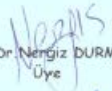

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

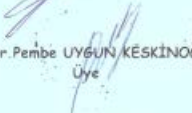

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl. Katılmadı)

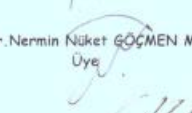

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye


Prof. Dr. Günay KIRKIM
Üye


Doç. Dr. Nergiz DURMUŞ
Üye

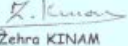

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye


Doç. Dr. Türkan ERTAY
Üye


Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Topl. Katılmadı)


Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMCI
Üye


Zehra KINAM
Üye


Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

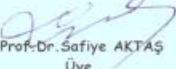
Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/24/2016
Toplantı Tarihi : 27 Aralık 2016

Sayın, Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

51/2016 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Melatoninin Alerjik Rinit Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli; Aslı Çakır, Mukaddes Gümüştekin, Mustafa Cenk Ecevit, Aslı Çelik, Çetin Pekçetin, Seda Özbalın araştırmacı olduğu 24 adet Wistar sıçanın verildiği projede; gönderilen belgeler incelenerek, Pelin Koca ve Hande Efe'nin projeye araştırmacı olarak dahil edilmesi ve Aslı Çelik'in projeden ayrılması uygun bulunmuştur.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye


Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye (Topl. Katılmadı)

Prof. Dr. Günay KIRKIM
Üye

Doç. Dr. Nergiz DÜRMÜŞ
Üye

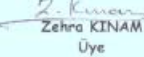
Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç. Dr. Türkan ERTAY
Üye

Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Yard. Doç. Dr. Orhan KALEMCI
Üye


Zehra KINAM
Üye

Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin proje başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2. ARBİS formatında özgeçmiş ve yayın listesi



ASLI ÇAKIR ÇETİN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi: 12/08/1984
İletişim Adresi: ONUR MAHALLESİ ÇİMEN SOKAK HANE APT NO:25 DAİRE:3 BALÇOVA İZMİR
Telefon: (232) 412 32 62
(505) 59 1 13 97
E-posta: aslicakir84@hotmail.com
Web Adresi:

Öğrenim Bilgileri

03 Mart 2015 - Şu Anda (5 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FARMAKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -

07 Ekim 2011 - 02 Ağustos 2016 (4 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FARMAKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.96 / 4.0

01 Kasım 2007 - 01 Kasım 2012 (5 yıl 1 ay)
Tıpta Uzmanlık, Anadal/Normal Öğretim, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
Tez Başlığı: 319129 Farelerde akustik travma ile oluşturulmuş tinnitus modelinde uzun süreli güçlenme aracı sinaptik plastisite sürecinin incelenmesi
Tez Konusu: Farelerde akustik travma ile oluşturulmuş tinnitus modelinde uzun süreli güçlenme aracı sinaptik plastisite sürecinin incelenmesi
Tarih: 2012
Tez Danışmanı: MUSTAFA CENK ECEVİT

13 Eylül 2001 - 29 Haziran 2007 (5 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, TIP PR.
Diploma Numarası: 07-311-201
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.13 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

12 Aralık 2007 - Şu Anda (12 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ CERRAHİ
TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ KULAK BURUN VE BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

09 Nisan 2015 - Şu Anda (5 yıl 2 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ CERRAHİ TIP
BİLİMLERİ BÖLÜMÜ KULAK BURUN VE BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

Sayfa 1 / 4

Oluşturma Zamanı: 02. Haziran 2020 14:38:02

A. ÇAKIR ÇETİN, M. C. ECEVİT, R. BAL, S. GÜRKAN, H. C. ALPAY & M. B. ŞERBETÇİOĞLU, Assessment of Synaptic Plasticity via Long-Term Potentiation in Young Mice on the Day after Acoustic Trauma: Implications for Tinnitus, *The Journal of International Advanced Otolaryngology*, 2016, 13087649, 11, 3, 196-201.

A. ÇAKIR ÇETİN & S. SÜTAY, Endoscopic Transpterygoid Approach for Sternberg's Canal CSF Rhinorrhea, *Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base*, 2016, 2193-6331, 77, 5 02.

Y. OLGUN, H. ÖZAY, A. ÇAKIR ÇETİN & T. K. ERDAĞ, Larangomalozi Klinik Deneyimimiz, *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 2016, 0000-0000.

A. ÇAKIR ÇETİN & E. A. GÜNERİ, Our Experience in the Management of CSF Otorrhea in Two Cases: A Transmastoid Approach with Middle Ear Cavity Obliteration and a Middle Cranial Fossa Approach, *Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base*, 2016, 2193-6331, 77, 5 02.

E. A. GÜNERİ, A. ÇAKIR ÇETİN & B. MUTLU, Validity and Reliability of the Diagnostic Tests for Ménière's Disease: Ménière Hastalığı Tanısında Kullanılan Testlerin Güvenilirlik ve Geçerliliği, *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 2016, 0000-0000.

Bildiriler

A. ÇAKIR ÇETİN, Y. TUNÇOK, M. C. ECEVİT, M. GÜMÜŞTEKİN, Ç. PEKÇETİN & S. ÖZBAL, Melatoninin Allerjik Rinit Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Sözlü Sunum, 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 08 Kasım 2017, 12 Kasım 2017.

A. ÇAKIR ÇETİN & E. A. GÜNERİ, A Novel Two Step Surgical Technique For BAHÁ Conversion Surgery, Sözlü Sunum, 11th Asia Pacific Symposium Of Cochlear Implant And Related Sciences (APSCI 2017), 19 Eylül 2017, 22 Eylül 2017.

Y. OLGUN, S. MÜNGAN DURANKAYA, B. TUNÇBİLEK, A. ÇAKIR ÇETİN, G. ÜNAL, G. KIRKIM, T. K. ERDAĞ & E. A. GÜNERİ, Effects of Bone Anchored Hearing Aids on Life Quality, Poster Sunumu, APSCI 2017, 19 Eylül 2017, 22 Eylül 2017.

A. ÇAKIR ÇETİN & E. A. GÜNERİ, Endoscopic Ossiculoplasty: Our Preliminary Results, Sözlü Sunum, 11th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences (APSCI 2017), 19 Eylül 2017, 22 Eylül 2017.

A. ÇAKIR ÇETİN, S. MÜNGAN DURANKAYA & E. A. GÜNERİ, Postoperative vestibular functions of cochlear implant patients and the value of VEMP to predict the protection of residual hearing, Sözlü Sunum, 11th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences, 19 Eylül 2017, 22 Eylül 2017.

A. ÇAKIR ÇETİN, Y. OLGUN, E. UĞURLU, E. ÖZER & T. K. ERDAĞ, Yanıboğazda dev temporoparietal bölge kistik kitlesi, Poster Sunumu, 39. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 08 Kasım 2017, 12 Ağustos 2017.

A. ÇAKIR ÇETİN, C. BORAN & T. K. ERDAĞ, Kulak burun boğaz uzmanlık tezleri yayına dönüyor mu, Sözlü Sunum, 38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, 26 Ekim 2016, 30 Ekim 2016.

A. ÇAKIR ÇETİN, E. DOĞAN, H. ÖZAY, Ö. KÜMÜŞ, T. K. ERDAĞ & A. Ö. İKİZ, Oral kavite karsinomlarında submandibular gland tutulumu ve gland koruyucu boyun diseksiyonunun uygulanabilirliği, Poster Sunumu, 38. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, 26 Ekim 2016, 30 Ekim 2016.

A. ÇAKIR ÇETİN, Y. OLGUN, A. ÖZSES & T. K. ERDAĞ, Çocukluk çağı derin boyun enfeksiyonlarında medikal tedavinin yeri, Sözlü Sunum, 38. Ulusal Türk Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, 26 Ekim 2016, 26 Ekim 2016.

B. KIRMIZIGÜL, A. ÇAKIR ÇETİN, E. DOĞAN & T. K. ERDAĞ, Geriatrik Tonsillektomi Klinik Deneyimimiz, Poster Sunumu, İstanbul KBBBCCUzmanları Derneği 8. Kongresi, Sepanca, 22 Eylül 2016, 25 Eylül 2016.

B. KIRMIZIGÜL, Y. OLGUN, A. ÇAKIR ÇETİN & T. K. ERDAĞ, OUR ADENOTONSILLECTOMY EXPERIENCE IN CHILDREN UNDER 3 YEARS OF AGE, Poster Sunumu, ESPD2016 - 13th Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology, Portakiz, Haziran 2016, 18 Haziran 2016, 21 Haziran 2016.

A. ÇAKIR ÇETİN & S. SÜTAY, Endoscopic Transpterygoid Approach for Sternberg's Canal CSF Rhinorrhea, Sözlü Sunum, 12th Congress of the European Skull Base Society, Almanya, 26 Mayıs 2016, 28 Mayıs 2016.

A. ÇAKIR ÇETİN & E. A. GÜNERİ, Our experience in the management of CSF otorrhea in two cases: A transmastoid approach with middle ear cavity obliteration and a middle cranial fossa approach, Sözlü Sunum, 12th Congress of the European Skull Base Society, Almanya, Ağustos 2016, 26 Mayıs 2016, 28 Mayıs 2016.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

Z165871, Nazal Polipozisli Kronik Rinosinüzitin Medikal Ve Cerrahi Sonrası İzama Tedavisinde Düşük Dozda Oral Metotratsat Veya Düşük Dozda Oral Metilprednizolon Tedavisinin Standart Tedaviyle Karşılaştırılması: Randomize, Kontrollü, Üç Kollu, Paralel, Açık Etiketli, Faz 2 Klinik Araştırma, 3001 - Başlangıç AR-GE, Yürütücü, Sonuç raporu kabul, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Aynılma Tarihleri: 01.09.2017 - 01.09.2019, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.09.2017 - 01.09.2019.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

8.3. Makale örneği ve dergiden alınmış kabul yazısı

8.3.1. Makale kabul yazısı

18/12/2019

Dear ASLI ÇAKIR ÇETİN,

I am pleased to inform you that your manuscript entitled as "Melatonin and Allergic Rhinitis" has been accepted for publication in an upcoming issue of Journal of Basic and Clinical Health Sciences . We will send the proof of your article for your approval prior to publication. You can reach the final information about your manuscript at online manuscript center (jbachs.net).

Please do not hesitate to contact us at any time if you have questions regarding your manuscript or the publication process by sending an e-mail to info@jbachs.net

We look forward to publishing your paper.

Sincerely,

Journal of Basic and Clinical Health Sciences

Editorial Board

info@jbachs.net

Review

Melatonin and Allergic Rhinitis

Aslı Çakır Çetin¹, Yeşim Tunçok², Mustafa Cenk Ecevit¹

¹Dokuz Eylül University Medical School, Otorhinolaryngology, İzmir, Turkey

²Dokuz Eylül University Medical School, Pharmacology, İzmir, Turkey

Address for Correspondence: Aslı Çakır Çetin, E-mail: adilcaktur84@hotmail.com

Received: 29.10.2019; Accepted: 18.12.2019; Available Online Date: 27.01.2020

©Copyright 2019 by Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences - Available online at www.jbachs.org

Cite this article as: Çakır Çetin A, Tunçok Y, Ecevit MC. Melatonin and Allergic Rhinitis. J Basic Clin Health Sci 2020; 1:1-6.

ABSTRACT

Atopy is a tendency to produce Ig-E antibodies in response to allergens and to develop allergic clinical symptoms such as allergic rhinitis, allergic bronchial asthma, and atopic dermatitis. Among them, allergic rhinitis (AR) is a chronic inflammatory disease of the intranasal mucosa, characterized by nasal symptoms reducing the quality of life. Management of AR maintains entirely symptomatic and is intended only to relieve the undesirable effects of mediators resulting from the allergic inflammatory reaction. The only disease-modifying treatment is immunotherapy, which can eliminate the pathophysiology of the disease. However, it is a long-lasting modality with several limitations and contraindications. In recent years, melatonin has been evaluated in various allergic inflammatory disorders due to its anti-inflammatory and antioxidant properties and has been suggested as a promising therapeutic. The role of melatonin has not been investigated in the treatment of AR, even though AR has a similar pathogenesis to those of atopic dermatitis and allergic bronchial asthma. This review is aimed to examine the pathophysiological mechanism of AR and illuminate the common pathways with atopic dermatitis and allergic bronchial asthma to discuss the potential hypothetical therapeutic role of the melatonin in AR, similar to the other two atopic diseases.

Keyword: melatonin, allergic rhinitis, atopy, asthma, atopic dermatitis, interleukin

Allergic rhinitis (AR) is a chronic disease of the upper airways, characterized by IgE-mediated inflammation of the nasal mucous membranes in the nose. Atopy and environmental factors play a role in the etiology of AR. The symptoms of AR are a runny nose, nasal congestion, sneezing, and nasal itching (1, 2). When exposed to the allergen, the dendritic cells (Langerhans cells), the antigen-presenting cells in the nasal mucosa, receive the allergen by endocytosis. Then the Langerhans cell proteolyzes the allergen into peptide sequences and expresses the antigen of the allergen in its surface MHC-Class II antigen recognition site. The allergen is then transported to the regional lymph node to be introduced to naive CD4 + T lymphocytes (1). In response, Th0 cells differentiate into Th2 lymphocytes through various cytokines and transcription factors one of which is interleukin (IL)-4 released from Type 2 innate lymphoid cells. Cytokines such as IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte macrophage - stimulating factor (GM-CSF) are secreted from T2 lymphocytes to induce the maturation, activation, and chemotaxis of eosinophils (through IL-5); and IgE expression from B lymphocytes (through IL-4 and IL-13). Specific IgE antibodies bind to the membrane receptors of mast cells in tissues and circulating basophils. When exposed to the allergen, the allergen binds to the mast cell with its specific

IgE receptors, resulting in degranulation (1-3). Various mediators such as histamines, proteases, proteoglycans, and TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) are immediately released by mast cell degranulation. The platelet-activating factor (PAF), leukotrienes (LCT4, LTD4, LTE4) and prostaglandins (PGD2) are synthesized *de novo* and released in minutes (4).

This process is called early phase and manifests itself in increased vascular permeability through substance P, neurokinin-A, vasointestinal peptide (VIP), and calcitonin gene-associated peptide (CGRP); exudation; increased nasal secretions from the submucosal glands; congestion; sneezing; and nasal itching (1, 3). The amount of histamine may not always correlate with findings other than sneezing, and even high levels of histamine may be present in nasal secretions of non-AR individuals. However, the number of leukotrienes and prostaglandins are often correlated with symptoms that occur in the early phase (1).

The late phase of AR usually begins within 4-6 hours after the allergen exposure, peaks after 6-12 hours and mainly characterized by the prolongation of early phase symptoms, particularly nasal congestion (1). Interleukins synthesized from mast cells (IL-4, IL-5,

IL-6, IL-1b, and IL-13), cytokines, and chemokines such as GM-CSF and TNF- α are involved in this phase. These mediators contribute to eosinophilic, basophilic, and T lymphocytic infiltration of the nasal mucosa by increasing the expression of vascular adhesion molecules in endothelial cells (3).

Within four to eight hours, these inflammatory cells in the tissue begin to activate and release their inflammatory mediators. Activated epithelial cells release the thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-25 and IL-33, contributing to the Th2 response, some leading to apoptosis (2). This remodeling process, which is characterized by tissue damage, inflammatory (especially eosinophilic through IL-5) cell infiltration, epithelial atrophy, goblet cell hyperplasia, and extracellular matrix thickening, is the result of the late phase of AR (3).

Regulatory T lymphocytes (Treg) also play a role in the exacerbation of Th2 lymphocyte response, particularly through IL-10 (2). A decrease in Treg cell number and function has been demonstrated in patients with AR (5). Th17 plays a role in atopy related autoimmunity and allergic disorders, as well. A balance between Th17 and Treg cells is crucial such that excess in Th17 function and a defect in Treg function may trigger the development and progression of allergic asthma and rhinitis (6).

Melatonin as a promising treatment modality

Synthesis and release of melatonin

Melatonin (5-methoxy N-acetyl tryptamine), released from the suprachiasmatic nucleus in the pineal gland, is a neurohormone that has been under consideration for its known effects on the circadian rhythm as well as its impact on the immune system in recent years (7). In addition to the pineal gland, many tissues are known to synthesize melatonin, such as ovarian, lens and bone marrow cells in mammals, and spleen, thymus, platelets and other immune cells in rats (8).

The precursor of melatonin is tryptophan. Tryptophan is converted to N-acetyl serotonin by the enzyme N-acetyltransferase and then to melatonin by the hydroxy indole-O-methyltransferase enzyme. The activity of N-acetyltransferase is regulated periodically in a photosensitive manner. In the presence of light, the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic structures are stimulated, while in the dark serotonin and N-acetyltransferase are released from the stores via noradrenaline. Between 20.00 and 23.00, the melatonin level gradually increases and peaks around 01.00-05.00. Normally, serum melatonin levels are around 0-20 picograms (pg) / milliliters (ml) in daytime and 20-200 pg / ml (average 60-70 pg / ml) at night.

Pharmacokinetics of melatonin

The hormone is highly lipophilic and partially hydrophilic. It can be administered orally by dissolving in gelatin capsules or intravenously in ethanol, and intraperitoneally. When administered intravenously, melatonin is eliminated in minutes because of its short half-time (0.5 to 5.6 minutes) however after

oral administration it takes approximately 60 minutes to reach a peak. After oral administration, plasma distribution follows a biphasic pattern with a half-life of respectively 2 and 20 minutes and serum peak concentration is reached approximately in 60 minutes (8). The bioavailability of melatonin ranges between 10 and 56% (mean 33%). Melatonin is metabolized rapidly and mostly in the liver and to a lesser extent in the kidney. When administered in the oral route, a ratio of 95% is exposed to a hepatic first-pass in which cytochrome P450 enzyme CYP1A2 takes a role and leads the production of a principal urinary extraction metabolite called the "6-sulfatoxymelatonin (6-SM)" (8).

Melatonin, of which synthesis is diminished by light activation, has been described in photo-immunomodulation for seasonal and intraday circadian effects on the immune system. According to data from studies on many vertebrates and humans, it is known that, as the duration of exposure to light decreases, especially during sleep and in winter, the level of melatonin increases to strengthen the immune system (7).

Mechanisms of action of melatonin

The melatonin effects in humans and other mammals by G-protein coupled membrane receptors, nuclear receptors, calmodulin and antioxidant properties (9). Melatonin G-protein coupled membrane receptors are present in the peripheral organs (spleen, thymus and all lymphocyte types, caudal artery, etc.) as well as cerebrum (cortex and suprachiasmatic nucleus) in humans (8, 10, 11). These are the high-affinity Mel1a (ML1, ML1a, MT1, MTNR1A) mainly located in the suprachiasmatic core of the hypothalamus and low-affinity affinity Mel1b (MT2, ML1b, MTNR1B) receptors. Although post-receptor signaling mechanisms are usually carried out via the inhibition of adenylate cyclase and reduction of cAMP, Mel1b receptors also inhibit guanylate cyclase and reduce cGMP, and are known to act through different signaling mechanisms in non-human species, too (8, 10, 11). Mel1a is mainly located in various sites of brain such as the pituitary gland, hypothalamus (suprachiasmatic nucleus), thalamus, cortex, basal ganglia, nucleus accumbens, amygdala, hippocampus, cerebellum, skin, and retina whereas Mel1b is basically seen in retina and cornea, and less frequently in cortex, hippocampus, paraventricular nucleus, and cerebellum (8, 11). MT3 (ML2, Quinone reductase enzyme-2 (NQO2), QR2) receptors are detoxification enzymes and located in liver, kidney, heart, lung, intestine, muscle, and brown fat tissue (11).

Melatonin might function through two types of nuclear receptors; the orphan receptor retinoid Z receptor (RZR)- β and the retinoic acid - related orphan receptor (ROR) - α , β , and γ (8, 12). The nuclear receptors of melatonin are crucial for the mast cells to achieve inflammation, immune response, cell proliferation, and apoptosis mechanisms and are thought to be coupled with the transcription of NF-KB as the post-receptor signaling pathway, similar to corticosteroids (13). The transcription factor NF-kB, which is typically combined with an inhibitory molecule (I-kB) in the mast cell cytoplasm; is activated by phosphorylation and degradation of the I-kB when the mast cells are stimulated. During inflammation, NF-kB induces endogenous melatonin

(MEL-n) synthesis from inflammatory cells to regulate mast cells, by stimulating the arylalaminamine-acetyltransferase enzyme, possibly due to the presence of NF elements in the promoter and intron regions of the gene encoding this enzyme, encoding this enzyme (14). Exogenously administered melatonin does not affect the endogenous melatonin level in the presence of unstimulated mast cells. But, in the presence of stimulated mast cells, it inhibits NF- κ B and reduces the endogenous melatonin level in a dose-dependent manner. This effect is assumed to suppress the exaggerated inflammatory response (13).

Mechanisms of non-receptor mediated effects of melatonin

1. Antiapoptotic effect

Calmodulin-mediated processing, is often associated with breast cancer. It is suggested that melatonin facilitates dephosphorylation and nuclear import of histone deacetylase 4, leading to inactivation of calmodulin-dependent protein kinase II α and apoptosis which may slow down the cell cycle and stop breast cancer growth. Melatonin has antiapoptotic effects in healthy cells (15).

2. Antioxidant and cytoprotective effects

Melatonin can easily pass through the cell membrane and reach the nucleus through its hydrophilic and lipophilic properties where it will show antioxidant and cytoprotective effects. Melatonin is a free radical scavenger and an antioxidant. It stimulates superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase enzymes. In addition to antioxidant enzyme stimulation, it also neutralizes molecules such as hydrogen peroxide, oxygen radicals, peroxynitrite anion, nitric oxide and hypochloride acid (16). Melatonin, which does not have pro-oxidative activity, is more capable than glutathione and vitamin E to neutralize free hydroxyl (OH) radicals. Furthermore, unlike antioxidative substances such as vitamin E, vitamin C and beta carotene, the intermediates produced during the antioxidant reactions of melatonin are also antioxidant (17). Thus, the cell membrane, nucleus, and DNA are protected from lipid peroxidation and neutralizing toxic radicals (8, 16). A recent experimental study demonstrated decreased apoptosis in the nasal mucosa of rhinosinusitis induced rats when treated with the melatonin (18).

3. Immunomodulatory effects

Melatonin receptors are also present in human lymphocytes, and human lymphocytes are shown to synthesize, secrete, and respond to melatonin (8, 12). Furthermore, melatonin plays a role in T cell differentiation and activation somehow (12). It promotes the production of interferon (IFN) - γ and IL-2 by both the membrane and nuclear receptors, suggesting that it may activate human Th1 lymphocytes (9). To the best of our knowledge, melatonin is an immunomodulatory hormone and influences Th1, Th2, Th17, and Treg responses, but in a varying manner. In the case of immunosuppression, melatonin inhibits the Th1, Th17, and Treg responses, while in the case of immune-exacerbation it stimulates the Treg pathways (12). Its immunomodulatory mechanism allows

the production of various cytokines such as interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-10; increases T lymphocyte activity and regulates lymphocyte proliferation; thus indirectly increases antibody production. Increased IFN- γ and IL-2 positively feedback the synthesis of melatonin and IL-12. In addition, increased IL-2 levels lead increased Natural Killer (NK) activity (9).

Typically, CD4 + T lymphocytes are transformed into Th1 lymphocytes producing IFN- γ and IL-2 and Th2 lymphocytes producing IL-4, IL-9, IL-10 and IL-13, which enable the maturation and activation of eosinophils. In AR, this pathway shifts to Th2 increase, Th1 decrease and IFN- γ level decrease (19-21). As known, IFN- γ is released mainly from Th1, cytotoxic T, naïve CD4 + T, and NK cells, and secondarily from dendritic cells, macrophages, and even B lymphocytes. The promoter region of the IFN- γ gene has a binding site of various transcription factors such as NF- κ B. IFN- γ regulates approximately five hundred genes. These include increased transcription of antigen-presenting cells genes, differentiation of naïve CD4 + T lymphocytes towards Th1 cell direction, increased apoptosis and B lymphocyte response, increased immunoglobulin heavy chain production (increased IgG and decreased IgE), and regulation of various inflammatory cells cytokines and adhesion molecules (21).

The role of melatonin in the pathogenesis of atopic diseases (Table 1)

Atopic eczema and melatonin

Atopic eczema (AE) is dominated by aggravated Th2 response in the acute phase, which is particularly mediated by IL-4, IL-5, and IL-13, and manifests itself with a relatively decreased Th1 response and IFN- γ levels. As the IFN- γ increases, melatonin synthesis and serum IFN- γ levels decrease in AE patients, and the reduced serum melatonin concentration may lead sleep disorders and stress, which results in an over-decrease in melatonin (22). The nocturnal melatonin increase was diminished in patients with atopic dermatitis compared to the control group (23), and the serum melatonin levels were significantly lower in the patients with atopic dermatitis (24). Furthermore, sleep disorders were common in patients with atopic dermatitis and found to be associated with the severity of atopic dermatitis (25). As known, the nocturnal increase of melatonin during sleep is usually associated with increased Th1 response and high serum IFN- γ level (26). Since reactive oxygen species and free radicals contribute to the skin damage in AE (27), melatonin may be a promising therapeutic by its antioxidative and free radical scavenger effects. The IFN- γ to IL-4 ratio was significantly lower in the subgroup of atopic dermatitis patients with poor sleep efficiency which exhibited lower nocturnal serum melatonin levels (28).

Furthermore, atopic dermatitis-like lesions were suppressed by melatonin treatment in a murine model (29). Thus, these two studies have also suggested melatonin as a treatment alternative in atopic dermatitis (28, 29). Another entity is called "indole-aminic theory" which has been speculated to underlie the pathogenesis

Table 1. The studies which have revealed the potential effects of melatonin in bronchial asthma, atopic dermatitis, and allergic rhinitis in historical order.

Animal Studies	
Martins et al., 2001 (32)	Airway inflammation was healed by administering exogenous melatonin in pinealectomized rats through restoring the ability of cells to migrate from the bone marrow to the bronchoalveolar fluid.
Kim et al., 2009 (29)	Atopic dermatitis-like dermatitis was suppressed by melatonin in a murine model by reducing total IgE in serum, and IL-4 and IFN- γ production by activated CD4+ T cells.
Shin et al., 2014 (36)	Melatonin-treated mice exhibited a significant reduction in MUC5AC (a major component of the airway mucin) expression in an experimental asthma model.
Shin et al., 2014 (38)	Melatonin inhibited specific matrix metalloproteinases (MMP 9) induced by the production of Th 2 cells, contributing to the anti-inflammatory effect in a murine model of allergic asthma.
Wu et al., 2016 (37)	The expression of TLR9 (Toll like receptor 9) increased in a murine model of asthma and it correlated with the airway inflammation, and decreased serum and bronchoalveolar levels of melatonin, whereas TLR9 deficiency reversed the outcome by restoring melatonin biosynthesis.
Clinical Trials	
Schwarz et al., 1988 (23)	Nocturnal melatonin increase was diminished in patients with atopic dermatitis compared to the control group.
Sutherland et al., 2002 (35)	Melatonin has been shown to improve symptoms in allergic asthma by modulating the release of various inflammatory cytokines and the behavior of inflammatory cells.
Sutherland et al., 2003 (41)	In patients with nocturnal asthma, serum peak melatonin levels were significantly higher than those of the controls.
Fei et al., 2004 (33)	In the exacerbation periods of allergic asthma, both the basal and peak melatonin levels were significantly reduced compared to the healthy control group, and the severity of symptoms was correlated with the decrease in melatonin levels.
Dimitro et al., 2004 (26)	Nocturnal increase of melatonin during sleep was associated with increased Th 1 response and high serum IFN- γ level.
Chamlin et al., 2005 (25)	Sleep disorders were common in patients with atopic dermatitis and found to be associated with the severity of atopic dermatitis.
Muñoz-Hoyos et al., 2007 (24)	The serum melatonin levels were significantly lower in the patients with atopic dermatitis.
Kimata H., 2007 (22)	As the IFN- γ increases, melatonin synthesis and serum IFN- γ levels decrease in AE patients, and the reduced serum melatonin concentration may lead sleep disorders and stress, which results in an over-decrease in melatonin.
Gumral et al., 2009 (34)	Serum melatonin levels and various antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione reductase decreased in the exacerbation period of asthma.
Karasu-Minareci et al., 2012 (47)	Melatonin strengthened contraction responses, but did not affect relaxation responses in rat tracheal smooth muscle preparations which can be considered to play a role in the pathogenesis of nocturnal asthma.
Fidan et al., 2013 (44)	The basal and peak salivary melatonin levels of patients with allergic rhinitis were significantly lower than controls.
Shin et al., 2014 (38)	Melatonin inhibited specific matrix metalloproteinases (MMP 9) induced by the production of Th 2 cells, contributing to the anti-inflammatory effect in a murine model of allergic asthma.
Chang et al., 2014 (28)	The nocturnal melatonin level was found to be significantly associated with sleep disturbance in the patients with atopic dermatitis. The IFN- γ to IL-4 ratio was significantly lower in the subgroup of patients with atopic dermatitis with poor sleep efficiency which exhibited lower nocturnal serum melatonin levels.
Wu et al., 2016 (37)	The expression of TLR9 (Toll like receptor 9) increased in a murine model of asthma and it correlated with the airway inflammation, and decreased serum and bronchoalveolar levels of melatonin, whereas TLR9 deficiency reversed the outcome by restoring melatonin biosynthesis.
Sarnowski et al., 2016 (39)	A genetic receptor variant of melatonin (MTNR1A) was found to be associated with the paternally transmitted hereditary AR and asthma comorbidity.
Kleiner et al., 2016 (46)	Basophil deposition with increased melanocortin receptor MC1R (receptor to which melatonin-stimulating hormone binds) was observed in the nasal mucosa of both patients with allergic rhinitis and allergic rhinitis induced mice. α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) was shown to inhibit allergic airway inflammation.
Chang et al., 2016 (31)	In children with atopic dermatitis and sleep disorder, 3 mg / g oral melatonin for four weeks has been reported to significantly reduce the severity of atopic dermatitis compared to placebo.
Bayrak-Degimenci et al., 2018 (6)	Lower serum IFN- γ levels were documented in AR patients compared to controls.

of AE, as well. Accordingly, as the serum levels of melatonin decrease somehow, various immunological defects become more prominent, and finally the organism becomes more sensitive to the environmental triggers (30). In children with atopic dermatitis and sleep disorder, 3 mg/g oral melatonin for four weeks has been reported to significantly reduce the severity of atopic dermatitis compared to placebo (31).

Bronchial asthma and melatonin

Experimental studies confirmed healing in airway inflammation by administering exogenous melatonin in pinealectomized rats

(32). In the exacerbation periods of allergic asthma, both the basal and peak melatonin levels were significantly reduced compared to the healthy control group, and the severity of symptoms was correlated with the decrease in melatonin levels (33). Besides, serum melatonin levels and various antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione reductase reduce in the exacerbation period of asthma (34). Melatonin has been shown to improve symptoms in allergic asthma by modulating the release of various inflammatory cytokines and the behavior of inflammatory cells (35). Antiinflammatory and antioxidant effects, as well as their effects on transcription and inhibition of mucus secretion, are among the therapeutic mechanisms of action

found in experimental models of allergic asthma (36). Another potential therapeutic target may be the TLR9, a receptor among the toll-like receptors (TLRs) family, which is shown to have a role in the pathogenesis of bronchial asthma. Experimental studies documented that the expression of TLR9 increases in asthma and it correlated with the airway inflammation, decreased serum and bronchoalveolar levels of melatonin. On the other hand, TLR9 deficiency reversed the outcome by restoring melatonin biosynthesis (37). It is also known that melatonin inhibits specific matrix metalloproteinases (MMP 9) induced by the production of Th 2 cells, contributing to the anti-inflammatory effect in allergic asthma (38). Moreover, it has been described that genetic melatonin receptor variants can cause hereditary AR and asthma overlap (39). On the other hand, the use of melatonin is generally avoided in the patients with severe nocturnal asthma, whose serum melatonin levels are higher than the non-nocturnal matches because the nocturnal exacerbation has been speculated to depend on high melatonin levels which physiologically increases the contractility of airway smooth muscle and thus may result in bronchospasm (40, 41).

Allergic rhinitis and melatonin

IFN- γ deficiency provides the basis for allergic diseases and aggravates symptoms. Similarly, the decline of Th2 cytokines to normalize IFN- γ level is compatible with the improvement of allergies (21). IFN- γ suppresses Th2 response while increasing Th1 response (21), reduces eotaxin receptor expression, inhibits eosinophil differentiation and regulates eosinophilic response (42). IFN- γ also increases NO synthesis by inducing the induced nitric oxide (NO) synthase enzyme, thereby preventing Ig-E mediated degranulation of mast cells (43). Lower serum IFN- γ levels were documented in AR patients compared to controls (6). In a study comparing salivary melatonin levels of AR patients with healthy volunteers, it was observed that both baseline and peak levels of AR were significantly lower than those of control

subjects and the circadian rhythm pattern was impaired (44). Low melatonin levels reduce IFN- γ synthesis, which reduces melatonin synthesis (9, 28, 29). On the other hand, IFN- γ stimulation is known to increase melatonin synthesis (45). Basophil deposition with increased melanocortin receptor (receptor to which melatonin-stimulating hormone binds) was observed in the nasal mucosa of patients with AR and mice (46).

In conclusion, atopic dermatitis and allergic asthma share a common pathophysiological process similar to AR; and that's why the melatonin, which plays an essential role in both atopic dermatitis and allergic asthma may also have a potential task in AR. To our knowledge, the only treatment modality that can modify the underlying pathogenesis of AR is subcutaneous or sublingual immunotherapy that converts the Th1 response to Th2 response (48). However, immunotherapy has several contraindications or limitations to use (49, 50). Nevertheless, various cytokines, receptors, and interleukins that play a role in the pathogenesis of AR have been investigated recently for potential disease-modifying effects but have not been approved yet (50). On the other hand, the evidence-based data suggests melatonin as a very promising therapeutic agent in atopic dermatitis and allergic asthma. However, there is also insufficient data on how melatonin can be effective in AR and whether can be used for the treatment of AR. Therefore, this hypothesis should be studied either in experimental studies or in clinical trials, in all aspects.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - AÇÇ, YT, MCE; Design - AÇÇ, YT, MCE; Supervision - AÇÇ, YT, MCE; Fundings - AÇÇ, YT, MCE; Materials - AÇÇ, YT, MCE; Data Collection and/or Processing - AÇÇ, YT, MCE; Analysis and/or Interpretation - AÇÇ, YT, MCE; Literature Search - AÇÇ, YT, MCE; Writing Manuscript - AÇÇ, YT, MCE; Critical Review - AÇÇ, YT, MCE

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

REFERENCES

- Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, Michel FB. Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;110:207-218. [CrossRef]
- Broide DH. Allergic rhinitis: Pathophysiology. *Allergy Asthma Proc* 2010;31:370-374. [CrossRef]
- Min Y-G. The Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010;2:65-76. [CrossRef]
- Krystal-Whitemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* 2016;6:620. [CrossRef]
- Saad K, Zahran AM, Elsayh KI, Abdelmoghny A, Aboul-Khair MD. Variation of Regulatory T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Children with Allergic Rhinitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2018;66:307-313. [CrossRef]
- Bayrak Degirmenci P, Aksun S, Altin Z, et al. Allergic Rhinitis and Its Relationship with IL-10, IL-17, TGF-beta, IFN-gamma, IL 22, and IL-35. *Dis Markers* 2018;2018:9131432. [CrossRef]
- Haldar C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *J Photochem Photobiol B* 2010;98:107-117. [CrossRef]
- Tordjman S, Chokron S, Delorme R, et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol* 2017;15:434-443. [CrossRef]
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 2000;29:129-137. [CrossRef]
- Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016;56:361-383. [CrossRef]
- Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Med* 2016;48:135-141. [CrossRef]
- Ren W, Liu G, Chen S, et al. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *J Pineal Res* 2017;62:e12394. [CrossRef]

13. Maldonado MD, Moreno-Garcia H, Gonzalez-Yanes C, Calvo JR. Possible Involvement of the Inhibition of NF-kB Factor in Anti-Inflammatory Actions that Melatonin Exerts on Mast Cells. *J Cell Biochem* 2016;117:1926–1933. [CrossRef]
14. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-pineal axis: nuclear factor κ B (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci* 2013;14:10979–10997. [CrossRef]
15. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Akduman R, Ozben T. A Review on Melatonin's Effects in Cancer: Potential Mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem* 2018;18:985–992. [CrossRef]
16. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 2016;61:253–278. [CrossRef]
17. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994;55:PL271–PL276. [CrossRef]
18. Koc S, Cayli S, Aksakal C, et al. Protective effects of melatonin and selenium against apoptosis of olfactory sensory neurons: A rat model study. *Am J Rhinol Allergy* 2016;30:e62–e66. [CrossRef]
19. Haczk A, Macary P, Haddad EB, et al. Expression of Th-2 cytokines interleukin-4 and -5 and of Th-1 cytokine interferon-gamma in ovalbumin-exposed sensitized Brown-Norway rats. *Immunology* 1996;88:247–251. [CrossRef]
20. Liao SY, Liao TN, Chiang BL, et al. Decreased production of IFN gamma and increased production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk of allergy. *Clin Exp Allergy* 1996;26:397–405. [CrossRef]
21. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:137–144. [CrossRef]
22. Kimata H. Elevation of salivary melatonin levels by viewing a humorous film in patients with atopic eczema. *Horm Metab Res* 2007;39:310–311. [CrossRef]
23. Schwarz W, Birau N, Hornstein OP, et al. Alterations of melatonin secretion in atopic eczema. *Acta Derm Venereol* 1988;68:224–249.
24. Munoz-Hoyos A, Espin-Quirantes C, Molina-Carballo A, et al. Neuroendocrine and circadian aspects (melatonin and beta-endorphin) of atopic dermatitis in the child. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:679–686. [CrossRef]
25. Chamlin SL, Mattson CL, Frieden IJ, et al. The price of pruritus: sleep disturbance and cosleeping in atopic dermatitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159:745–750. [CrossRef]
26. Dimitrov S, Lange T, Tiekens S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun* 2004;18:341–348. [CrossRef]
27. Sivarajani N, Rao SV, Rajeev G. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res* 2013;7:2683–2685. [CrossRef]
28. Chang YS, Chou YT, Lee JH, et al. Atopic dermatitis, melatonin, and sleep disturbance. *Pediatrics* 2014;134:e397–405. [CrossRef]
29. Kim TH, Jung JA, Kim GD, et al. Melatonin inhibits the development of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Pineal Res* 2009;47:324–329. [CrossRef]
30. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, et al. Melatonin and Atopy: Role in Atopic Dermatitis and Asthma. *Int J Mol Sci* 2014;15:13482–13493. [CrossRef]
31. Chang YS, Lin MH, Lee JH, et al. Melatonin Supplementation for Children With Atopic Dermatitis and Sleep Disturbance: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatrics* 2016;170:35–42. [CrossRef]
32. Martins E Jr, Ligeiro de Oliveira AP, Fialho de Araujo AM, Tavares de Lima W, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. Melatonin modulates allergic lung inflammation. *J Pineal Res* 2001;31:363–369. [CrossRef]
33. Fei GH, Liu RY, Zhang ZH, Zhou JN. Alterations in circadian rhythms of melatonin and cortisol in patients with bronchial asthma. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:651–656. <http://www.chinaphar.com/article/view/8196/8800>
34. Gumral N, Naziroglu M, Ongel K, et al. Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cell Biochem Funct* 2009;27:276–283. [CrossRef]
35. Sutherland ER, Martin RJ, Ellison MC, Kraft M. Immunomodulatory effects of melatonin in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1055–1061. [CrossRef]
36. Shin IS, Park JW, Shin NR, et al. Melatonin inhibits MUC5AC production via suppression of MAPK signaling in human airway epithelial cells. *J Pineal Res* 2014;56:398–407. [CrossRef]
37. Wu HM, Shen QY, Fang L, et al. JNK-TLR9 signal pathway mediates allergic airway inflammation through suppressing melatonin biosynthesis. *J Pineal Res* 2016;60:415–423. [CrossRef]
38. Shin IS, Park JW, Shin NR, et al. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology* 2014;219:901–908. [CrossRef]
39. Sarnowski C, Laprise C, Malerba G, et al. DNA methylation within melatonin receptor 1A (MTNR1A) mediates paternally transmitted genetic variant effect on asthma plus rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:748–753. [CrossRef]
40. Weekley LB. Influence of melatonin on bovine pulmonary vascular and bronchial airway smooth muscle tone. *Clin Auton Res* 1995;5:53–56. [CrossRef]
41. Sutherland ER, Ellison MC, Kraft M, Martin RJ. Elevated serum melatonin is associated with the nocturnal worsening of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:513–517. [CrossRef]
42. Fulkerson PC, Zimmermann N, Brandt EB, et al. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN-gamma (Mig, CXCL9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1987–1992. [CrossRef]
43. Eastmond NC, Banks EM, Coleman JW. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *J Immunol* 1997;159:1444–1450. <https://www.jimmunol.org/content/159/3/1444.long>
44. Fidan V, Alp HH, Gozeler M, Karaaslan O, Binay O, Cingi C. Variance of melatonin and cortisol rhythm in patients with allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol* 2013;34:416–419. [CrossRef]
45. Finocchiaro LM, Nahmod V, Launay J. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J* 1991;280:727–731. [CrossRef]
46. Kleiner S, Braunstahl GJ, Rudrich U, et al. Regulation of melanocortin 1 receptor in allergic rhinitis in vitro and in vivo. *Clin Exp Allergy* 2016;46:1066–1074. [CrossRef]
47. Karasu-Minareci E, Kaya Y, Belgün Yildirim F. The achilles heel in melatonin: asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012;11:246–252. [CrossRef]
48. Ricketti PA, Alandijani S, Lin CH, Casale TB. Investigational new drugs for allergic rhinitis. *Expert Opin Investig Drugs* 2017;26:279–292. [CrossRef]
49. Durham SR, Creticos PS, Nelson HS, et al. Treatment effect of sublingual immunotherapy tablets and pharmacotherapies for seasonal and perennial allergic rhinitis: Pooled analyses. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1081–1088.e4. [CrossRef]
50. Castillo J, Dimov V. Investigational drugs for the treatment of allergic rhinitis. *Expert Opin Investig Drugs* 2014;23:823–836. [CrossRef]