



Deneyisel Kuru Göz Modelinde Topikal Timokinonun Etkileri

Effects of Topical Thymoquinone in an Experimental Dry Eye Model

© Tolga Kocatürk*, © Erol Erkan**, © İbrahim Meteoglu***, © Mehmet Ekici****, © Aslıhan Karul Büyükoztürk*****, © İrfan Yavaşoglu*****, © Harun Çakmak*, © Volkan Dayanır*****, © Muharrem Balkaya*****

*Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

**Yozgat Şehir Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Yozgat, Türkiye

***Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

****Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

*****Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

*****Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahiliye Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Aydın, Türkiye

*****Batıgöz Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Çörek otundan elde edilen ucucu yağın biyolojik olarak aktif ana bileşeni olan Timokinonun (TQ) etkisini deneyisel kuru göz modelinde karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 10 haftalık 36 BALB/c fare kullanıldı. Fareler herbiri 6 fare içeren, 6 gruba ayrıldı: Negatif ve pozitif kontrol grubu dışındaki 4 gruba dengeli tuz solüsyonu, florometalon (FLML), TQ veya taşıyıcı (Tween80) uygulandı. Bir haftalık tedavi sonrası, olası etkiler incelendi. Sakrifiye edilen farelerin gözleri histopatolojik olarak incelendi. Konjonktival dokudaki interlökin (IL)-1 α , tümör nekrosis faktörü- α , interferon- γ , IL-2, IL-6, IL-10 ve laktoferrin seviyeleri Multiplex Immunobead Assay ile ölçüldü. Enflamatuvar hücrelerin varlığı hematoksilen-eozin ve periodik asid-Schiff ile boyanan preparatlarda araştırıldı. CXT reseptörü içeren enflamatuvar T hücreleri akım sitometrisi ile belirlendi.

Bulgular: FLML ve TQ gruplarında enflamatuvar hücre yoğunluğunun daha az, goblet hücrelerinin daha çok olduğu görüldü. IL-1 α ve IL-2 seviyeleri TQ grubunda yüksek bulundu.

Sonuç: TQ grubunda patolojik olarak azalmış enflamasyon cevabı olduğu görüldü. Ancak bu durum sitokin düzeyinde doğrulanmadı.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu yağı, kuru göz, timokinon

Abstract

Objectives: To comparatively evaluate the effects of thymoquinone (TQ), the biologically active main component of volatile oil derived from *Nigella sativa* seeds, in an experimental dry eye model.

Materials and Methods: A total of 36 BALB/c mice 10 weeks of age were used in the study. The mice were divided into 6 groups of 6 mice. Two groups were negative and positive controls, and the other 4 groups were treated with balanced salt solution, fluorometholone (FML), TQ, or vehicle (Tween80). After 1 week of treatment, the mice were killed and the eyes removed for histopathologic examination and cytokine analysis. Interleukin (IL)-1 α tumor necrosis factor- α , interferon- γ , IL-2, IL-6, IL-10, and lactoferrin levels in the conjunctival tissue were measured by multiplex immunobead assay. The presence of inflammatory cells in ocular tissue samples were investigated by hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff staining. Inflammatory T cells containing CXT receptor in the conjunctiva were determined by flow cytometry.

Results: FLML and TQ groups had less inflammatory cell density and more goblet cells compared to the other groups. High levels of IL-1 α and IL-2 were found in the TQ group.

Conclusion: TQ treatment was associated with reduced inflammation in pathological examination, but did not significant lower cytokine levels.

Keywords: Black seed oil, dry eye, thymoquinone

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Tolga Kocatürk, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Tel.: +90 533 344 41 11 E-posta: tolgakocaturk@gmail.com **ORCID-ID:** orcid.org/0000-0001-5187-227X

Geliş Tarihi/Received: 09.11.2017 **Kabul Tarihi/Accepted:** 11.05.2018

©Telif Hakkı 2018 Türk Oftalmoloji Derneği
Türk Oftalmoloji Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

Giriş

Kuru göz, çeşitli nedenlerle milyonlarca insanı etkileyen kronik ve yaygın bir göz hastalığıdır.¹ Yaş, hormon eksiklikleri, ilaçlar, cerrahi ve sistemik otoimmün hastalıkları gibi çeşitli faktörler lakrimal fonksiyonel birimlerde hasara neden olur ve kuru göz semptomlarına yol açabilen yüzey enflamasyonu meydana gelir.²

Lakrimal bez ve konjonktiva epitelinde kronik immün aracılı enflamatuvar süreçler, hasara yol açan disfonksiyona neden olur ve kuru göz patogeneğinde rol oynar. Lakrimal bez ve konjonktiva epitelinde ve/veya hastanın gözyaşında özellikle başta interlökin 6 (IL-6) olmak üzere enflamatuvar sitokinlerin düzeyinin arttığı bildirilmiştir.^{3,4,5,6,7} Yüzey enflamasyonu, fonksiyonel gözyaşı disfonksiyonu ve gözyaşı film tabakası bileşimi ve stabilitesindeki değişimlere bağlı olarak ortaya çıkar ve kuru göze neden olur. Gözyaşı üretimi ve sekresyonunun azalması kronik bir enflamasyon döngüsü yaratır.³

Şu anda kuru göz hastalığı için ideal bir tedavi bulunmamaktadır. Temel tedavi seçenekleri prezervan içeren yapay gözyaşları ve gözyaşı takviyesidir, ancak bunlar palyatif önlemlerdir. Kuru gözde kullanılan anti-enflamatuvar tedaviler, kuru gözle ilişkili mediyatörleri veya yolakları hedef alır.^{8,9} Siklosporin veya prezervan içermeyen topikal kortikosteroidlerin kullanılması kuru göz semptomlarını hafifletebilir ve oküler yüzeyin normalleşmesini sağlayabilir.^{10,11,12,13,14,15,16} Ancak, istenmeyen yan etkiler ve düşük etkinlik nedeniyle mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır. İmmünoüpresif ajanların olası yan etkileri tam olarak belirlenmemiştir.

Timokinon (TQ), Orta Doğu ülkelerinde popüler olan siyah tohumdan (siyah kimyon, rezene çiçeği ve çeşitli başka isimler verilen *Nigella sativa*) elde edilen uçucu yağın biyolojik olarak aktif ana bileşenidir. Serbest radikal oluşumuna neden olan çeşitli maddelerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. TQ'nun anti-enflamatuvar,^{17,18} anti-oksidan,^{19,20} ve anti-neoplastik²¹ etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir.²² TQ, COX-2 ile katalizlenen araziidonik asit metabolizması ile PGE₂ oluşumunu indometazinden daha güçlü şekilde inhibe etmektedir.^{18,23}

TQ'nun, anti-enflamatuvar etkisi ile kuru göz hastalığının patojenik mekanizmasını engellediği öne sürülmüştür. Ayrıca, kuru göz hastalığı patogeneğinde önemli bir rol oynayan lakrimal fonksiyonel birim disfonksiyonunun neden olduğu enflamasyonun bastırılmasında steroidler gibi kuru göz tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar ile karşılaştırıldığında teorik olarak daha düşük yan etki profiline sahip olabilir. Oküler dokularda TQ'nun terapötik potansiyeli hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Bu araştırma TQ ve kuru göz tedavisi üzerine öncü bir çalışmadır. Bu çalışmada, doğal olarak yüksek miktarda TQ içeren ve kuru göz hastalığında halk tarafından kolayca erişilebilen siyah tohum yağının olası terapötik etkinliğini ve yan etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için Yerel Hayvan Etik Kurulu tarafından onay alındı. Araştırma projesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklendi (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu [TÜBİTAK]; program kodu: 1002, proje numarası: 214S539). Çalışmada yaklaşık 10 haftalık toplam 36 erkek BALB/c fare kullanıldı. Fareler rastgele olarak 6 eşit gruba ayrıldı. Bir grup normal kontrol grubu iken, diğer 5 grupta deneysel kuru göz (DKG) modeli oluşturuldu. Grupların DKG/tedavi koşulları şu şekildedir: Grup 1 (negatif kontrol grubu): DKG oluşturulmadı + tedavi verilmedi; Grup 2 (pozitif kontrol grubu): DKG + tedavi verilmedi; Grup 3: DKG + steril Dengeli Tuz Çözeltilisi (BSS) (Alcon, Fort Worth, TX, ABD); Grup 4: DKG + topikal %0,1 florometolon (FML) (FML®, Allergan, Westport, Mayo, İrlanda); Grup 5: DKG + TQ⁸; Grup 6 (taşıyıcı grubu): DKG + topikal %0,8 Tween80 (taşıyıcı). DKG indüksiyonunu takiben, 1 hafta boyunca günde iki kez yaklaşık 2 µL göz damlası damlatıldı. Bu tedavi periyodundan sonra, Schirmer testi ve göz yaşı kırılma zamanı (TBUT) ile sırasıyla farelerin gözyaşı salgı miktarı ve stabilitesi değerlendirildi. Daha sonra fareler kurban edildi. Her hayvanın bir gözü akış sitometrisi ve multipleks immunobead testler için ve diğer gözü ise histopatolojik değerlendirme için kullanıldı.

Deneysel Kuru Göz İndüksiyonu

DKG, 7 gün boyunca gözlerle topikal olarak %0,2 benzalkonyum klorür (BAK) damlatılarak indüklendi.^{24,25}

TQ'nun Hazırlanması

TQ tozu (274666-1G, 2-izopropil-5-metilbenzoquinon Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) %0,8 Tween80 içinde %0,4 dozda çözüldü ve farelerin gözlerine günde iki kez topikal olarak damlatıldı.⁸ Erdurmuş ve ark.⁸ %0,4'lük TQ'nun triamsinolon asetonid kadar etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Gözyaşı Hacmi Ölçümü

Gözyaşı ölçümü, modifiye Schirmer I testi kullanılarak yapıldı. Alt göz kapağı aşağı çekildi ve Whatman 41 filtre kağıdı (farelerin gözlerine uygun olması için yaklaşık 1/4 oranda kesildi) alt fornixsin palpebral konjonktivasına yerleştirildi (orta ve temporal üçte birlik alanın birleşim yerine). Gözler açıkken, ıslanan mesafe (mm) 15 saniyelik aralıklarla ölçüldü. Ölçüm 3 kez tekrarlandı ve ortalama kaydedildi.

Gözyaşı Kırılma Zamanı Ölçümü

TBUT, alt konjonktival fornixe 1 uL sodyum floresein damlatıldıktan sonra ilk göz kırpma hareketini takiben korneada ilk kuru noktanın oluşmasına kadar geçen süre olarak ölçüldü. Ölçümler üç kez tekrarlandı ve ortalama değerler kaydedildi.

Doku Örneklerinin Toplanması

Fareler, ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında kurban edildi. Sağ gözler çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için %10 nötr tamponlu formalin ile fiks edildi. Sol gözler multipleks immün boncuk analizi ve akış sitometrisi için çıkartıldı; homojenize edildi ve sitokin analizi için kullanıldılar.

Histopatolojik Çalışmalar

Bulber konjonktiva, palpebral konjonktiva ve lakrimal bez örnekleri, hematoksisilen-eozin ve periyodik asit-Schiff boyama kullanılarak histolojik olarak enflamatuvar hücreler ve goblet hücreleri açısından incelendi. Örnekler, üst ve alt konjonktival bölgelerdeki enflamatuvar hücrelerin varlığı ve goblet hücre yoğunluğu açısından değerlendirildi.

Enzim İlihtili İmmünosorbent Test

Bulber ve palpebral konjonktival doku örnekleri 30 dakika süreyle radyoimmünopresipitasyon testi liziz tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, %1 NP-40 ve %0,1 sodyum deoksikolik asit, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL löpeptin) ile inkübe edilerek parçalandı. Santrifüj işleminden sonra elde edilen hücre ekstratları ve süpernatantlar ölçümlere kadar -80 °C'de saklandı. Örneklerdeki ilgili pro-enflamatuvar sitokin düzeyleri, üreticinin önerdiği protokole uygun olarak ticari kitler (E-Bioscience, Platinum ELISA, Viyana, Avusturya) kullanılarak ELISA ile değerlendirildi.

IL-1a, tümör nekrozis faktörü alfa (TNF-α), IL-6, IL-2, laktoferrin, IL-10 ve interferon gamma düzeyleri süpernatant fraksiyon kullanılarak ölçüldü. Testin 3 adımlı çalışma prensibi aşağıdaki gibidir: Fareye karşı geliştirilmiş bir sitokin antikoruna, mikro kuyucuklara kaplandı. Örnek içinde bulunan fare sitokini, mikro kuyucukları kaplayan antikorlara bağlanır. Birinci antikor (ilk inkübasyon) ile yakalanan fare sitokinine bağlanan, biotin ile konjuge anti-fare sitokin antikoruna eklendi. İnkübasyonun ardından, bağlanmamış biyotin ile konjuge anti-fare sitokin antikoruna yıkama aşaması ile uzaklaştırıldı. Biyotin ile konjuge anti-fare sitokin antikoruna (ikinci inkübasyon) bağlanacak streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) eklendi. Bu inkübasyonun ardından, bağlanmamış streptavidin HRP yıkama ile uzaklaştırıldı ve kuyucuklara (üçüncü inkübasyon) HRP ile reaksiyona giren substrat çözeltisi eklendi. Örneklerde bulunan fare sitokin miktarı ile orantılı şekilde renk oluşumu meydana gelir. Reaksiyon asit ilavesiyle sonlandırıldı ve absorbans 450 nm'de ölçüldü. Fare sitokin standartlarının 7 dilüsyonu ile oluşturulan standart eğri kullanılarak örneklerdeki sitokin konsantrasyonu ölçüldü.

Akış Sitometrisi

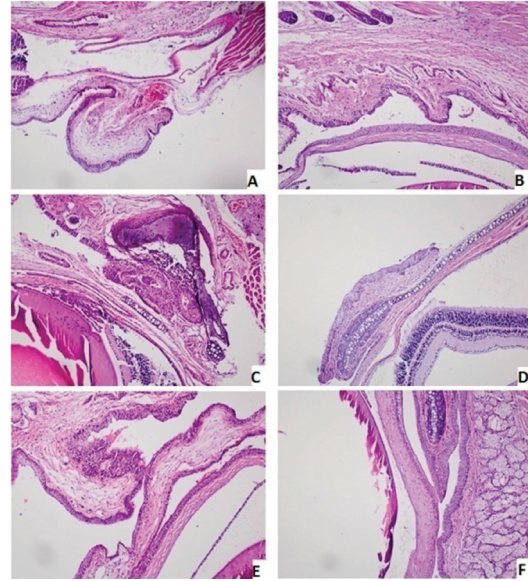
Bulbar ve palpebral konjonktivanın CXC reseptörü 3 ligandını içeren CD4+ enflamatuvar T hücrelerinin miktarı, akış sitometrisi ile belirlendi. CD4, CD8, CD45, CD25, CD16, CD56 ve CD3 bu hücrelerde ticari akış sitometri kitler (FITC, LS-C140363) kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Veriler ANOVA ile analiz edildi. Post-hoc analizlerde Tukey testi kullanıldı.

Bulgular

Elde edilen veriler Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir. Her gruptan elde edilen mikroskopik bulguların örnekleri Şekil 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. Histopatolojik bulgular (x100, H&E): A) Kontrol: Birkaç enflamatuvar hücre ve ödem, B) DKG Kontrol: Fokal hafif kronik enflamasyon, C) DKG+BSS: Yoğun kronik enflamasyon; D) DKG+FML: Fokal hafif kronik enflamasyon; E) DKG+TQ: Fokal hafif enflamasyon; F) DKG+Tween80: Hafif ila orta enflamasyon BSS: Dengeli tuz çözeltisi, DKG: Deneyisel kuru göz, FML: Florometalon, SD: Standart deviasyon, TQ: Timokinonun

Gözyaşı Salgı Miktarı

Tedavi öncesi ve sonrası ortalama gözyaşı salgı miktarı Tablo 1'de özetlenmektedir. Tedavi öncesi ve sonrası Schirmer sonuçları arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$). Tekrarlı ölçümler ANOVA analizi sağ gözde zaman etkisini doğruladı ($p = 0,019$), ancak sol gözde zaman etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,084$, $f = 3,190$). Ek olarak, her iki gözde zaman ve tedaviler arasındaki etkileşim anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Tekrarlı ölçümler testi, sağ gözde zamanın etkisini ve tedaviler ile etkileşimini doğrulandı (sırasıyla $p = 0,019$ ve $p < 0,001$), ancak bu anazilerin sonuçları sol gözde anlamlı bulunmadı ($p = 0,084$, $f = 3,190$). Post hoc testler, farklılıkların genellikle kontrol grubuna bağlı olduğunu gösterdi. Negatif kontrol grubunun ortalama gözyaşı salgı miktarı diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksekti.

Patoloji

Üst ve alt konjonktiva ve lakrimal bezden alınan doku örnekleri hematoksisilen ve eozin ve periyodik asit-Schiff ile boyandı ve enflamatuvar hücre yoğunluğu ve goblet hücre sayısı açısından değerlendirildi. DKG kontrol grubunda enflamatuvar hücre sayısı yüksek ve goblet hücresi sayısı düşüktü. Tedavi grupları arasında, FML ve TQ gruplarında, diğer gruplara kıyasla enflamatuvar hücre yoğunluğu daha düşük ve goblet hücresi sayısı daha yüksekti. Ancak, aradaki fark anlamlı değildi.

Pro-enflamatuvar Sitokinler

Konjonktival IL-1α, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10 ve laktoferrin seviyeleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Verilerin istatistiksel analizi, tedavilerin IL-1α ve IL-2 düzeyleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir

($p<0,001$). Ancak, tedavilerin IL-10 düzeyi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,065$, $F=2,353$). Post-hoc analizler, farkların genellikle DKG+Tween80 ve DKG+TQ gruplarından kaynaklandığını gösterdi. Özellikle DKG+TQ grubunda, IL-1 α düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. DKG+TQ grubunun ortalama IL-1 α düzeyi, negatif kontrol, DKG kontrol, DKG+BSS ve

DKG+FML gruplarına göre daha yüksekti (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,026$ ve $p=0,001$). Benzer şekilde, DKG+Tween80 grubunun ortalama IL-1 α düzeyi negatif kontrol, DKG kontrol ve DKG+FML gruplarından daha yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$ ve $p=0,003$). Bununla birlikte, DKG+BSS grubu ile karşılaştırıldığında, DKG+Tween80 grubunun ortalama IL-1 α düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,058$, %95 CI: -742,4975-71973,7275).

IL-2 düzeylerindeki fark yine DKG+Tween80 ve DKG+TQ grubundan kaynaklanmıştır. Tween80, kontrol grubu ve FML grubuna kıyasla IL-2 seviyelerinde önemli artışa neden oldu (sırasıyla $p=0,005$ ve $p=0,046$). Bununla birlikte, ortalama IL-2 düzeyi açısından BSS ve Tween80 grupları arasında fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,055$; %95 CI: -27,049-3637,399). DKG+Tween80 ve kontrol grupları arasında ortalama IL-2 düzeyi açısından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Bununla birlikte, IL-1 α 'da görülen benzer şekilde, TQ tedavisi, negatif kontrol, DKG kontrol, DKG+BSS ve DKG+FML gruplarına kıyasla ortalama IL-2 seviyelerinde önemli bir artışa neden oldu (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,044$, $p=0,008$ ve $p=0,006$).

IL-6, INF- γ ve laktoferrin seviyeleri de tedavi ile değişim gösterdi ancak aradaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Tween80 IL-6 değerlerinde artışa neden oldu, ancak bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,063$, %95 CI: -31,626-1,793,493).

Her grupta yer alan hayvanların çoğu için akış sitometri değerleri "aralık dışı" olduğu için, veriler istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Tartışma

Kuru göz hastalığı, toplumun büyük çoğunluğunu etkileyen sık görülen bir sağlık sorunudur. İleri yaşta ve Sjögren sendromu da dahil olmak üzere otoimmün hastalıklarda görülür. Ayrıca keratoplasti ve kemoterapiden sonra da görülebilir. Geçici ve palyatif yaklaşımların ötesinde hastalığı iyileştirici tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Bu nedenle kalıcı ve sürekli bir tedavi seçeneği araştırılmaya devam etmektedir. Deneysel kuru göz modelinde TQ'nin olası terapötik etkilerini araştırdık.

Gözyaşı filmi hacmini değerlendirmek için floresan boyama, rose Bengal boyama, fenol kırmızısı iplik testi, Schirmer testi,

Tablo 1. Tedavi öncesi ve sonrası Schirmer I testi ile ölçülen ortalama gözyaşı salgısı düzeyleri			
Gruplar	Schirmer I testi sonuçları (mm)		
	Ortalama $\pm$ SD (minimum - maksimum)		
	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	p değeri
Sağ göz			
Negatif kontrol	6,0 $\pm$ 1,0 (5,0-7,0)		
DKG kontrol	1,2 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	1,0 $\pm$ 0,0 (1,0-1,0)	0,175
DKG + BSS	1,0 $\pm$ 0,4 (1,0-2,0)	2,1 $\pm$ 0,4 (1,5-2,5)	0,002
DKG + FML	1,0 $\pm$ 0,5 (0,5-2,0)	2,0 $\pm$ 0,5 (1,5-3,0)	0,015
DKG + TQ	1,4 $\pm$ 0,4 (1,0-2,0)	2,9 $\pm$ 0,8 (2,0-4,0)	0,002
DKG + Tween80	1,2 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	1,8 $\pm$ 0,3 (1,5-2,0)	0,141
Sol göz			
Negatif kontrol	6,0 $\pm$ 1,0 (5,0-7,0)		
DKG kontrol	1,3 $\pm$ 0,4 (1,0-2,0)	1,0 $\pm$ 0,2 (0,5-1,0)	0,102
DKG + BSS	1,3 $\pm$ 0,4 (1,0-2,0)	2,0 $\pm$ 0,3 (1,5-2,5)	0,030
DKG + FML	1,1 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	2,0 $\pm$ 0,7 (1,0-3,0)	0,020
DKG + TQ	1,2 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	2,8 $\pm$ 0,7 (2,0-4,0)	0,003
DKG + Tween80	1,1 $\pm$ 0,2 (1,0-1,5)	1,9 $\pm$ 0,6 (1,0-2,5)	0,076
BSS: Dengeli tuz çözeltisi, DKG: Deneysel kuru göz, FML: Florometalon, SD: Standart deviasyon, TQ: Timokinon			

Tablo 2. Pro-enflamatuvar sitokinlerin ortalama düzeyleri						
Gruplar	Ortalama pro-enflamatuvar sitokin düzeyleri (ortalama $\pm$ SD)					
	IL-1 α (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	Laktoferrin (ng/mL)
Negatif kontrol	2903 $\pm$ 21	1825 $\pm$ 420	710 $\pm$ 284	519 $\pm$ 340	4418 $\pm$ 868	307 $\pm$ 35
DKG kontrol	6295 $\pm$ 3902	2825 $\pm$ 1040	1311 $\pm$ 913	578 $\pm$ 445	4235 $\pm$ 1975	479 $\pm$ 223
DKG + BSS	27846 $\pm$ 3229	2401 $\pm$ 542	987 $\pm$ 327	520 $\pm$ 543	3567 $\pm$ 932	408 $\pm$ 122
DKG + FML	13568 $\pm$ 1887	2353 $\pm$ 459	1204 $\pm$ 463	1706 $\pm$ 1272	3797 $\pm$ 727	367 $\pm$ 43
DKG + TQ	67470 $\pm$ 1843	4689 $\pm$ 1301	1279 $\pm$ 263	1104 $\pm$ 902	4147 $\pm$ 909	378 $\pm$ 31
DKG + Tween80	63461 $\pm$ 34348	4206 $\pm$ 1754	1591 $\pm$ 561	1407 $\pm$ 986	4491 $\pm$ 1637	432 $\pm$ 125
BSS: Dengeli tuz çözeltisi, DKG: Deneysel kuru göz, FML: Florometalon, SD: Standart deviasyon, TQ: Timokinonun, IL: İnterlökin						

gözyaşı menisküs yüksekliği ve TBUT gibi alternatif ölçüm teknikleri bulunmaktadır.²⁶ Klinik olarak, kuru gözü olan ve olmayan bireyleri güvenilir bir şekilde ayırt etmek için tek bir test yeterli değildir. Aköz gözyaşı salgı miktarını ölçmek için klinik uygulamada en yaygın kullanılan test Schirmer testidir. Klinik çalışmaların yanı sıra, insanlar ve hayvanlar ile yapılan deneysel çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Erkek Wistar sıçanlar²⁰ ve Victory tavşanlarında²⁷ kastrasyon ile indüklenen kuru göz modelinde topikal *Buddleja officinalis* ekstresinin gözyaşı salgı miktarına etkilerini değerlendiren çalışmalarda, tedavi verilmeyen kontrollere göre Schirmer değerlerinde belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *B. officinalis* ekstresinin damlatılması, lakrimal bezlerde TNF- α ekspresyonunu azaltırken, TGF- β ekspresyonunda belirgin bir artışa neden olmuştur. Başka bir deyişle, *B. officinalis* ekstresi ayrıca anti-enflamatuvar etkilere sahiptir.²⁷

TQ'nun enflamatuvar sitokinler üzerindeki beklenmedik şekilde düşük etkisinin bir nedeni korneal biyoyaralanım olabilir. Çeşitli oküler hastalıkların tedavisinde en yaygın ve kabul edilebilir yol topikal uygulamadır. Ancak, oftalmik ilaç uygulamasında ana problem, lakrimal sekresyon, nazolakrimal drenaj ve kötü korneal permeabilite gibi anatomik kısıtlamalardan kaynaklanan pre-oküler alandan hızlı ilaç eliminasyonudur. Sonuç olarak, sadece küçük miktarda ilaç (%1-%10) korneadan göz içi dokulara geçer.²⁸ TQ'nun lipofilik bir madde olduğu bilinmektedir. Hızlı ve yeterli penetrasyon elde edebilmek için, ilacın moleküler yapısının optimal bir lipofilik/hidrofilik dengeye sahip olması gerekir.²⁸ TQ'nun kornea penetrasyonunu arttırmak için Tween80'i çözücü olarak kullandık.

Yakın zamanda lipid nanopartiküller, oftalmik uygulama için en popüler ilaç taşıyıcı sistemleri arasında önemli düzeyde ilgi görmüştür. Lipit nanopartiküllerinin birinci ve ikinci jenerasyonu olarak kabul edilen sırasıyla katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC), ilaçların yüzeyde kalma süresini uzatma, sistemik emilimi ve uygulama sıklığını azaltma ve ilaçların biyoyaralanımını artırma özellikleri nedeniyle ümit verici taşıyıcılar olarak ortaya çıkmışlardır.²⁸ Tween80 yerine SLN'ler veya NLC'ler, biyoyaralanımı artırarak TQ'nun etkinliğini artırabilirler.

Bir çalışmada, sıçan kornea neovaskülarizasyonu modelinde TQ'nun kortikosteroidlerle karşılaştırılabilir bir inhibitör etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir.⁸ Bu inhibisyon doza bağlıdır ve tam olarak bilinmese de antioksidan, anti-enflamatuvar ve immün düzenleyici faktörler yoluyla ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada, Tween80, kornea dokusundan geçişini kolaylaştırmak için toz formundaki TQ'yu çözmek için kullanılmıştır. TQ-Tween80 süspansiyonunu Erdurmuş ve ark.⁸ tarafından daha önce tarif edilen şekilde hazırlandı. Diğer kimyasal maddeler ile kontaminasyon, nem ve sıcaklık gibi kontaminasyon gibi farklı çevresel faktörler, TQ-Tween80 süspansiyonunun konsantrasyonunu ve saflığını değiştirebilir. TQ'nun anti-enflamatuvar etkilerinin beklenmedik şekilde düşük olmasının nedeni ile süspansiyonun saf olmaması olabilir. Ayrıca, bu durum oküler yüzeyde irritasyona neden olmuş olabilir

ve aynı zamanda enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokin düzeylerini değiştirmiş olabilir. Çalışmamızda Erdurmuş ve ark.'nın⁸ kornea neovaskülarizasyonu tedavisinde kullandığı doz olan %0,4 konsantrasyon kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan bu doz KGH tedavisi için çok yüksek olabilir ve olumsuz toksik ve enflamatuvar etkilere neden olmuş olabilir.

Kuru gözdeki patofizyolojik mekanizmaları modellemek için farklı hayvan modelleri geliştirilmiştir.²⁹ Her birinin kendine özgü özellikleri ve sınırlamaları vardır, ancak hiçbirisi insan kuru gözünün patojeneziyle tam olarak örtüşmemektedir. BAK göz damlalarında yaygın olarak kullanılan iyi bilinen bir prezervandır ve uzun süredir kuru göz sendromu için potansiyel bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir çünkü ciddi oküler yüzey enflamasyonuna neden olmaktadır. Kuru gözde enflamasyonun önemli rol oynadığı iyi bilindiğinden, BAK ile indüklenen fare modeli, özellikle oküler yüzey enflamasyonunda anti-enflamatuvar ajanların terapötik etkilerini değerlendiren çalışmalar için uygun görünmektedir. Xiong ve ark.²⁵ tarafından tanımlanan %0,2 BAK ile indüklenen kuru göz modelini kullanmayı tercih ettik.

Onizuka ve ark.³⁰, çalışmalarında BAK ile indüklenen akut kornea epitel toksisitesini modüle eden oftalmik katkı maddelerini araştırmışlardır. Hücre proliferasyon testi tavşan kornea epitel hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Korneal hasar taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Test edilen katkı maddelerinden sadece Tween80, BAK ile indüklenen sitotoksitesiyi önlemiştir. Tween80 ile %0,02 BAK'nin neden olduğu kornea epitel bariyer fonksiyon bozukluğu önemli ölçüde azalmıştır. Çalışmamızda, sadece Tween80 ile tedavi edilen grupta, TQ grubundan daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Çok yüksek TQ konsantrasyonu veya çevre kaynaklı kontaminasyon TQ grubundaki beklenmedik sonuçlara neden olmuş olabilir. Ancak, enflamatuvar sitokin düzeylerinin Onizuka ve ark.'nın³⁰ sonuçlarını destekler şekilde düşük olduğunu bulduk.

Tween80'in yukarıda belirtilen kornea epitel hücreleri üzerindeki olumlu etkisine rağmen, Tween80'in bazı anafilaktik reaksiyonları da neden olabilmektedir. İlaça bağlı anafilaktik reaksiyonu *in vitro* ve konvansiyonel hayvan modellerinde araştırmak güçtür ancak, Yang ve ark.³¹, anafilaktik reaksiyonu değerlendirmek için mikropilaka tabanlı kantitatif *in vivo* zebra balığı analizini geliştirmiştir ve canlı zebra balığında mast hücresi triptazı aktivitesi kantitatif olarak ölçmüştür. Tween80'nin kendisinin değil ancak Tween80 örneklerini kontamine eden okside yağ asiti kalıntılarının anafilaktik reaksiyona neden olabileceği sonucuna varmışlardır.

IL-6, enflamatuvar ve alerjik yolların aracılardan biridir. Atopik keratokonjonktivit hastalarına havada uçan alerjenlerle konjonktival provakasyon yapıldığında, provokasyondan 48 saat sonra gözyaşı sıvısında IFN- γ , IL-6 ve IL-10 düzeylerinin anlamlı şekilde yükseldiği bildirilmiştir.³² Sonuçlarımız Tween80 grubunda IL-6 düzeylerinde diğer gruplara kıyasla belirgin bir artış olduğunu gösterdi. Ancak Tween80 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, IL-6 değerlerinde anlamlı artışa görülmedi ($p=0,063$, %95 CI: -31,626-1,793,493).

TQ'nun, iyi bilinen anti-enflamatuvar^{17,18} ve antioksidan^{19,20} etkilerine dayanarak, lokal enflamasyon ve gözyaşı salgısını olumlu yönde etkilemesi beklenmiştir. TQ'nun kuru göz ve ilişkili enflamatuvar süreçler üzerindeki etkileri biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle değerlendirildi.

Verilerimize göre, gözyaşı salgı miktarı göz önüne alındığında yapay gözyaşı tedavilerinin kısmi olumlu etkisi vardır. Patolojik incelemede TQ tedavisi ile enflamasyonda azalma gözlemlendi, ancak enflamasyon kaskadındaki değişkenler için kontrollerle karşılaştırıldığında, TQ grubunda sistemik enflamasyonu işaret edebilen IL-1 α ve IL-2 düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür.³³ Bunun nedenlerinden biri maddenin oküler yüzeyde kullanım için uygun olmaması olabilir. Dikkatlice incelendiğinde, benzer bulguların Tween80 ile ortaya çıktığı görülebilir. Bu çalışmada kullanılan TQ veya Tween80, gözde kullanım için yeterince saf olmayabilir; çözeltideki pirojenler enflamasyonu tetiklemiş ve bu sebeplerle TQ'nun gözyaşı sekresyonunda neden olacağı iyileşmeyi sınırlandırmış olabilir. Diğer bir neden, TQ'nun gerekenden daha düşük bir dozda uygulanmış olması olabilir. Topikal TQ uygulaması, patolojik olarak enflamasyonu azaltmaya yardımcı olmuştur, ancak sistemik enflamasyonu azaltmak için yeterli olmayabilir. Bu çalışma, bu ilişkileri inceleyen daha ileri çalışmalar için bir temel oluşturabilir.

Sonuç

Bu çalışmada kullanılan yöntem, BALB/c farelerinde efektif olarak deneysel kuru göz modeli oluşturmuştur. Patoloji sonuçlarımız FML ve TQ ile tedavi edilen gruplarda enflamatuvar hücre yoğunluğunun daha düşük olduğunu göstermiş ve TQ'nun gözde anti-enflamatuvar bir etki gösterebileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, TQ sitokin seviyelerinde anlamlı bir azalma ile ilişkili bulunmamıştır.

Bilgilendirme

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiş, laboratuvar testleri de Adnan Menderes Üniversitesi laboratuvarlarında yapılmıştır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için Yerel Hayvan Etik Kurulu tarafından onay alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: Tolga Kocatürk, **Dizayn:** Tolga Kocatürk, Erol Erkan, Muharrem Balkaya, **Veri Toplama veya İşleme:** Tolga Kocatürk, Erol Erkan, İbrahim Meteoglu, Mehmet Ekici, Aslıhan Karul Büyüköztürk, **Analiz veya Yorumlama:** Tolga Kocatürk, Erol Erkan, İbrahim Meteoglu, Mehmet Ekici, Aslıhan Karul Büyüköztürk, İrfan Yavaşoglu, Harun Çakmak, Volkan Dayanır, Muharrem Balkaya, **Literatür Arama:** Tolga Kocatürk, Erol Erkan, İbrahim Meteoglu, Mehmet Ekici,

Aslıhan Karul Büyüköztürk, İrfan Yavaşoglu, Harun Çakmak, Volkan Dayanır, Muharrem Balkaya, Yazan: Tolga Kocatürk, Erol Erkan, Muharrem Balkaya.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Araştırma projesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklendi (TÜBİTAK; program kodu: 1002, proje numarası: 214S539).

Kaynaklar

1. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol*. 2001;76:45-48.
2. Barabino S, Rolando M, Camicio P, Ravera G, Zanardi S, Giuffrida S, Calabria G. Systemic linoleic and gamma-linolenic acid Systemic therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea*. 2003;22:97-101.
3. Bourcier T, De Saint-Jean M, Brignoli F, Goguel A, Baudouin C. Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:120-126.
4. Brignoli F, Piselli PJ, Desaint Jean M, Goldschild M, Goguel A, Baudouin C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:90-95.
5. No authors listed. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells in patients with dry eyes. Brignole F, pisella P-J, goldschild M, De saint jean M, goguel A, baudouin C.* *invest ophthalmol vis sci* 2000;41:1356-1363. *Am J Ophthalmol*. 2000;130:385.
6. Burits M, Bucur F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res*. 2000;14:323-328.
7. Al-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shimizu T, Matsuyama H, Nikami H, Takewaki T. Macrophage-derived cytokine and nitric oxide profiles in type I and type II diabetes mellitus: effect of thymoquinone. *Acta Diabetol*. 2005;42:23-30.
8. Erdurmuş M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IE, Turkmen C, Aydın B, Karadag R. Inhibitory Effects of Topical Thymoquinone on corneal neovascularisation. *Cornea*. 2007;26:715-719.
9. Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:337-342.
10. Gunduz K, Ozdemir O. Topical cyclosporine in the treatment of keratoconjunctivitis sicca secondary to Sjogren's syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1994;72:438-442.
11. Halestrap AP, Conner CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 1997;174:167-172.
12. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibited eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation in. *Planta Med*. 1995;61:33-36.
13. Kruk I, Michalska T, Lichszeld K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*. 2000;41:1059-1064.
14. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:330-337.
15. Lemp MA. Report of the National Eye Institute / Industry Workshop on clinical trials in dry eyes. *CLAO J*. 1995;21:221-232.
16. Lin Z, Liu X, Zhou T, Wang Y, Bai L, He H, Liu Z. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis* 2011;25:257-264.
17. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. *Ophthalmology*. 1999;106:811-816.

18. Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P, Vanek T. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1 and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* 2005;71:739-742.
19. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000;47:119-125.
20. Peng QH, Yao XL, Wu QL, Tan HY, Zhang JR. Effect of extract of *Buddleja officinalis* eye drops on androgen receptors of lacrimal gland cells of castrated rats with dry eye. *Int J Ophthalmol.* 2010;3:43-48.
21. Galina-Muhtasib H, Roessler A, Schneider-Stock R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1249-1253.
22. Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy of dry eye. *Ocul Surf* 2003;1:31-36.
23. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Zi Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of HLA-B*27:05 transgenic mice with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19:201-211.
24. Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation of dry eye. *Ocul Surf.* 2004;2:124-130.
25. Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, Liang X, Ma P, Ye C, Ge J, Wang Z. A rabbit dry eye model induced by topical medication of the preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1850-1856.
26. Bayhan HA. Comparison of Lissamine Green and Rose Bengal in Dry Eye Diagnosis and Correlation Between Patient Symptoms and Clinical Tests - Original Article. *Turk J Ophthalmol.* 2010;40:29-33.
27. Yao XL, Peng QH, Peng J, Tan HY, Wu QL, WI DL, Chen M, Li CK, Li D, Zhu HA. Effects of extract of *Buddleja officinalis* on partial inflammation of lacrimal gland in castrated rabbits with dry eye. *Int J Ophthalmol.* 2010;3:114-119.
28. Liu R, Liu Z, Zhang C, Zhang B. Nanostructured lipid carriers as novel ophthalmic delivery system for mangiferin: improving in vivo ocular bioavailability. *J Pharm Sci.* 2012;101:3833-3844.
29. Chen W, Zhang X, Zhang J, Chen J, Wang S, Wang Q, Qu J. A murine model of dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1386-1391.
30. Onizuka N, Uematsu M, Kusano M, Sasaki H, Suzuma K, Kitaoka T. Influence of different additives and their concentrations on corneal toxicity and antimicrobial effect of benzalkonium chloride. *Cornea.* 2014;33:521-526.
31. Yang R, Lao QC, Yu HP, Zhang Y, Liu HC, Luan L, Sun HM, Li CQ. Tween-80 and impurity induce anaphylactoid reaction in zebrafish. *J Appl Toxicol.* 2015;35:295-301.
32. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: The interaction between the ocular surface and the lacrimal glands. *Cornea.* 1998;17:584-589.
33. Utine CA, Akpek EK. Immunopathology of Sjögren's Syndrome and Associated Dry Eye Syndrome - Review. *Turk J Ophthalmol.* 2010;40:97-106.