



Farelerde Deneysel Alerjik Konjonktivit Modeli Oluşturulması

Development of an Allergic Conjunctivitis Model in Mice

Tolga Kocatürk*, Özlem Kocatürk*, Ahmet Kaplan***, Harun Çakmak, İbrahim Meteoglu**, Volkan Dayanır

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

*Atatürk Devlet Hastanesi, Anestezi ve Reanimasyon Kliniği, Aydın, Türkiye

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

***Kars Devlet Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Kars, Türkiye

Özet

Amaç: Alerjik hastalıkların fizyopatogenezinin daha iyi anlaşılması ve yeni ilaçların geliştirilmesi için yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere insandaki alerjik konjonktiviti simüle eden bir hayvan modeli geliştirmek.

Gereç ve Yöntem: On iki erkek Balb/c fare, her birinde 6 fare bulunan 2 gruba ayrıldı. Duyarlılaştırma için, Grup 1'deki farelere, birinci ve sekizinci günlerde, 5mg/ml ovalbümin (OVA) ve 15mg/ml alüminyum hidroksit karışımının 0,2 ml'lik solüsyonu; Grup 2'deki farelere ise 0.2 ml'lik salin solüsyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi. Deneysel alerjik konjonktiviti indüklemek için, Grup 1'deki farelerin gözlerine OVA solüsyonu (5mg/ml) ile 15. ve 18. günlerde antijen uyarımı (challenge) yapılırken; Grup 2'deki farelerin gözlerine ise Human Balanced Salt Solution damlatıldı. Klinik inceleme için konjonktival ödem, palpebral ödem, konjonktival hiperemi ve sulanma değerlendirildi. Histopatolojik inceleme için eksize edilen göz küreleri, göz kapakları ve lakrimal glandları, doku laboratuvarının rutin prosesine uygun olarak hazırlandı. Hematoksilin-Eozin ve Toluidin Blue boyamalarına ek olarak Mast-hücre triptaz ile Labeled Streptavidin-Biotin amplifikasyon yöntemi ve 3,3'-diaminobenzidine kullanılarak immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı.

Sonuçlar: Grup 1'deki farelerin gözlerinde belirgin olarak palpebral ve konjonktival ödem olduğu, sulanma ve konjonktival hiperemi ortaya çıktığı gözlemlendi. Grup 2 (5,58±3,12) ile karşılaştırıldığında, subkonjonktival dokuyu infiltrate eden ortalama mast hücre yoğunluğu hücre/mm2 olarak, anlamlı olarak Grup 1'de (alerji grubu, 23,17±7,46, p<0,0001) yüksek bulundu. Her iki grupta da subkonjonktival dokuda eozinofil ve lenfosit sayısında ve vasküler yoğunlukta artış izlenmedi.

Tartışma: Geliştirilen fare modeli insandaki alerjik konjonktivite klinik ve patofizyolojik açıdan benzerlik göstermektedir ve yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir. (*Türk J Ophthalmol* 2012; 42: 418-22)

Anahtar Kelimeler: Alerjik konjonktivit, fare modeli, ovalbümin (OVA)

Summary

Purpose: To develop an animal model that simulates human allergic conjunctivitis to understand the physiopathogenesis of allergic diseases and for developing novel therapeutic interventions.

Material and Method: BALB/c mice (12 males) were divided into two groups each comprised of six mice. For sensitization, on the 1st and 8th days, a 0.2 ml mixed solution, adjusted to a concentration to 5mg/ml of ovalbumin (OVA) and 15mg/ml of aluminium hydroxide, was administered intraperitoneally to the mice in Group 1 and 0.2 ml saline solution to the mice in Group 2. To induce experimental allergic conjunctivitis, an antigen challenge was made on days 15 and 18, using an OVA solution (5mg/ml) instilled into both eyes of the mice in Group 1; while the mice in Group 2 received Human Balanced Salt Solution instead of OVA. For the clinical evaluation, the occurrence of conjunctival and palpebral oedema, conjunctival hyperaemia, and lacrimation were observed. For the histological examination, eyeballs, eyelids, and lacrimal glands were removed and prepared according to the routine processing method of the tissue laboratory. Immunohistochemical examination was made with mast cell tryptase using the labeled streptavidin-biotin amplification method and 3,3'-diaminobenzidine, in addition to hematoxylin-eosin (HE), and toluidine blue (TB) staining.

Results: Evident conjunctival oedema, palpebral oedema, conjunctival hyperaemia, and lacrimation were observed in Group 1. Mean mast cell density in cells/mm2, infiltrating the subconjunctival tissue was significantly high in Group 1 (allergy group, 23.17±7.46, p<0.0001) when compared to Group 2 (5.58±3.12). There was no increase in eosinophil and lymphocyte counts as well as vascular intensity in the subconjunctival tissue in any group.

Discussion: The murine model developed is similar to the human allergic conjunctivitis both clinically and histopathologically and can be used as a template for future studies. (*Türk J Ophthalmol* 2012; 42: 418-22)

Key Words: Allergic conjunctivitis, mouse model, ovalbumin (OVA)

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

Tel.: +90 256 444 12 56 Gsm: +90 533 344 41 11 E-posta: tolgakocaturk@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received: 11.05.2012 **Kabul Tarihi/Accepted:** 23.08.2012

Giriş

Bunun yerine “Genel popülasyonun yaklaşık %20’sinde alerjik semptomlardan en az biri mevcuttur. Bunların ise yaklaşık olarak 1/3’ü de oküler semptomlardır. Bazı göz alerjileri oldukça ciddi semptomlara neden olur ve ciddi göz hastalığıyla sonuçlanır. Alerjik rinokonjonktivit, en yaygın alerjik göz hastalığıdır.¹ Sıklıkla ailede alerji öyküsü vardır. Bireyin kendisinde de başka alerjik hastalıklar olabilir (astma gibi). Alerjiye yatkın bireylerde, havada varolan antijenler (alerjenler) konjonktivaya ve/veya nazal mukozaya temas ederek, tip 1 hipersensitivite reaksiyonunu (lokal anaflaksi) stimüle ederler. Çalışmamızda farelerde deneyisel alerjik konjonktivit modeli oluşturulması ve bu modelin ileride yapılacak çalışmalarda kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya 8-12 haftalık 12 erkek Balb/c fare dahil edildi. Fareler Adnan Menderes Üniversitesi Farmakoloji Departmanı’ndan temin edildi. Bütün farelere, araştırmalarda kullanılacak deney hayvanları ile ilgili olarak, Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) kurallarına uygun biçimde davranıldı ve bakım verildi. Fareler; alerji grubu (pozitif kontrol) ve negatif kontrol grubu olmak üzere, sırasıyla Grup 1 ve 2 olarak adlandırılarak 2 gruba ayrıldı. Her grupta 6 fare bulunmaktaydı. Deneyisel alerjik konjonktivit fare modelinin oluşturulması Tablo 1’de gösterilmiştir.



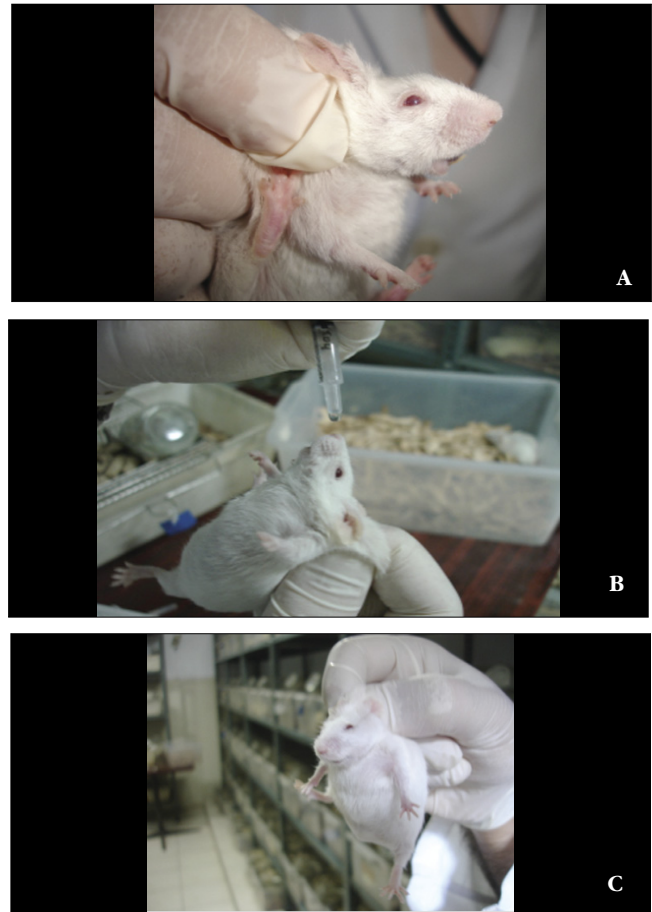
Resim 1. Duyarlılaştırma için yapılan intraperitoneal OVA enjeksiyonunda farenin pozisyonu ve uygulama yöntemi görülmektedir

Duyarlılaştırma

Tablo 1’de anlatıldığı gibi; duyarlılaştırma için, Grup 1’deki farelere, birinci ve sekizinci günlerde 5mg/ml ovalbümin (OVA) ve 15mg/ml alüminyum hidroksit karışımının 0,2 ml’lik solüsyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi (Resim 1). Grup 2’deki farelere ise 0,2 ml’lik salin solüsyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Antijen Uyarımı

Deneyisel alerjik konjonktiviti indüklemek için, Grup 1’deki farelerin gözlerine OVA solüsyonu (5mg/ml) ile 15. ve 18. günlerde antijen uyarımı (challenge) yapıldı (Resim 2). Grup 2’deki farelerin gözlerine ise Human Balanced Salt Solution (HBSS) uygulandı.



Resim 2. A, Antijen uyarımı için göze OVA damlatılması için farenin tutuş pozisyonu; B, damlatılması; C, damlatıldıktan sonra farenin gözünün ıslak olduğu ve gözünü kıstığı görülmektedir

Tablo 1. Duyarlılaştırma, gruplar için antijen uyarımı (challenge) protokolü

	SS*+OVA† IP‡	SS IP	HBSS# +OVA T**	HBSS T
Grup 1 (n=6)	+	—	+	—
Grup 2 (n=6)	—	+	—	+

* – Salin solüsyonu; † – Ovalbümin; ‡ – İntraperitoneal; # – Human Balanced Salt Solution; ** – Topikal

Klinik Değerlendirme

Antijen uyarımından 20 dakika sonra, farelerin hangi gruplarda olduğunu bilmeyen bir gözlemci tarafından, farelerin klinik durumları değerlendirildi ve konjonktivit olup olmamalarına bakıldı. Klinik olarak; konjonktival ödem, palpebral ödem, konjonktival hiperemi ve sulanma olmak üzere dört ana kriter değerlendirildi.

Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik incelemeler tek kör olarak gerçekleştirildi. Farelerin gözlerine 18. günde uygulanan son doz OVA solüsyonu damlatıldıktan 12 saat sonra, tiyopentotan sodyum (Pentothal Sodium; Abbott Laboratories Inc.) ile sakrifikasyonu takiben bütün gruplardaki farelerin göz küreleri, göz kapakları ve lakrimal glandları çıkarıldı. Her farenin bir gözü histopatolojik değerlendirme için; diğer gözü ise moleküler biyolojik inceleme için kullanıldı.

Bütün örnekler, doku laboratuvarının olağan akışına uygun olarak, %10'luk nötral tamponize formol ile sabitlendi ve parafine gömüldü. Hematoksilin-Eozin (HE) ve Toluidin Blue (TB) işlemlerine ek olarak Mast-hücre triptaz boyaması için kullanıma hazır olan 4-µm kalınlığındaki yapışkanlı cam slaytların (MicroSlides Snowcoat X-tra; Surgipath, Richmond, IL, USA) üzerine yerleştirildi.

İmmünohistokimyasal incelemeye, labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) amplifikasyon yöntemini ve kromojen (Histostain-Plus kits, cat.no. 85-9643; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kullanan ticari olarak elde edilebilir bir tarama kiti ile devam edildi.

Kesitler, Mast-hücre triptaza karşı oluşturulmuş olan fare anti-insan monoklonal antikorları kullanılarak incelendi. Kesitler ksilen içinde deparafinize ve derecelenmiş etanol solüsyon serilerinde dehidrate edildikten sonra 0,01 M sodyum sitrat tamponunda 20

dakika mikrodalga antijen gerialımına tabi tutuldu. Endojen peroksidaz aktivitesi, 15 dakikalık %3'lük hidrojen peroksit ile inhibe edildi. Tris-buffered salin (TBS; pH 7,6) içinde yıkandıktan sonra, kullanıma hazır solüsyon kiti ile 10 dakika serum blokajı gerçekleştirildi. Kesitler, 1 saat boyunca, primer antikor ile inkübe edildi, TBS içinde yıkandı; biotinlenmiş sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi ve tekrar TBS ile yıkandı. DAB ile ve hematoksilin ile hafif zıt boyanmaya uğrayan kesitlerin inkübasyonu ile bağlanma görünür hale getirildi.

HE, TB ve immünohistokimyasal boyanan örneklerin hepsi ışık mikroskobu (Olympus BX50, Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) altında incelendi. Subkonjonktival doku, mast hücreleri, eozinofiller, lenfositler ve vasküler yoğunluk açısından 40x güç altında, 50 farklı bölgede basit mikrometrik 10x10 grid disk kullanılarak incelendi.

İstatistiksel Analiz

Farklı gruplardaki hücre yoğunluklarını karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi uygulandı. 0,05'den küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Duyarlılaştırma ve antijen uyarımı sonrasında, klinik açıdan da incelenen farelerin gözlerini ovuşturdukları gözlemlendi. Ayrıca, Grup 2 ile karşılaştırıldığında, Grup 1'deki farelerde belirgin olarak palpebral ve konjonktival ödem olduğu, oküler sekresyon ve konjonktival hiperemi ortaya çıktığı gözlemlendi. Grup 2'deki farelerde ise bu bulguların hiç biri yoktu.

Grup 1 ile karşılaştırıldığında ($23,2 \pm 7,5$ hücre/mm²), subkonjonktival dokuyu infiltre eden ortalama mast hücre yoğunluğu Grup 2'den ($5,6 \pm 3,1$ hücre/mm²) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu. ($p < 0,0001$), (Şekil 1, Tablo 2, Resimler 3, 4 ve 5). Hiçbir grupta, subkonjonktival dokuda

Tablo 2. Subkonjonktival dokuyu infiltre eden ortalama mast hücre yoğunluğu Grup 1 (pozitif kontrol) ile karşılaştırıldığında ($23,2 \pm 7,5$ hücre/mm²), Grup 2 (negatif kontrol)'de ($5,6 \pm 3,1$ hücre/mm²) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$)

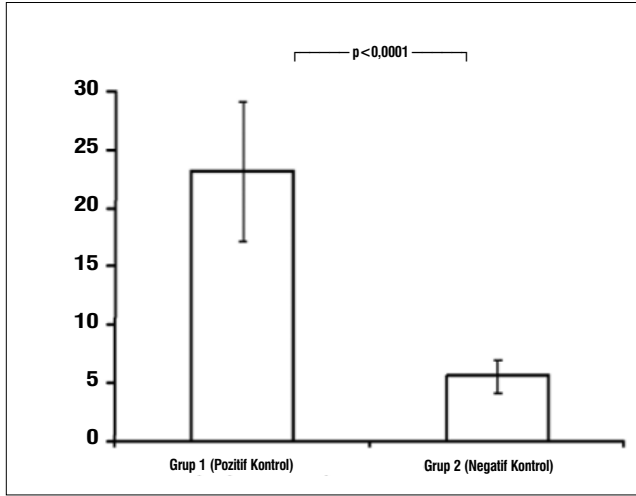
Fareler	Grup 1 (Pozitif kontrol)	Fareler	Grup 2 (Negatif kontrol)
1. fare OD	28	7. fare OD	5
1. fare OS	26	7. fare OS	2
2. fare OD	28	8. fare OD	3
2. fare OS	32	8. fare OS	2
3. fare OD	11	9. fare OD	8
3. fare OS	12	9. fare OS	8
4. fare OD	23	10. fare OD	9
4. fare OS	30	10. fare OS	12
5. fare OD	29	11. fare OD	6
5. fare OS	27	11. fare OS	4
6. fare OD	18	12. fare OD	5
6. fare OS	14	12. fare OS	3
	$23,2 \pm 7,5^*$		$5,6 \pm 3,1^*$

* – Ortalama ± Standart Deviasyon

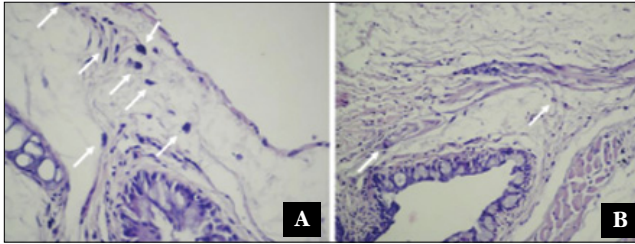
eozinofil ve lenfosit sayısında ve vasküler yoğunlukta artış izlenmedi. Deney, her grup için 4'er fare kullanılarak ikinci kez tekrar edildi ve benzer sonuçlar elde edildi.

Tartışma

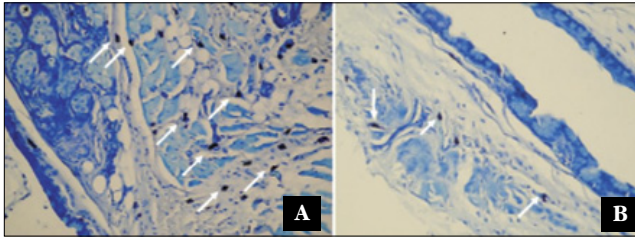
Akut ve kronik alerjik konjonktivitlerin her ikisi de dünya genelinde oldukça yaygındır.² Alışılmış tıbbi yaklaşım, ilk aşama olarak topikal anti-histaminik ilaç kullanmak; gerekirse topikal kortikosteroid eklemektir. Ancak, kortikosteroidlerin özellikle kronik kullanımı, katarakt ve glokom gibi iyi bilinen yan etkilerin gelişmesine neden olabilir.



Şekil 1. Konjonktival dokularda, mast hücre infiltrasyonu. Grup 1 (pozitif kontrol) ve Grup 2 (negatif kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$). Çubuklar standart deviasyonu gösteriyor



Resim 3. Konjonktivanın histopatolojik kesitlerinde [Hematoksilen-Eozin (HE), x40] subkonjonktival dokuda mast hücreleri (oklar) izleniyor. Grup 1 (pozitif kontrol), A; Grup 2 (negatif kontrol), B



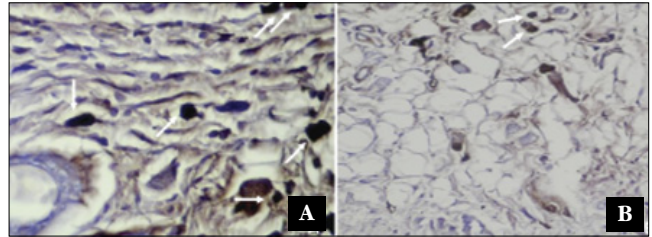
Resim 4. Konjonktivanın histopatolojik kesitlerinde [Toluidin Blue (TB), x40] subkonjonktival dokuda mast hücreleri (oklar) izleniyor. Grup 1 (pozitif kontrol), A; Grup 2 (negatif kontrol), B

Oluşturduğumuz modelde farelerde belirgin olarak palpebral ve konjonktival ödem olduğu, oküler sekresyon ve konjonktival hiperemi ortaya çıktığı gözlemlendi. Konjonktival dokularda, mast hücre infiltrasyonu yönünden Grup 1 (pozitif kontrol) ve Grup 2 (negatif kontrol) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi. Subkonjonktival dokuyu infiltre eden ortalama mast hücre yoğunluğu Grup 1 (pozitif kontrol) ile karşılaştırıldığında ($23,2 \pm 7,5$ hücre/mm²), Grup 2 (negatif kontrol)'de ($5,6 \pm 3,1$ hücre/mm²) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$).

Alerjik göz hastalığında alınan konjonktival biyopsi çok sayıda metakromatik olarak boyanmış mast hücresi ile karakterizedir.³ Doku mast hücreleri, Tip 1 hipersensitivite reaksiyonunda majör rolü oynamaktadır. İmmünohistokimyasal işaretleyici olarak kullanılan nötral proteaz ve triptaz varlığında, bütün alerjik hastalık tiplerinde, Ig E aracılı mast hücre aktivasyonunu işaret eden bir durum olarak, mast hücre sayılarının arttığı görülmüştür.⁴⁻⁶ Mast hücresi, akut reaksiyonun tetikleyicisi olarak ve aktivasyonun geç faz cevabı ile devam etmesini sağlayarak, alerjik göz hastalığı mekanizmasının merkezinde yer alır. Buna ek olarak, mast hücreleri, alerjik göz hastalığındaki multifonksiyonel rolleri olan sitokinlerin önemli bir kaynağıdır; bu da mast hücrelerinin alerji mekanizmalarında merkezi bir göreve sahip olduklarını işaret eder. Mast hücrelerinin degranülasyonları sadece "mevsimsel alerjik konjonktivit" ani semptomlarından sorumlu olmayıp, aynı zamanda oküler alerjinin bütün tiplerindeki konjonktival inflamasyonun hızlı bir şekilde up-regüle edilmesini de sağlayan depolanmış sitokinlerin Ig E aracılı salınımlarına da öncülük eder.⁷

Eozinofil, gözdeki alerjik hastalık sürecine katkıda bulunan diğer bir hücredir. Shoji ve ark.⁸ deneysel fare alerjik konjonktivit modelinde, topikal deksametazon ve FK506 tedavilerinin her ikisinin de, eozinofillerin ve lenfositlerin subkonjonktival dokuya infiltrasyonu suprese etmede etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Oysa, bahsedilen çalışmada oluşturulan akut alerji modelinde geç dönemde arttıkları bilinen eozinofillerin ve lenfositleri artması zaten beklenen bir sonuç değildir.

Akut alerjik konjonktival hastalık, bizim çalışmamızda olduğu gibi, mast hücrelerinin infiltrasyonu ile karakterizedir, eozinofillerin veya lenfositlerin değil.⁹⁻¹² Ancak, mast hücrelerinin varlığı, alerjik göz hastalığının güçlü bir belirtici olmasına rağmen; konjonktival sürüntü sitolojisinde olmamaları alerjik hastalığı ekarte ettirmez.¹³ Atopik olmayan bireylerin



Resim 5. Konjonktiva dokusunun Mast-hücre triptaz (oklar) ile immünohistokimyasal boyanması (x40). Grup 1 (pozitif kontrol), A; Grup 2 (negatif kontrol), B

normal konjonktiva epitelinde eozinofiller bulunmaz¹³, ancak vernal keratokonjonjivit olarak bilinen kronik alerjik göz hastalığında konjonktiva epitelinde, subepitelinde ve gözyaşında sayıları çok yüksek değerlere ulaşabilir.¹⁴ Mast hücreler tarafından üretilen, platelet aktive edici faktör ve anafilaksinin eozinofilik kemotaktik faktörü, her ikisi de, mast hücrelerinden daha sonra sürece katılacak olan eozinofiller için kemotaktiktir. Bu nedenle, eozinofillerin akut fazda görülmesi beklenmez; daha çok alerjik konjonjivitinin kronik fazında görülmeleri beklenir. Benzer biçimde, bizim çalışmamızda da, eozinofillerde, lenfositlerde veya subkonjonktival dokudaki vaskülarizasyonda artış gözlenmemiştir.

Histaminin konjonktiva üzerindeki, IL-1, IL-6 ve IL-8 üretiminin, ve intraselüler adezyon molekülü-1'in ekspresyonunun indüklenmesiyle oluşturduğu, proinflamatuvar etkisinin, histamin salınımının inhibisyonu ile devam etmesi engellenir.¹⁵

Friedlaender'ın¹⁶ da çalışmasında tariflediği gibi; alerjik sürecin akut fazı ile ilintili olarak görülen klinik durumlardan, farelerin gözlerini ovuşturduklarını, palpebral ve konjonktival ödem oluştuğunu, oküler sekresyon ve konjonktival hiperemi ortaya çıktığını gözlemledik.

Histopatolojik olarak ise tıpkı insanlarda olduğu gibi; subkonjonktival dokuyu infiltrate eden ortalama mast hücre yoğunluğunda artış oldu. Bonini ve ark.'nın¹⁷ rapor ettiği gibi geç dönemde görülmesi gereken subkonjonktival dokuda eozinofil ve lenfosit sayısında ve vasküler yoğunlukta artış izlenmedi.

Farelerde oluşturduğumuz deneysel akut alerjik göz hastalığı modelinin insanlarda görülen alerjik göz hastalığı ile klinik ve patofizyolojik açıdan aynı cevapları verdiği görülmektedir. Ülkemizde alerjik konjonjivit ile ilgili çok değerli çalışmalar mevcuttur.^{18,19} Modelimizi hazırlarken, üniversitemizde ve diğer araştırma merkezlerinde gelecekte yapılacak olan alerjik konjonjivit çalışmaları rahatlıkla ve güvenle kullanılabilecek bir model oluşturmayı amaçladık. Alerjik hastalıkların fizyopatolojilerinin daha iyi ve detaylı olarak anlaşılması amacıyla ve/veya tedavilerinde kullanılabilecek yeni ajanların geliştirilmesi amacıyla yapılacak ileri çalışmalarda kullanılabilecek, oldukça basit, kısa sürede oluşturulabilen ve tekrarlandığında aynı sonuçların elde edilebildiği bir model oluşturduğumuzu düşünmekteyiz.

Bu çalışma, alerjik hastalıkların fizyopatogenezinin daha iyi anlaşılması ve yeni ilaçların geliştirilmesi için yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere, insandaki alerjik konjonjivit simüle eden bir hayvan modeli geliştirmek amacıyla yapılmış, prospektif, randomize tek kör olarak gerçekleştirilmiş, deneysel bir çalışmadır. Çalışmamızın sonuçları, insanlardaki alerjik konjonjivitte görülen klinik ve patogenez ile oldukça benzerlik göstermesi ve tekrarlandığında aynı sonuçların alınması ile, modelimizin, etkin, güvenilir ve ekonomik bir model olduğunu göstermektedir. Modelimizin ileride yapılacak olan alerjik konjonjivit çalışmalarına önemli bir temel oluşturacağına inanmaktayız. Alerjik hastalıkların patogenezinin tüm

detaylarıyla aydınlatılabilmesi için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya gerek vardır.

Teşekkür

Çalışmalarımızdaki katkılarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'na ve Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU'na çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Friedlaender MH, Okumoto M, Kelley J. Diagnosis of allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol.* 1984;102:1198-9.
2. Trocme SD, Sra KK. Spectrum of ocular allergy. *Curr Opin Allergy Immunol.* 2002;2: 423-7.
3. Allansmith MR, Ross RN. Ocular allergy. *Clinical Allergy.* 1988;18:1-13.
4. Baddeley SM, Bacon AS, McGill JI, Lightman SL, Holgate ST, Roche WR. Mast cell distribution and neutral protease expression in acute and chronic allergic conjunctivitis. *Clin Exp Allergy.* 1995;25:41-50.
5. Morgan SJ, Williams JH, Walls AF, Church MK, Holgate ST, McGill JI. Mast cell numbers and staining characteristics in the normal and allergic human conjunctiva. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87:111-6.
6. Morgan SJ, Williams JH, Walls AF, Holgate ST. Mast cell hyperplasia in atopic keratoconjunctivitis. An immunohistochemical study. *Eye.* 1991;5:729-35.
7. Macleod JD, Anderson DF, Baddeley SM, Holgate ST, McGill JI, Roche WR. Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy.* 1997;27:1328-34.
8. Shoji J, Sakimoto T, Muromoto K, Inada N, Sawa M, Ra C. Comparison of topical dexamethasone and topical FK506 treatment for the experimental allergic conjunctivitis model in BALB/c mice. *Jpn J Ophthalmol.* 2005;49:205-10.
9. McGill JI, Holgate ST, Church MK, Anderson DF, Bacon A. Allergic eye disease mechanisms. *Br J Ophthalmol.* 1998;82:1203-14.
10. Yanoff M, Ben S. Ocular Pathology. 5th ed, chapter 7. Mosby; St. Louis; 2002:223-4.
11. Anderson DF, MacLeod JD, Baddeley SM, et al. Seasonal allergic conjunctivitis is accompanied by increased mast cell numbers in the absence of leucocyte infiltration. *Clin Exp Allergy.* 1997;27:1060-6.
12. Tsubota K, Takamura E, Hasegawa T, Kobayashi T. Detection by brush cytology of mast cells and eosinophils in allergic and vernal conjunctivitis. *Cornea.* 1991;10:525-31.
13. Allansmith MR, Greiner JV, Baird RS. Number of inflammatory cells in the normal conjunctiva. *Am J Ophthalmol.* 1978;86:250-9.
14. Abelson MB, Madiwale N, Weston JH. Conjunctival eosinophils in allergic ocular disease. *Arch Ophthalmol.* 1983;101:555-6.
15. Leonardi A, DeFranchis G, De Paoli M, Fregona I, Plebani M, Secchi A. Histamine-induced cytokine production and ICAM-1 expression in human conjunctival fibroblasts. *Curr Eye Res.* 2002;25:189-96.
16. Friedlaender MH. Conjunctivitis of allergic origin: clinical presentation and differential diagnosis. *Surv Ophthalmol.* 1993;38:105-14.
17. Bonini S, Bonini S, Vecchione A, Naim DM, Allansmith MR, Balsano E. Inflammatory changes in conjunctival scrapings after allergen provocation in humans. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;82:462-9.
18. Tomaç N. Alerjik Konjonjivitler (Derleme). *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2004;24:396-410.
19. Irkeç MT, Bozkurt B. Molecular immunology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012;12:534-9.