

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI
DOKTORA PROGRAMI

**DENEYSEL ATOPIK DERMATİT OLUŞTURULAN RATLARDA SOĞUK
ATMOSFERİK PLAZMANIN BAZI MOLEKÜLER BELİRTEÇLER ÜZERİNE
ETKİSİ**

PELİN UYSAL KARPUZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. PINAR ALKIM ULUTAŞ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-22042 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2025

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışma sürecimde, tez çalışmamın seçiminde, planlanmasında ve çalışmanın ortaya konmasında bana anlayışlı yaklaşımı, özverili tutumu ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak gelişimime katkı sağlayan Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK, Prof. Dr. Funda KIRAL, Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK ve Dr. Öğr. Üyesi Gamze Servi EKREN AŞÇI'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

İstatistiksel analizlerimin değerlendirmelerinde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Hüsnü Erbay BARDAKÇIOĞLU ve deney hayvanlarıyla ilgili süreçteki yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Asude Gülçe ORYAŞIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bana yardım ve destekleri için başta Alanur BAKIR olmak üzere tüm doktora arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin tamamında benden hiçbir desteği esirgemeyen aileme ve tez çalışmamdaki sabrı ve özverili yaklaşımı için eşime sonsuz teşekkür ederim. Bu süreçteki başarımın kaynağı sizlerin değerli destekleridir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Atopik Dermatit.....	4
2.2. Derinin Yapısı.....	5
2.2.1. Stratum Korneumda Yağların Yapısı.....	7
2.2.2. Stratum Korneumda Proteinlerin Yapısı.....	8
2.2.3. Stratum Korneumun Su İçeriği.....	9
2.3. Atopik Dermatitin Patogenezi.....	10
2.4. Deri Bariyeri.....	12
2.5. Lipitlerin Önemi.....	14
2.6. Mikrobiyal Enfeksiyonlar.....	15
2.7. Antimikrobiyel Peptidler.....	17
2.8. Reseptörlerin Etkisi.....	22
2.8.1. AHR (Arl Hidrokarbon Reseptörü) ve Atopik Dermatit.....	22
2.8.2. Atopik Dermatitte PXR (Pregnane X Reseptör)	25
2.8.2.1. Yapısal PXR aktivasyonu epidermal bariyerin işlevini bozar.....	26
2.8.3. Atopik Dermatitte PPAR'lar (Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptörler)	27
2.8.4. AD'de Ksenobiyotik Reseptör Eşleri: LXR'ler (Karaciğer X reseptörleri).....	29
2.9. Plazmanın Genel Özellikleri.....	31

2.10. Termal olmayan veya Soğuk Atmosferik Basıncılı Plazmanın Üretimi.....	32
2.10.1. DBD plazma jeti.....	33
2.10.2. Corona plazma jeti.....	33
2.10.3. Yüzen elektrot olarak canlı doku kullanan DBD.....	34
2.10.4. Yüksek frekanslı deşarj.....	35
2.10.5. Kayma Ark Deşarjları.....	36
2.10.6. Kalem tipi Tsukuba hafif plazma.....	36
2.10.7. Nagoya denge dışı atmosferik basınç plazması (NEAPP).....	36
2.11. Termal olmayan veya Soğuk Atmosferik Basıncılı Plazmanın Sağlık Sektöründeki Kullanım Alanları.....	37
2.11.1. Hastane hijyeni.....	40
2.11.2. Sterilizasyon.....	40
2.11.3. Antimikrobiyal etki.....	41
2.11.4. Kronik yaralar.....	42
2.11.5. Diş bakımı.....	43
2.11.6. Deri hastalıkları.....	44
2.11.7. Kozmetik.....	46
2.11.8. Koagülasyon.....	47
2.11.9. Kanser tedavisi.....	48
2.12. Termal olmayan veya Soğuk Atmosferik Basıncılı Plazmanın İn-Vitro Çalışmalarda Kanser Hücre Hattına Etkileri.....	50
2.13. Düşük sıcaklıkta plazma toksisitesi ve yan etkileri.....	50
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
3.1. Gereç.....	52
3.1.1. Deney Hayvanı Materyali.....	52
3.2. Yöntem.....	52
3.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü.....	52
3.2.2. Serum ve doku örneklerinin hazırlanması.....	53
3.2.3. Biyokimyasal Analizler.....	54
3.2.3.1. Kontrol, AD, SAP grubundaki ratlardan alınan kan örneklerinden yapılan IgE analizi.....	54
3.2.3.2. Kontrol, AD, SAP grubundaki ratlardan alınan kan örneklerinden yapılan IL-13 analizi.....	56

3.2.3.3. Kontrol, AD, SAP grubundaki ratlardan alınan kan örneklerinden yapılan IL-4 analizi.....	58
3.2.4. Real Time PCR Analizleri.....	60
3.2.4.1. RNA İzolasyonu.....	60
3.2.4.2. cDNA sentezi.....	61
3.2.4.3. Real-Time qPCR.....	62
3.2.4.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması.....	65
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Atopik Dermatit Şiddet Skoru (DSS).....	67
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	68
4.3. Biyokimyasal Bulgular.....	70
4.4. Genlerin Kantitatif Ekspresyon Düzeyleri.....	71
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
KAYNAKLAR.....	84
EK 1. ADÜ HADYEK.....	92
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	93
ÖZ GEÇMİŞ.....	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AD	: Atopik dermatit
SAP	: Soğuk Atmosferik Plazma
UV	: Ultra viyole
İDT	: İntradermal deri testi
SC	: Stratum korneum
IVL	: İnvolukrin
LOR	: Lorikrin
FLG	: Filaggrin
NMF	: Doğal nemlendirici faktör
SG	: Stratum granulozum
Th	: T yardımcı hücre
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
IgE	: İmmunoglobulin E
TSLP	: Timik Stromal Lenfopoietin
AMP	: Antimikrobiyal peptidler
Cer	: Seramid
HBD	: İnsan beta Defensin
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNF	: Tümör nekroz faktörü
CAMP	: Katelisidin Antimikrobiyal Peptid
CCR	: Kemokin reseptör
PCB	: Poliklorlu bifeniller
AHR	: Aril hidrokarbon reseptörü
PXR	: Pregnane x reseptörü
PPAR	: Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör

LXR	: Karaciğer x reseptörü
XAP	: X ile ilişkili reseptör
ARNT	: ARH nükleer translokator
XRE	: Ksenobiyotiğe duyarlı elemanlar
CYP	: Sitokrom P
ROS	: Reaktif oksijen türleri
KC	: Keratinositler
LC	: Langerhans hücreleri
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
DMBA	: Dimetilbenzantrasen
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
GLUT	: Glukoz taşıyıcı
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
DBD	: Dielektrik Basınç Deşarjı
FE-DBD	: Floating Elektrot Dielektrik Basınç Deşarjı
NEAPP	: Nagoya denge dışı atmosferik basınç plazması
PIKK	: Fosfatidilinositol 3-kinaz ile ilişkili kinazlar
DN-PK	: DNA'ya bağımlı protein kinaz
IR	: İyonlaştırıcı radyasyon
SMF	: Statik manyetik alan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Deri bariyerinin şematik yapısı	6
Şekil 2.	Sağlıklı ve atopik dermatit koşullarında cilt ve mikrobiyom arasındaki etkileşim.....	11
Şekil 3.	Çok yönlü deri bariyeri.....	13
Şekil 4.	Reseptörler ve etkileri	30
Şekil 5.	SAP'nin AD üzerindeki olası immünomodülatör etkisi.	45
Şekil 6.	Kontrol, Atopik Dermatitis (AD) ve Aoğuk Atmosferik Plazma Tedavisi (SAP) uygulanmış grupların toplam DSS sonuçları.....	66
Şekil 7.	Histopatolojik bulgular mikroskopik görüntü.....	67
Şekil 8.	LL-37 amplifikasyon eğrileri.....	71
Şekil 9.	AHR amplifikasyon eğrileri.....	71
Şekil 10.	Defensin-1 amplifikasyon eğrileri.....	74
Şekil 11.	Defensin-2 amplifikasyon eğrileri.....	72
Şekil 12.	PPAR α amplifikasyon eğrileri.....	72
Şekil 13.	GAPDH amplifikasyon eğrileri.....	73
Şekil 14.	Melting point (Tm)grafikleri.....	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Soğuk atmosferik plazma cihazı, plazma pen.....	37
Resim 2.	Atopik dermatitli ratların lezyonları	67



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.	Ayırıcı tanıdaki hastalıklar	4
Tablo 2.	Deri kaynaklı antimikrobiyal peptidler.....	20
Tablo 3.	mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri	59
Tablo 4.	cDNA sentezi için kullanılan materyal bilgileri	60
Tablo 5.	cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri	60
Tablo 6.	cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları	61
Tablo 7.	Real-Time qPCR için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası.....	61
Tablo 8.	Kullanılan primer adı, primer dizisi ve sentezleyen firma bilgisi.....	62
Tablo 9.	Gen isimleri ile birlikte forward ve reverse primer dizileri bilgileri.....	63
Tablo 10.	Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bileşen ve hacimleri.....	64
Tablo 11.	Real-time qPCR reaksiyon aşamaları ve gerçekleştiği koşullar.....	64
Tablo 12.	Gruplara ait deri örneklerinden yapılan histopatolojik inceleme skorları ortalaması.....	68
Tablo 13.	Kontrol, Atopik Dermatit (AD) ve Soğuk Atmosferik Plazma (SAP) gruplarının İmmünglobulin E (IgE), İnterlökin -13 (IL-13) ve İnterlökin-4 (IL4) sonuçları.....	69
Tablo 14.	Kontrol, Atopik Dermatit (AD) ve Soğuk Atmosferik Plazma (SAP) gruplarının LL-37, AHR, Defensin-1, Defensin 2 ve PPAR α gen ekspresyon düzeyleri.....	70

ÖZET

DENEYSEL ATOPIK DERMATİT OLUŞTURULAN RATLARDA SOĞUK ATMOSFERİK PLAZMANIN BAZI MOLEKÜLER BELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİSİ

Uysal Karpuz P., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Doktora Tezi, Aydın 2025

Amaç: Bu çalışmanın amacı deneysel olarak Atopik Dermatit (AD) oluşturulan ratlarda soğuk atmosferik plazma (SAP) tedavisinin bazı moleküler belirteçler üzerindeki etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada yeni doğan 24 adet rat kullanılmıştır. 8 adet yeni doğan rat kontrol grubu olarak belirlenip, geri kalan 16 yeni doğan rata doğumdan hemen sonra Kaspaisin uygulaması yapıldı ve AD oluşması için 6 hafta normal bakım ve besleme koşullarında barındırıldı. AD oluşan ratlardan 8 adeti SAP uygulanmaksızın AD grubu olarak belirlenerek bakım ve beslemesine devam edildi, 8 adeti ise SAP grubu olarak belirlenerek 5 kez SAP tedavisi iki bölgeden toplam 3 er dakika uygulandı. Uygulamalar sonunda 3 gruptan da genel anestezi altında kan ve deri örnekleri toplandı. Ardından alınan kan örneklerinden serumları ayrılıp ELISA yöntemi ile IgE, IL-13 ve IL-4 analizleri yapıldı, alınan deri örneklerinden histopatolojik inceleme yapıldı, ek olarak qRT-PCR yöntemi ile Atopik Dermatitin patogenezinde önemli rol oynayan antimikrobiyel peptidlerden Defensin 1, Defensin-2 ve katelisidin (LL-37) ile reseptörlerden Aril Hidrokarbon reseptörü (AHR) ve lipidlerin oksidasyonundan sorumlu genleri kontrol eden Peroksizom Proliferatör ile Aktive olan reseptörlerden PPAR α gen ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Bulgular: Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde AD ve SAP gruplarının tamamında AD olduğu belirlendi. Analiz edilen keratin artışı, epitelde spongioz dejenerasyon, kıl folliküllerinde atrofi, retelerde derinleşme ve eozinofil lökosit skorları parametreleri karşılaştırıldığında SAP grubunda kontrol grubuna çok yakın bulgular elde edildi. Kan örneklerinden yaptığımız Elisa testleri sonucunda AD grubu ratların ortalama IgE düzeyleri kontrol ve SAP grubundan yüksek olarak belirlendi. IL-13 ve IL-4 ün ise SAP grubunda düşüş eğilimi gösterdiği belirlendi. Gen düzeyindeki araştırmalarda ise AD, SAP ve kontrol grubunda LL-37 (KAMP)ve Defensin-1 geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde gruplar arası

istatistiki bir fark saptanamadı. AHR gen ifadelenmesinin AD grubunda anlamlı derecede azaldığı ve kontrol grubundan daha düşük ifadelendiği saptandı. Defensin-2 gen ekspresyonu ise AD grubunda kontrol ve SAP tedavi grubundan daha düşük bulundu. PPAR α geninde ise SAP tedavi grubunda diğer gruplardan düşük ifadelendiği belirlendi. AD grubu PPAR α gen ekspresyonunun diğer gruplardan yüksek olduğu görüldü.

Sonuç: SAP tedavisi deneysel oluşturulan AD modelinde ratlarda IgE, IL-13 ve IL-4 düzeylerinde değişikliğe neden oldu. SAP tedavisinin hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak iyileşmeye neden olduğu makroskobik ve mikroskobik olarak doğrulandı. Bu yönüyle SAP uygulanmasının AD tedavisinde etkinliği gösterilmiş oldu. AD patogenezinde rol oynayan genlerden AHR, Defensin-2 ve PPAR- α gen ekspresyonları üzerine etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ulaşılan bilgiler ışında hayvanlarda ve insanlarda önemli bir problem olan AD tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım olan SAP'ın klinik uygulamalarda destek tedavisi olarak önerilme potansiyelinde olduğu ortaya konmuş oldu.

Anahtar Kelimeler: Atopik Dermatitis, Soğuk Atmosferik Plazma, IgE, IL-4, IL-13, Defensin1, Defensin-2, LL-37, AHR, PPAR α , rat

ABSTRACT

EFFECT OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA ON SOME MOLECULAR MARKERS IN RATS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED ATOPIC DERMATITIS

Uysal Karpuz P., Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Biochemistry Program, PhD Thesis, Aydın 2025

Objective: The aim of this study is to investigate the effect of cold atmospheric plasma (SAP) treatment on some molecular markers in rats with experimentally induced Atopic Dermatitis (AD).

Materials and Methods: In this study, 24 newborn rats were used. 8 newborn rats were determined as the control group, the remaining 16 newborn rats were treated with Kaspaisin immediately after birth and housed under normal care and feeding conditions for 6 weeks to develop AD. 8 of the rats with AD were determined as the AD group without SAP application and their care and feeding continued under normal care and feeding conditions, while 8 were determined as the SAP group and SAP treatment was applied to two lesion areas on them for a total of 3 minutes 5 times. At the end of the applications, blood and skin samples were collected from all 3 groups under general anesthesia. then, serums were separated from The blood samples and IgE, IL-13 and IL-4 analyses were performed using The ELISA method, besides that histopathological examination was performed with one sample of the skin samples taken, and in addition, antimicrobial peptides Defensin 1, Defensin-2 and cathelicidin (LL-37) That play an important role in The pathogenesis of Atopic Dermatitis, Aryl Hydrocarbon receptor (AHR) from the receptors, and Peroxisome Proliferator Activated receptor PPAR α gene expression levels that control the genes responsible for the oxidation of lipids were determined by using the qRT-PCR method.

Findings: When evaluated histopathologically, it was determined that AD occurred in all of the AD and SAP groups. When the analyzed parameters of keratin increase, spongiosis degeneration in the epithelium, atrophy in the hair follicles, deepening of the rete and eosinophil leukocyte scores were compared, findings very similar to the control group were obtained in the SAP group. As a result of the Elisa tests we conducted on blood samples, the average IgE levels of the AD group rats were obtained higher than the control and SAP groups. It was determined that IL-13 and IL-4 showed a decreasing trend in the SAP group. In the

studies at the gene level, when the expression levels of LL-37 (CAMP) and Defensin-1 genes were examined in the AD, SAP and control groups, no statistical difference was detected between the groups. It was determined that the AHR gene expression decreased significantly in the AD group and was expressed lower than the control group. Defensin-2 gene expression was found to be lower in the AD group than the control and SAP treatment groups. It was determined that the PPAR α gene was expressed lower in the SAP treatment group than in the other groups. It was observed that the PPAR α gene expression in the AD group was higher than in the other groups.

Conclusion: SAP treatment caused changes in the IgE, IL-13 and IL-4 levels in rats in the experimentally created AD model. It was confirmed macroscopically and microscopically that both biochemical and histopathological improvements were observed after SAP treatment. In this respect, the effectiveness of SAP application in the treatment of AD was demonstrated. It was concluded that more detailed studies should be conducted on the effect of SAP on gene expression. It has been observed that it has effects on AHR, Defensin-2 and PPAR α gene expressions, which are genes that play an important role in AD pathogenesis. In light of the information obtained as a result of this study, it has been revealed that SAP, an innovative approach in the treatment of AD, which is an important problem in animals and humans, has the potential to be recommended as a supportive treatment in clinical applications.

Keywords: Atopic Dermatitis, Cold Atmospheric Plasma, IgE, IL-4, IL-13, Defensin-1, Defensin-2, LL-37, AHR, PPAR α , rat

1. GİRİŞ

Atopik dermatit (AD), genetik yatkınlıkla aktarılan kronik yangısal kaşıntılı bir deri hastalığıdır. Patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır ve paradigmalardan biri, deri bariyer disfonksiyonu nedeniyle alerjenlerin epidermal tabakalara penetrasyonunun kolaylaşması ve duyarlı kişilerde klinik semptomlara neden olan doğuştan ve adaptif immün yanıtı indüklemesidir (Chermprapai ve diğerleri 2018). İnsanlarda görülme sıklığı %10-15, köpeklerde %10-30, kedilerde ise %12.5 olarak rapor edilmiştir. AD' in düşünülenden çok daha karmaşık bir hastalık olduğu görülmüştür. Genomik analizler, bağışıklık fonksiyonunu ve deri gelişimini etkileyen bir dizi genin rol oynadığını ve çeşitli ırklar ve türler arasında hastalığa aracılık eden genlerde farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu genetik bilgi, etkilenen hastalar arasında klinik belirtiler ve tedaviye verilen yanıtlardaki çeşitlilik için olası bir açıklama sağlarken belki de teşhis için gerekli testlerin ve belirteçlerin de geliştirilmesine yol açacaktır. Tedavi ile ilgili olarak, sitokini hedef alacak tedavilerin geliştirilmesi, bu kronik hastalıkla bağlantılı kaşıntı ve iltihaplanmanın daha güvenli ve daha etkili bir şekilde kontrol altına alınma potansiyeline sahiptir. Deri hastalıkları konusunda uzmanlaşmak üzere araştırmalar yapan çoğu veteriner hekim, esansiyel yağ asitlerinin doğru dengesini sağlamak için optimize edilmiş beslenme kullanımını ve derinin kaplama kalitesini iyileştirmek için lipid ürünlerinin topikal uygulamasını destekler. Alerjene özgü immünoterapi, hastalık sürecini değiştirebilen tek tedavi olarak hala savunulmaktadır. AD, durmaksızın ilerleyen bir hastalıktır, hastalık sürecini yavaşlatmak ve etkilenen hastaya iyi bir yaşam kalitesi sağlamak için erken müdahale ve sıkı kontrol gereklidir. AD ile ilişkili sürekli kaşınma hali ve ikincil enfeksiyonlar, etkilenen hasta ve hasta sahiplerinin psikolojisini de etkilemektedir, bazı hasta sahiplerinin maddi ve manevi olarak çok yıprandığını sebep gösterip hasta kedi/köpeklerini bir başka bireye sahiplendirmek istediği noktalar bile olmuştur.

Atopik dermatit vakalarında, süreci yöneten veteriner hekimi ile hayvan sahibinin iyi bir iletişim ve sık teması, hayvan sahibinin detaylı bilgilendirilmesi ve süreçte karşılaşılabileceği olumsuzlukları bilmesi, başarılı hastalık kontrolü için çok önemlidir. Bu iletişimde hasta sahibine olası tüm teşhis ve tedavi seçenekleri konusunda bilgi verilmeli ve gelişen teknolojik güncel tedavi seçenekleri sunabilmelidir. Keza AD yalnızca hayvan sağlığında ve veteriner hekimliğinde değil beşerî hekimlikte de gelişmekte olan teşhis ve tedavi seçeneklerinin mevcut

olduğu bir hastalıktır. Bu tedavi yöntemlerinden birisi plazma tedavisidir. Deride gerçekleşen çeşitli hastalıklar ve yara tedavisi ile birlikte AD tedavisi için de kullanımı giderek yaygınlaşan plazma tedavisinin alt yapısının oluşumu 1879 yılında William Crookes adında bir bilim adamının, bir voltaj bobini aracılığıyla yüksek voltaj uygulayarak, bir elektrik deşarj tüpündeki gazı iyonize etmesiyle olmuştur. İyonize ettiği gazı “radyan madde” olarak adlandırmıştır. Günümüzde kullandığımız “plazma” terimini, bulunduktan neredeyse elli yıl sonra 1927'de Irvin Langmuir dile getirdi. Plazma, son birkaç on yılda medikal alanlar da dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmaya başlandı.

Plazma genellikle çok atomlu gaz moleküllerinin parçalanması veya tek atomlu gaz kabuklarından elektronların çıkarılmasıyla üretilen iyonize bir gaz olarak tanımlanır. Ancak, yüklü parçacıklar içeren her iyonize gaz plazma olarak kabul edilemez. Bunun için makromoleküler nötrlüğe sahip olmalıdır. Plazmada dış etkenler olmadığı takdirde, sonuçta ortaya çıkan net elektrik yükü sıfırdır. Bu nedenle, plazma neredeyse aynı yoğunlukta pozitif ve negatif yüklü parçacıklar içerir. Plazmanın diğer bir özelliği ise, plazmadaki yüklü parçacıkların bir Debye uzunluğu mesafesindeki elektrostatik alanları etkili bir şekilde korumak için düzenlendiği Debye korumasına sahip olmasıdır. Bu plazma frekansı olarak da adlandırılır ve tek bir yüklü parçacığın elektrik alanının etkisinin plazma içindeki diğer yüklü parçacıklar tarafından hissedildiği mesafenin bir ölçüsü olarak tanımlanır. Plazma denge koşullarını kaybederse, ortaya çıkan iç uzay yük alanları, orijinal yük nötrlüğünü geri kazanma eğiliminde olan toplu parçacık hareketini teşvik eder. Bu hareket, plazma frekansı olarak adlandırılan doğal salınım frekansı ile karakterize edilir. Bu nedenle plazma, “uzun menzilli coulomb kuvvetlerinin neden olduğu kolektif davranışa sahip, etkileşim halindeki birçok serbest elektron ve iyonize atom ve moleküller içeren yarı nötr bir gaz” olarak tanımlanabilir. Ek olarak, plazmadaki yüklü parçacıkların hareketi, elektrik alanları, akımlar ve manyetik alanlar oluşturur.

Günümüzde deney hayvanı modeli tasarlanırken rat seçilmesi dermatolojik hastalıkların çoğunluğuna ilişkin patolojiyi ortaya koymada fizyolojik olarak hem insan hem kedi ve köpek için en uyumlu yaklaşımı sağlamaktadır Ayrıca üretme, indüksiyon ve indüksiyon sonrası bakım ve besleme ortamlarının araştırmacının kontrolünde olması nedeniyle bu çalışmadaki AD modelinin rat üzerinde oluşturulması en doğru seçenek olarak düşünüldü. Bu çalışmada deney hayvanı modeli olarak rat tercih edilmesinin bir diğer sebebi de ratların gerek Türkiye’de gerek global düzeydeki araştırmacılar tarafından halihazırda en

fazla kullanılan deney hayvanı olmasıdır. Bu sayede çalışmanın sonunda ulaşılan bulgular çeşitli benzer çalışmalardan yararlanmış literatürlerle beraber tartışılabilmektedir.

Bu çalışmada deneysel olarak AD oluşturulan ratlarda soğuk atmosferik plazma (SAP) tedavisinin bazı moleküler belirteçler üzerindeki etkisini incelenerek AD tedavisinde SAP uygulamasının etkinliğinin moleküler düzeyde gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ulaşılan bilgiler ışında hayvanlarda ve insanlarda önemli bir problem olan AD tedavisinde yenilikçi bir yaklaşımın kullanılma olasılığı değerlendirilmiş olacaktır. Elde edilecek veriler ışığında yeni klinik çalışmalar planlanabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Atopik Dermatit (AD)

Atopik dermatit, genetik yatkınlığa bağlı karakteristik klinik bulgulara sahip yangısal, kaşıntılı bir hastalıktır. Akarlar, polenler, küf sporları gibi çevresel etmenlere yönelik oluşan Ig E antikorları ile bağlantılı bir sorun olduğu bilinmektedir (Temizel ve Aytuğ, 2010). Tanı koyulma aşamasında benzer klinik bulgulara neden olan tüm diğer etmenler ekarte edilmeli, bunun için iyi bir anamnez alınıp hasta sahibinden tüm ayrıntıların öğrenilmesi gerekmektedir. Muayene ve anamnez sırasında özellikle AD ile çokça karışan pire dermatiti, uyuz etkenleri, mallasezia gibi hastalıkların elenmesi için deri kazıntısı örneği, smear vb. gerekli analizler yapılmalı ve analiz sonucuna göre AD birlikte seyreden hastalık diğer tespit edilirse diğer hastalığı elimine edecek tedavilere başlanmalı ve bunun sonucuna göre hareket edilmelidir (Barın ve Pekmezci, 2018).

Alerjik deri hastalıkları	1. Pire alerjisi 2. Atopik dermatit 3. Gıda intoleransı/alerjisi 4. Böcek ısırma hipersensitivitesi 5. Kontakt dermatit
Ektopik deri hastalıkları	1. Pire enfestasyonları 2. Uyuz (<i>Sarcoptes scabiei</i>) 3. Demodikozis 4. Şeyletiellozis 5. Pedikulozis 6. Otoakariazis 7. Trombikuliazis
Mikrobiyal deri enfeksiyonları	1. Stafilokok dermatiti 2. Malassezia dermatit
Neoplastik hastalıklar	1. Kutanöz lenfoma

Tablo 1. Ayırıcı tanıdaki hastalıklar (Barın ve Pekmezci, 2018)

Besin alerjileri klinik olarak bazı köpeklerde AD olarak açığa çıkabilir, ancak gıda alerjisine sahip her köpek bunu AD olarak göstermez. AD, gıda alerjenleri tarafından daha da şiddetlenir. Mevsimsel olmayan AD tanısı konulan köpeklerde, hastalığın tetiklenmesine yol açabilecek diyet alerjenlerini belirlemek ve ortadan kaldırmak için bir veya daha fazla diyet kısıtlaması ardından eleme diyetleri yapılmalıdır (Mulla, 2020).

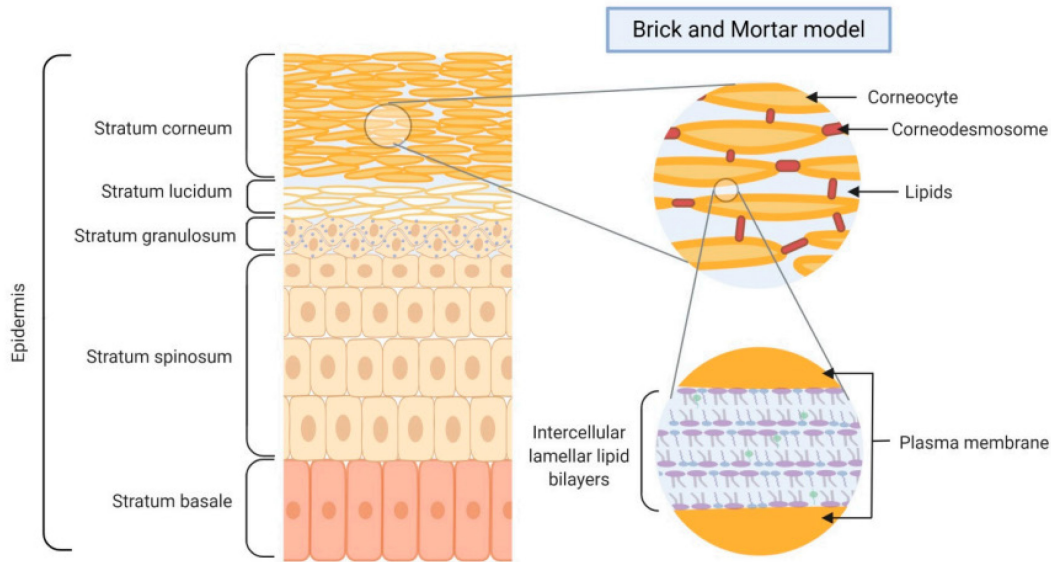
Anamnez ve klinik bulguları takiben kesin tanı için, intradermal test ve alerjen spesifik Ig E testleri bakılmalıdır. İDT (intradermal deri testi), IgE ilişkili hipersensitiviteyi belirlemek için kullanılan bir testtir. Serumda alerjen spesifik IgE'nin seviyesini reaktif olarak tespit etmek için Radioallergosorbent test (RAST), ELISA ve liquid-phase immunoenzymatic assay testleri kullanılan testler arasında bulunmaktadır (Temizel ve Aytuğ, 2010).

Köpeklerde ve insanlarda AD'nin klinik belirtileri, hastanın genetik özellikleri ile hastanın çevresi arasındaki karmaşık bir etkileşimi yansıtır. Tedaviye verilen klinik işaretler ve yanıtlar, hastalar arasında, aynı ırktan ayrı ayrı köpekler arasında ve köpek ırkları arasında farklılık gösterebilir. İnsan AD patogeneğinde, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerini ayrıca cilt bariyerinin gelişimini ve korunmasını etkileyen 30'dan fazla gen vardır. AD'nin klinik alt kümelerinin genotiplendirilmesi yoluyla, tanısal testlerde iyileştirmeler ve bireysel terapötik maddelere verilen yanıtları tahmin etme yeteneği mevcuttur (Nuttall ve diğerleri, 2019).

2.2. Derinin Yapısı

Deri, birincil savunma, duyu ve boşaltım organı ve vücut ısısının kritik bir düzenleyicisi olarak hizmet eder. Bariyer özellikleri ultraviyole (UV) radyasyondan, oksidanlardan, mikroorganizmalardan ve toksik ajanlardan korumaya kadar uzanır. Bununla birlikte, en çok takdir edilen bağlamında, kritik cilt bariyeri işlevi su kaybına karşı epidermal bariyer anlamına gelir. Bu geçirgenlik bariyeri, çevre ile gerçek bir arayüz olan ve karasal yaşamın kendisi için bir ön koşul olan, cildin ince, en yüzeysel tabakası olan Stratum Korneum (SC) içinde bulunur. Oldukça özelleşmiş bir yapı olan SC, hidrasyonunu ve dolayısıyla esnekliğini sürdürmeye yarayan küçük ama hayati bir akış dışında esasen su geçirmezdir. Yüzey katmanlarının hidrasyonu, cilt yüzeyinde deri dökülme süreci olan deskuamasyonu kolaylaştırmak için de kritik öneme sahiptir (Rawling ve Harding, 2004).

Vücudun savunma sisteminin en önemli parçalarından biri olan deri su içeriğini, iyonları ve serum proteinlerini koruyarak vücudun homeostazına ve savunma sistemine katkı sağlar ayrıca dış ortamla iç ortam arasında dengede bir bariyer sistemidir. Deri üç farklı katmandan oluşur. Bu tabakalar sırasıyla epidermis, dermis ve hipodermistir. En dışta epidermis derinin yenilenmesini (rejenerasyonu) sağlar. Bazal membran üzerinde tutunur. Epidermis dermise ince fibrillerle bağlanmıştır. Bazal membran bu fibrillerle epidermise oksijen ve besin maddeleri taşır bu şekilde doku canlılığı sağlanır. Keratinositler epidermisteki hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturur. Bazal tabakada üretilip, üst tabakalara doğru ilerlerler. İlerleme sürecinde keratin sentezi gerçekleşir granüler tabakada çekirdekleri kaybolarak sonlanır. Bu hücreler, SC'ü oluşturur. Ölen hücelere korneosit denir ve bunlar deri yüzeyine doğru hareket ederek dökülürler, bu olaya deskuomasyon denir. Bu süreç yaklaşık dört hafta sürer. Bu döngüde stratum korneumdan sürekli olarak ölü keratinositler döküldüğü için epidermisin hücre yapısını sağlamlaştırmak ve dengelemek için bazal tabakada mitoz ile sürekli yeni hücrelerin yapımı devam eder (Buzoğlu, 2020).



Şekil 1: Deri bariyerinin şematik yapısı (Yang ve diğerleri, 2020).

AD için önemli olan SC epidermisin en dış tabakasıdır. Ölü deri hücreleri ve bunları bir arada tutan yağ tabakalarından oluştuğu düşünülürken son yıllarda yapılan çalışmalarla metabolik aktivite ile ilişkili olduğu anlaşıldı. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik uyarılara bağlı

olarak DNA sentezi, yapısal proteinler ile yıkım enzimlerinin sentezi ve iyon transferleri yaptığı gösterilmiştir (Buzoğlu, 2020).

SC, başlıca korneositler ve bunların arasında yer alan yağlardan oluşmaktadır. Bu iki yapı temelde deri yüzeyinden bir kimyasalın geçişini düzenlemektedir. (Buzoğlu,2020) Keratinositler, epidermisin yapısından sorumlu olan ana hücre tipidir. Bazal epidermal tabakada kök hücreler olarak başlarlar. Epidermal yüzeye hareket ettikçe hücreler, hücre bölünmesini durdurur ve sivri, granüler, geçiş ve kornifiye tabakaları oluşturmak için morfolojik değişikliklere uğrar. Sivri tabakalı hücreler, yoğun hücre içi dezmozomal bağlantıların varlığı ile karakterize edilirken, granüler tabaka hücreleri, keratinosit farklılaşmasının ürünlerini içeren granüllerin varlığı ile ayırt edilir. Granüler katman hücrelerinin sürekli farklılaşması, ölü hücreleri canlı epidermal katmanlardan ayıran geçiş bölgesinin oluşumuyla sonuçlanır. Bu bölgede, hücresel bileşenlerin büyük ölçüde enzimatik olarak yeniden modellenmesi söz konusudur. Bu yeniden modelleme, nihayetinde, deri yüzeyini oluşturan, kovalent olarak çapraz bağlanmış terminal olarak farklılaşmış korneositler olan kornifiye tabakanın oluşumuyla sonuçlanır (Eckert ve diğerleri, 2004).

Korneositler SC'da kornifiye bir zarf içerisindeymiş gibi yerleşmekte ve kornifiye zarfın yapısı epidermisin mekanik direncini sağlamaktadır. Bu zarfın yapısında dinamik olarak birbirine bağlı lorikrin, involucrin ve filaggrin proteinleri bulunmaktadır. (Buzoğlu,2020) Korneositler arasında yer alan yağlardan oluşan tabakalar ise suyun ve dış ortamda bulunan tüm kimyasalların SC dan geçişlerini düzenlemektedir (Buzoğlu, 2020).

2.2.1. Stratum Korneumda Yağların Yapısı

En basit düzeyde SC, esasen proteinli, farklılaşmış keratinositlerin veya korneositlerin (tuğlalar) özel lipidlerin matriksine gömülü olduğu bir tuğla duvara benzetilir. Lipidler, su bariyerinin temel unsurunu sağlar ve korneositleri kimyasal ve fiziksel yaralanmalarla sürekli aşınmaya karşı korur. Lipid matrisi, SC hacminin yaklaşık %20'sini (kuru ağırlığın yaklaşık %15'i) oluşturur ve cilt bariyerinin sürekli fazıdır. SC lipid çift katmanları, bileşim, organizasyon ve fiziksel özellikler açısından biyolojik membranlar arasında benzersizdir. SC'nin başlıca lipid türleri seramidler (%50), yağ asitleri (%10-20) ve kolesteroldür (%25). Az

miktarlarda kolesterol esterleri ve kolesterol sülfat bariyer işlevinde kritik bir rol oynamaktadır (Rawling ve Harding, 2004).

Seramidler omega-hidroksi asitler ve 6-hidroksisifingozin gibi uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşmaktadır. Çok sayıda üyesi olan seramid ailesinde en az polar olan seramid 1, en önemli role sahiptir. Omegahidroksi seramidler korneositlerin çevresindeki kornifiye zarflara kovalent bağlarla bağlanarak SC un organize homojen yapısını oluşturmaktadır. SC'un içinde bulunan kolesterol hücre içi yağların akışkanlığını arttırmakta ve derinin elastikiyetini sağlamaktadır. Deri yüzeyindeki pH değişiklikleri, deri bariyerini etkileyen mekanik etkiler yağ biyosentezini etkiler. Deri bariyeri zarar gördüğünde SC'da HMGCoA-redüktaz enzim aktivitesindeki artış ile kolesterol sentezi artmaktadır. Bir diğer önemli yağ katmanı en üst katmanda yer alan sebumdur. Deride sebase bezler tarafından yapılarak deri yüzeyine salıverilir. Deri yüzeyinde su ile yağ-su mantosunun oluşmasını sağlayan sebum epidermal bariyerin önemli parçasıdır (Buzoğlu,2020). Yapısında %47 yağ esterleri, %17 mum esterleri, %13 seramidler, %11 skualen, %7 kolestrol, %3 trigliserid ve %2 kolestrol esterleri bulunur. İçinde bulunan yağ asitleri deri yüzeyinin PH sını düşürerek mikroorganizmalara karşı koruyan önemli savunma sistemini oluşturur (Buzoğlu, 2020).

2.2.2. Stratum Korneumda Proteinlerin Yapısı

Memeli epidermisi, bariyer oluşturan kornifiye bir tabaka sağlayarak vücudu dış ve çevresel faktörlerden kaynaklanan yaralanmalara karşı korur. Epidermal terminal farklılaşması veya kornifiye zarf olgunlaşması, seramidlerin ve involukrin (IVL), lorikrin (LOR) ve filaggrin (FLG) gibi çeşitli terminal farklılaşma proteinlerinin transglutaminaz-1 ile sıralı çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Furue ve diğerleri, 2019).

Korneositler içerisinde keratin, lorikrin, involukrin, filaggrin ve korneodesmosin gibi proteinler yapılmaktadır. Bunlar korneosit dışındaki korneosit zarfının oluşumuna katılırlar. Korneositler arasındaki bağları oluşturan korneodesmosomları oluştururlar. Keratinler korneosit hücre iskeletini oluşturan fibriler proteinlerdir. Keratin 1, 2f ve 10 epidermiste basal tabakanın üstündeki hücreler tarafından yapılır. Keratin 1 ve 10 korneositleri birbirine bağlayan desmosomal proteinler olan plakoglobulin ve desmoplakinlere desmogelin 1 ve desmocollin 1 proteinleri ile bağlanırlar. Keratinin korneositler içinde ve arasında oluşturduğu bu ağ yapısı

epidermal bariyer sisteminin stabilitesini sağlamaktadır. SC un en alt tabakasındaki keratin filamenteleri arasında bulunan filaggrin kalsiyum bağlayan protein ailesindendir. Filaggrin SC'un daha üst tabakalarına ve deri yüzeyine ulaştıkça parçalanarak aminoasitlere ayrılır. Bunlar derinin doğal su tutucu yapısıdır ve doğal nemlendirici faktör (NMF) olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca filaggrinin küçük bir kısmı korneosit zarfında lorikrin ile bağlanarak ağsal yapıya katılır. Genetik geçişli filaggrin sentezindeki anomaliler deri bariyer fonksiyonunun bozulmasına sebep olur. Involukrin, lorikrin, envoplakin ve prolin içeren diğer proteinler kornifiye zarfın hidrofobik yapısını oluşturmaktadır. Lorikrin kornifiye zarfın %70'ini oluşturan ana proteindir. Bu protein sentezinin bozulduğunda ortaya çıkan genetik hastalık, Vohwinkel sendromudur. Involukrin SC'da en dıştaki kornifiye zarflarda bulunmaktadır ve kornifiye zarfta proteinlerin birbiri arasındaki bağlanma süreci transglutaminaz enzimi kontrolü altında olmaktadır. Bu enzimin 2 izoformu vardır ve Transglutaminaz-1 eksikliğinde iktiyosis lamellaris gelişmektedir (Buzoğlu, 2020).

Derinin bariyer sistemi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler ile antioksidanlara karşı deriyi ve vücudu korur. Su ve birçok maddenin çevre ile vücut arasında dengesini sağlar. Ayrıca antimikrobiyal etkinliği de vardır.

2.2.3. Stratum Korneumun Su İçeriği

Suyun deriye geçişi ya da suyun kaybı epiderminin SC tabakasının kontrolündedir. Derinin elastikiyetiyle su içeriği arasında korelasyon mevcuttur. Deride su dağılımı homojen değildir. SC da %15-25, SC ile SG (stratum granulosum) arasında %40 dır ve epiderminin derinlerinde bu konsantrasyon %70 lere çıkmaktadır. Deskuamasyon sırasında korneositler arasındaki korneodezmozomların glikozidaz ve serin proteaz tarafında yıkılması gibi deride gerçekleşen pek çok fizyolojik olay su varlığında gerçekleşir. Yine filaggrinin yıkılması sırasında enzimatik kavite suya bağımlıdır (Buzoğlu, 2020). Kuru kaşıntılı derinin yaygın bölgeleri, AD'in en belirgin klinik özelliklerinden biridir. Şiddetli kaşıntı tarafından tetiklenen istemsiz kaşıma, SC' un fiziksel olarak bozulmasına neden olabilir ve böylece bariyerdeki içsel zayıflığı şiddetlendirebilir. Atopik kuru cilt, artan transepidermal su kaybı ve azalan su bağlama özelliklerinin gösterdiği gibi bozulmuş bir bariyer işlevi gösterir. Birincil kusur olmasa da bozulmuş bariyer işlevi ve kuruluğa bağlı yüzey pürüzlülüğü, cildi tahrişe daha duyarlı hale getirebilir. Bu durum ayrıca SC seramid seviyelerinde de önemli düşüşler ve

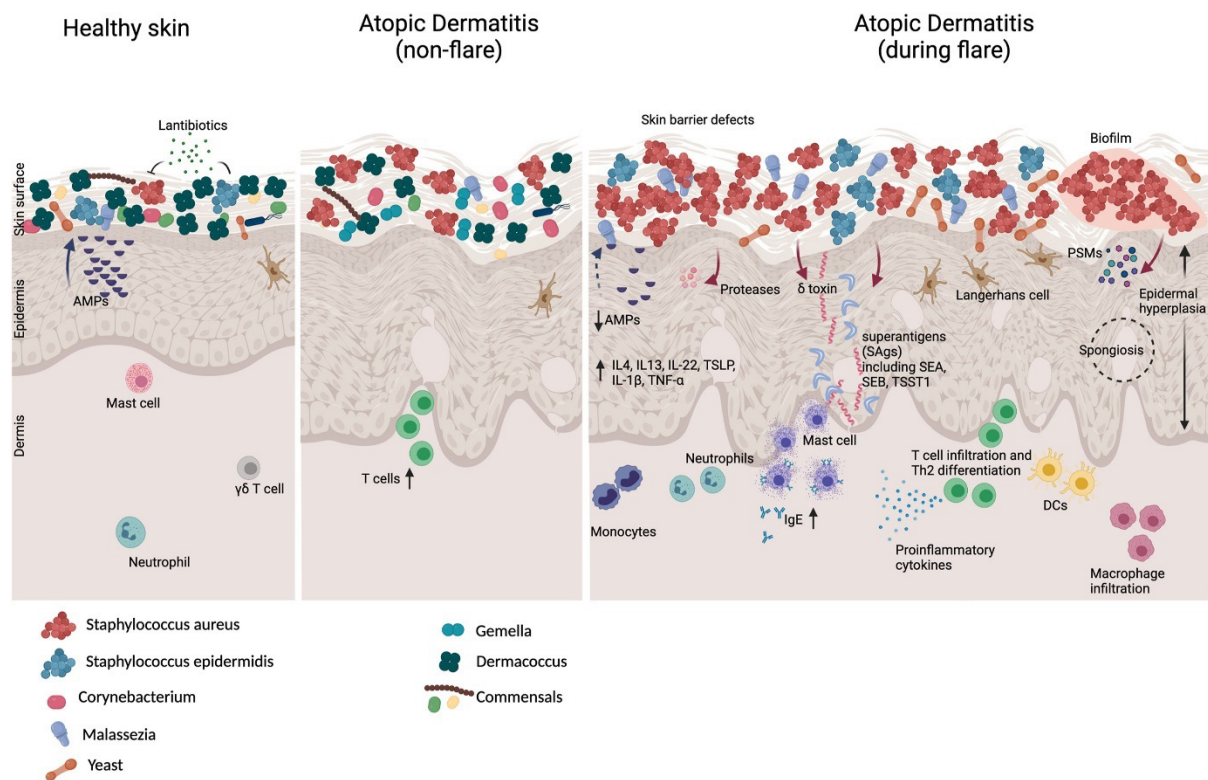
olağandışı, muhtemelen tanısal seramid türlerinin varlığı ile ilişkilidir. Son beş yıldaki araştırma sonuçları, bu durumda lipid metabolizmasının birçok yönünün bozulduğunu vurgulamıştır; AD'li hastaların kovalent bağlı omegahidroksiseramidleri önemli ölçüde tükenmiş ve sfingolipid metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olan prosaposin düzeyleri azalmıştır (Rawling ve Harding, 2004).

2.3. Atopik Dermatitin Patogenezi

Patogenezi oldukça karmaşık olan AD'de kusurlu bir cilt bariyerinin mikrobiyal yapışmaya, alerjenik proteinlerin penetrasyonuna, anormal inflamatuvar ve alerjik tepkilerin başlamasına izin vermesi muhtemeldir. SC hidrasyonunda azalma ve su kaybında artma, seramid içeriğinde ve zincir uzunluğunda azalma gibi lipid içeriğindeki değişiklikler, lamellar organizasyonda bozulma, filagrinde azalma, deri pH'ında artış, serin proteaz aktivitesinde bozulma, *Staphylococcus aureus* kolonizasyonunda anormal artış ile deri mikrobiyom çeşitliliğinde azalma gibi SC ile ilgili birçok bozukluk AD'de bildirilmiştir. Patogenezde ikinci temel mekanizma da derideki enflamasyondur ve başta CD4+ hücreler olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile karakterizedir. Lezyon olmayan deride bile T-helper (Th) 2, Th22 hücrelerin ve daha az oranda Th17 hücrelerin sayısındaki artış ve proenflamatuvar sitokin çevre ile subklinik enflamasyonun bulguları izlenir (Ertam ve diğerleri, 2018).

Başlangıçta, bağışıklık tepkisine Th2 hücreleri hakimdir ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 ve IL-31 gibi sitokinleri içerir. Bununla birlikte, kronik inflamasyonun gelişimi, Th1, Th2, Th17 ve Th22-hücre mediyatörlerinin bir karışımını içerir. Birçok veteriner hekim, Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki farka aşına olsa da T lenfositlerin başka alt kümelerinin de olduğunu anlamak önemlidir. Bu hücre alt kümeleri, antijen sunan hücrelere yanıt olarak gelişen spesifik efektör fonksiyonlara aracılık etmeye yardımcı olur. Genel olarak, Th1 hücreleri viruslar gibi hücre içi patojenlere karşı koruma sağlar ve kanser sürveyansına katılır. Th2 hücreleri, antikor üretimini ve immünoglobulin sınıf geçişini destekler. Ayrıca Th2 hücreleri, IgE üretimini aktive etme ve eozinofilleri aktive etme yetenekleri sayesinde çok hücreli parazitlere karşı koruma sağlar; Th2 hücreleri, alerjik hastalıklara aracılık etme rolü de üstlenir. Th17 hücreleri, nötrofil efektör işlevi için kritiktir ve bu hücre alt kümesinin, özellikle epitelyal yüzeylerde hücre dışı patojenlere karşı koruma sağladığına inanılmaktadır. Th22 hücreleri, doku iltihabını ve onarımını destekler ve düzenler; ciltte epitelyal proliferasyonu teşvik ettiğine inanılmaktadır (Nuttall ve diğerleri, 2019).

Kronik lezyonlardaki hücresel infiltratta Th2 ile birlikte, interferon (IFN) γ ve IL-12 üreten Th1 hücreleri ve daha az oranda Th22 ve Th17 bulunur. Th17 ve Th22, timik stromal lenfopoetin gibi keratinosit ve fibroblastlardan salınan sitokin ve kemokinlerle birlikte dokunun yeniden yapılandırmasını ve fibrozisini gerçekleştirirler. AD’de trimerik yüksek affiniteli IgE reseptörü taşıyan epidermal Langerhans hücreleri ve enflamatuvar dentritik hücreler ile dermal dentritik hücreler de antijen sunumunda görev alır. Bu reseptöre bağlı IgE aracılığı ile hücreler alerjenleri alabilirler, klasik olarak ani gelişen (tip 1) alerjik reaksiyonlara neden olurlar ve T hücre aracılı gecikmiş tip (tip 4) reaksiyonları uyarırlar (Ertam ve diğerleri, 2018).

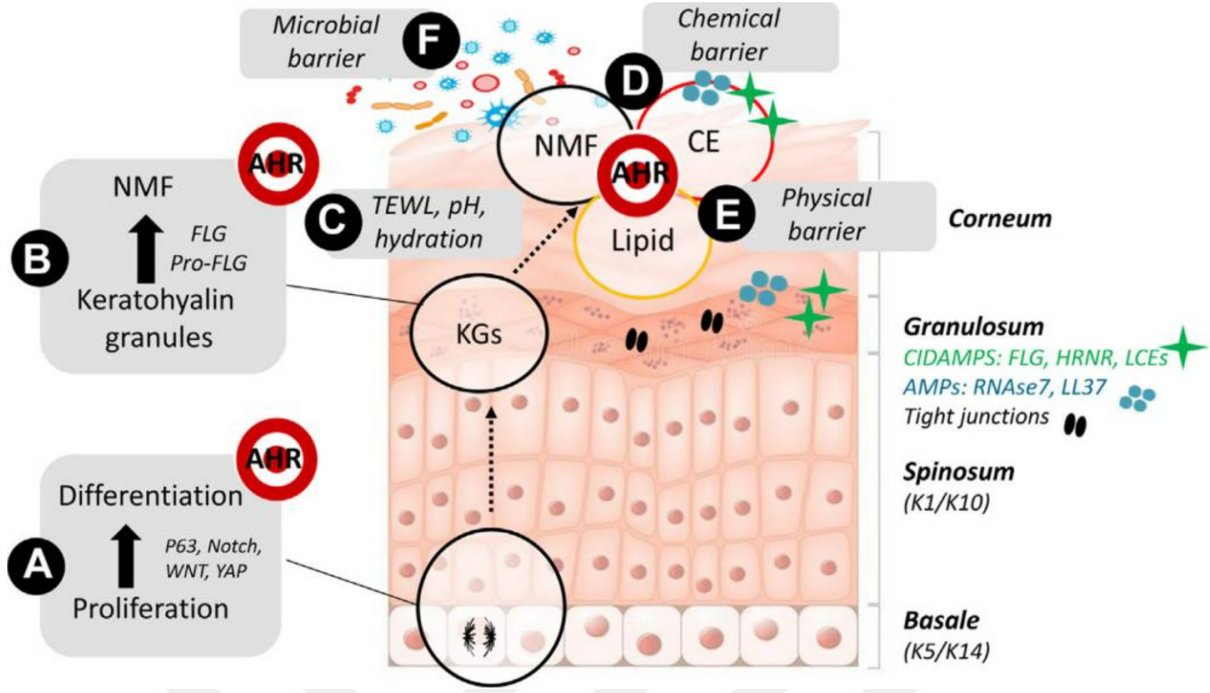


Şekil 2: Sağlıklı ve atopik dermatit koşullarında cilt ve mikrobiyom arasındaki etkileşim (Koh ve diğerleri, 2022).

AD’de sık görülen kaşıntı semptomu genellikle antihistaminiklerle kontrol altına alınamaz. Periferik kaşıntıda histamin, substans P ve onların reseptörleri rol oynadığı düşünülmektedir. Merkezi düzeydeki kaşıntıda ise beta-endorfin gibi endojen opioidlerin ve onların reseptörlerinin kaşıntıdaki rolüne dikkat çekilmiş ve morfinin gastrin salgılayan peptid reseptörleri aracılığıyla kaşıntıya neden olduğu bildirilmiştir (Ertam ve diğerleri, 2018).

2.4. Deri Bariyeri

Derinin en önemli işlevi, bir organizmanın iç ve dış ortamları arasında etkili bir bariyer sağlamaktır. Bu nedenle deri, organizma ile dış ortamı arasında bir arayüz görevi görerek, içinde bulunduğu organizmaya hem koruma hem de destek sağlar. Epidermal bariyer pasif su kaybını sınırlamak, çevresel kimyasal Emilimi kısıtlamak ve mikrobiyal enfeksiyonu önlemek temel fonksiyonlara sahiptir. Epidermal bariyer, terminal olarak farklılaşmış keratinositlerin oluşumu yoluyla mekanik, kimyasal ve mikrobiyal yaralanmaya karşı koruma sağlayan bir dış-iç bariyer sağlar; bu süreç keratinizasyon olarak adlandırılır. Keratinizasyon sırasında, epidermal hücreler bazal epidermal katmanlardan kademeli olarak olgunlaşarak SC'un yassı hücrelerini oluşturur. Epidermis içinde, keratinosit çoğalması bazal hücre katmanlarıyla sınırlıdır. Bazal katmandaki mitozdan sonra keratinositler farklılaşır ve epidermis boyunca SC'ye doğru göç eder. Farklılaşma süreci epidermiste sırasıyla stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve SC tabakalarını meydana getirir. Her farklılaşma aşamasında keratinositler tarafından farklı belirteç genleri ifade edilir. 10-20 µm kalınlığındaki cildin en dış tabakası olan SC, epidermal geçirgenlik bariyerinin birincil aracıdır ve cildin işlevselliğinin %90'ından fazlasını oluşturur. Bu nedenle, SC'nin hem kimyasal hem de mikrobiyal saldırılara ve dehidratasyona karşı vücudu savunma konusundaki olağanüstü yeteneğini sürdürmesi için SC'nin uygun şekilde geliştirilmesi ve bakımı esastır. Derinin önemli bir savunma işlevi, kontrolsüz su, iyon ve serum protein kaybını önleyerek homeostazı korumaktır. SC tarafından epidermal bütünlüğü korumak için enzimatik reaksiyonlar, kommensal bakteriyel kolonizasyonu, bağışıklık sinyali, antimikrobiyal lipitler ve peptitler, düşük pH ve doğal nemlendirici faktörler dahil olmak üzere çeşitli stratejiler kullanılır. SC'nin karmaşık dokusu bu stratejilerin yürütülmesini destekler ve korneositlerden ve hücreler arası lipitlerden (seramid, kolesterol ve serbest yağ asitleri) oluşan bir matristen oluşur; her iki bileşen de keratinositlerin terminal farklılaşma sürecinden türetilmiştir.



Şekil 3. Çok yönlü deri bariyeri. (A) Epidermal bariyer bakımı ve onarımı, bazal keratinositler çoğaldıkça ve stratum spinosumda erken farklılaşmış keratinositler haline geldikçe, stratum basale'de başlar. (B) Stratum spinosumdan granülosuma geçişten sonra, karakteristik keratohyalin granülleri (KG'ler) belirginleşir ve proteolitik olarak FLG monomerlerine işlenecek ve pro-filaggrin (FLG) proteinini tutar. (C) FLG proteininden NMF üretimi, stratum corneum hidrasyonu için esastır. (D) Asit manto oluşumu, AMP'lerin ve terminal farklılaşma proteinlerinden türetilen katyonik içsel olarak düzensiz antimikrobiyal peptitlerin (CIDAMP'ler) salgılanmasının yanındaki kimyasal bariyerin bir parçasıdır. (E) Son canlı hücre katmanındaki terminal farklılaşma sonrası stratum korneumu oluşturan ve alerjenlerin ve patojenlerin pasif geçirgenliğini engelleyen fiziksel bariyer. (F) AHR, cilt bariyeri oluşumu ve işleviyle ilgili hemen hemen tüm süreçlerde yer alır (van der Bogaard ve diğerleri, 2023).

Korneositler kimyasal ve mekanik yaralanmalara karşı korumadan sorumludur; lipit matrisi su bariyerinin temel bileşenini sağlar. Epidermal bariyerin sunduğu mekanik direncin büyük kısmı korneositlerden kaynaklanır. Korneosit zarfı adı verilen bir protein kabuğu her bir korneositi çevreler; bileşenleri arasında lorikrin, involucrin ve filaggrin bulunur. Korneositin ötesinde ve onunla doğrudan temas halinde olan korneosit lipit zarfı, özel lipitlerden oluşan bir yapıdır. Bu lipitler ve protein açısından zengin korneositler, işlevsel cilt bariyerinin oluşumu için kritik öneme sahiptir.

Çeşitli çalışmalar, AD'de bir geçirgenlik bariyeri işlev bozukluğunu desteklemektedir. SC'deki toplam seramidlerin ve bağlı seramidlerin seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. Ek

olarak, AD hastalarında filaggrin, lorikrin ve involucrin gibi epidermal farklılaşmayla ilişkili moleküllerin anormal bir ifadesi gösterilmiştir ve bu moleküllerin geçirgenlik bariyeri homeostazını etkilemesi beklenmektedir (Yang ve diğerleri, 2020).

Stratum korneum, insan konakçılarını mikrobiyal istila ve alerjen/tahriş penetrasyonuna karşı korumada kritik bir rol oynar. Stratum corneum, sitokinler (örn. I-L4/IL-13), S. aureus gibi mikroplar, kirleticiler ve deterjanlar veya diğer tahriş ediciler tarafından düzensizliğe duyarlı olan keratinositlerin terminal farklılaşmasından kaynaklanır. Stratum korneumun gücü, normal ciltte serbest formda bulunan ve transglutaminaz tarafından proteinlere çapraz bağlanan protein ve lipidlerin ideal karışımına bağlıdır. İşlev kaybı mutasyonları veya artmış IL-4/IL-13 nedeniyle oluşan filaggrin eksikliğinin cilt bariyeri işlev bozukluğuna neden olduğu bulunmuştur. Son çalışmalar, diğer epidermal proteinlerin önemini ve daha da önemlisi, normal ciltte bulunan optimum molar oranda seramid, kolesterol ve serbest yağ asitlerinin göreceli konsantrasyonlarını vurgulamıştır (van den Bogaard ve diğerleri, 2023).

2.5. Lipitlerin Önemi

Epidermal lipidlerin bileşimindeki ve yapısındaki değişiklikler çeşitli cilt koşullarında bulunur. Son yıllarda, epidermal lipid bariyeri en çok dikkati AD bağlamında çekmiştir. Azaltılmış bariyer işlevi, bir Th1 / Th2 dengesizliği ile karakterize edilen ve ciltte lipid bileşimini ve bariyer işlevini etkileyebilen, şiddetli bir enflamatuvar tepkiye neden olan patojenlerin veya tahriş edici moleküllerin penetrasyonunu kolaylaştırır. (Franco ve diğerleri, 2018)

Deri bariyeri işlevi için hayati önem taşıyan, derinin en dış tabakası olan SC'daki lipid matrisidir. Deri bariyeri işlevleri epidermisten aşırı su kaybını önlemek ve çevreden gelen bileşiklerin canlı epidermal ve dermal tabakalara nüfuz etmesini ve böylece bir bağışıklık tepkisi oluşturmamasını önlemektir. SC lipid matrisinin ana lipid sınıfları kolesterol, serbest yağ asitleri ve seramidlerdir. Bu lipidler, yoğun şekilde paketlenmiş lipid katmanlarının (lipid lamelleri) oldukça düzenli, üç boyutlu bir yapıyı benimser ki bu yapıda lateral ve lameller lipid organizasyonu söz konusudur. Bu lipidlerin düzenlenme şekli lipidlerin bileşimine bağlıdır.

AD, SC'un lipid bariyerinin etkilendiği çok yaygın bir cilt hastalığıdır (van Smeden ve diğerleri, 2016).

Kronik AD'li hastaların yönetiminde, gen profillemesi ve immünohistolojik çalışmaların verileri ışığında, lezyonsuz AD'li ciltte bile, azalmış cilt bariyeri protein seviyeleri ve artmış transepidermal su kaybı ile terminal epitel farklılaşmasının subklinik enflamasyonu ve aşağı regülasyonunu ortaya çıkardığını bilmek önemlidir. Bu nedenle, hastalığın sakin dönemlerinde bile cilt bariyer tedavisini yumuşatıcı terapi şeklinde sürdürmek önemlidir (Leung ve Yassky, 2014).

Uzun zincirli, karmaşık bir yağ alkolü olan fitosfingozin bir su bağlayıcı ajan, veteriner tıbbi preparatlarında (şampuanlar, spreylere, köpükler ve spot-on) cilt bariyer onarımına yardımcı olarak kullanılmıştır. Fitosfingosin bir seramid öncüsüdür ve topikal uygulamanın ciltteki seramid konsantrasyonunu artırdığı varsayılmaktadır. İki pilot çalışmanın sonuçları, fitosfingozin içeren topikal preparatların SC lipid çift tabakasının kalınlığını artırdığını ve organizasyonunu iyileştirdiğini göstermiştir. Sfingomyelin, sfingolipid yolunda sadece sfingozin seramidlere (Cer [AS] ve Cer [NS]) yol açabilir. Enflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere patolojik koşullar altında seramidlerin ve sfingomyelinin yapısında değişiklikler gözlenmiştir. Yağ asidi kalıntılarının uzunluğundaki, hidroksilasyon durumundaki ve doyma derecesindeki değişiklikler enflamasyondan kaynaklanabilir ve ayrıca inflamatuvar uyaranlara hücrel yanıtı etkileyebilir (Franco ve diğerleri, 2018).

2.6. Mikrobiyal Enfeksiyonlar

Stafilokok türleri arasında, *S. aureus* genellikle AD'de yaygın olarak bulunur ve *S. aureus* kolonizasyonunun kapsamı AD'nin şiddetiyle ilişkilidir. AD hastalarından izole edilen *S. aureus* izolatları ayrıca daha yüksek virülans seviyeleri ifade eder. Ayrıca kolonizasyonunu ve bağışıklık kaçışını desteklemeye yardımcı olmak için biyofilm üretmeye daha fazla eğilimlidir. *S. aureus*, hem yüzeysel hem de invaziv cilt enfeksiyonlarına neden olan gram pozitif fırsatçı bir bakteridir. Enterotoksinler toksik şok sendromu toksini 1 (TSST1), ekzotoksinler, fenol çözünebilir modüller (PSM'ler) gibi süperantijenler ve AD'de cilt bariyeri disfonksiyonunun yanı sıra enflamasyonu tetikleyen proteazlar dahil olmak üzere kolonizasyonu ve virülansı teşvik eden çeşitli faktörleri ifade eder. Değişen bir cilt bariyeri, *S.*

aureus kolonizasyonuna duyarlıdır. Çünkü AD'li cildin stratum korneumunda fibronektinin yeniden dağılması nedeniyle *S. aureus* AD'li cilde tercihi bir şekilde bağlanmaktadır. Filaggrin (FLG) mutasyonları olan AD hastaları tipik olarak daha az FLG parçalanma ürünü (ürokanik asit ve pirolidon karboksilik asit vb.) barındırır ve bu da *S. aureus*'un çoğalmasını destekleyen pH'ta bir artışa yol açar. Artan pH ayrıca bağışıklık kaçışı ve yapışmasında rol oynar ve hücre duvarı ile ilişkili proteinlerin ifadesini de destekleyerek *S. aureus*'un AD'li ciltte kolonizasyonuna daha fazla yardımcı olur. Kolonizasyon sırasında, AD patogenezi yönlendiren *S. aureus* virülans faktörleri cilt bariyerinin daha fazla bozulmasına ve bağışıklık uyarımına neden olur (Koh ve diğerleri, 2022).

S. aureus yaygın olarak AD'li hastaların cildinde bulunur; rapor edilen taşıma oranları, hasta tipine, örneklem büyüklüğüne ve örnekleme ve analiz yöntemlerine bağlı olarak %30 ile %100 arasında değişirken, sağlıklı kontrol deneklerinde yaygınlık yaklaşık %20 dir. Kültür tabanlı yöntemlerle ilgili 95 gözlemsel çalışmanın yakın tarihli bir meta-analizi, AD'li hastalarda *S. aureus* taşıma prevalansının lezyonlu ciltte %70 iken, aynı hastada lezyonsuz cilt veya sağlıklı kontrol cildinde %39 olduğunu bildirmiştir. Bu meta-analizde *S. aureus* kolonizasyon oranı, hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olduğu görülmüştür. Hem lezyonlu hem de lezyonlu olmayan ciltte *S. aureus* yoğunluğunu belirleyen RT-PCR çalışmaları, daha önceki kültür temelli çalışmalardan elde edilen sonuçları doğrulayarak hastalık şiddeti ile korelasyon göstermiştir. Derin shotgun metagenomik dizileme ve 16S rRNA genlerini dizileme kullanılarak cilt mikrobiyotasının analizi, bir AD alevlenmesi sırasında mikrobiyal çeşitliliğin azaldığını göstermiştir. *Streptococcus*, *Corynebacterium* ve *Cutibacterium* cinslerinde ve *Proteobacteria filumunda* genel olarak *Staphylococcus* ve özellikle *S. aureus* cinsinde azalmalarla birlikte iltihaplı atopik deride mikrobiyom çeşitliliği azalmıştır. Shotgun metagenomik sıralama, AD'li hastaların şiddetli bir alevlenme sırasında genellikle tek bir *S. aureus* suşu ile kolonize edildiğini göstermiştir (Oh ve diğerleri, 2017).

Ek olarak *Malassezia* türleri memeli cildinde en bol bulunan mantarlardır ve AD ile ilişkilidir. *Malassezia* türleri sağlıklı ciltte kommensal olarak bulunur ancak birden fazla *Malassezia* türünün aşırı büyümesi (*Malassezia furfur* ve *Malassezia sympodialis* gibi) AD patogenezi neden olabilir. AD hastalarında *Malassezia*'ya özgü IgE seviyelerinde artış vardır ve AD şiddetinin mevcut *Malassezia* türlerinin miktarıyla bir korelasyonu mevcuttur (Koh ve diğerleri, 2022).

2.7. Antimikrobiyel Peptidler

Bir dizi endojen antimikrobiyal peptidin doğuştan gelen bağışıklıkta ayrılmaz bir rol oynadığı gösterilmiştir. Memeli derisindeki iki ana peptid sınıfı, β -Defensinler ve katelisinler, bakteriyel, fungal ve viral patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Deride keratinositler tarafından üretilen bu peptidler, hücre içi fonksiyonlara müdahale, hedef mikrobun zar veya mikrobik membranına etki eder. İnsan β -Defensin 1 (HBD-1) gibi bu peptidlerden bazılarının ekspresyonu yapısaldır, oysa insan β -Defensin 2 (HBD-2) ve bir katelisinin olan LL-37 dahil olmak üzere diğerlerinin ekspresyonu, cildin yaralanması veya iltihaplanmasıyla tetiklenir. Hayvan modelleri, antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunun veya aktivasyonunun, cildin bakteriyel enfeksiyona direnme yeteneği için gerekli olduğunu göstermiştir (Ong ve diğerleri, 2002).

Canlılar mikroorganizmalar ile mücadele edebilmek için gelişimsel olarak korunmuş çok çeşitli ve etkili antimikrobiyal peptidler (AMP) üretirler. Bu proteinler tipik olarak 10-50 aminoasit içerikli, pozitif yüklü ve amfipatik (hem hidrofilik hem de hidrofobik yüzeylere sahip) özelliktedirler. Bu proteinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin mikropların yüzeylerine bağlanıp ve zarlarında gözenekler oluşturarak antimikrobiyal etki gösterdikleri düşünülmektedir. İnsan epitel dokuları da benzer antimikrobiyal peptidleri üretir. İnsan derisinde bulunan keratinositler, mast hücreleri, nötrofiller, sebositler ve ekrin epitelial hücreler AMP'leri salgırlar. İstirahat halindeki deride tanımlanmış β -Defensinleri (HBD-1, HBD-2, HBD-3), katelisinin (LL-37), psoriasin ve RNaz 7 keratinositler tarafından, dermisinin insan ekrin hücrelerinde sentezlenir ve terde bulunur. Deride ayrıca deriyi infiltre eden diğer hücreler tarafından salgılanıp kutanöz doğal bağışık yanıtta rol oynayan diğer antimikrobiyal peptidler de mevcuttur. Bunlar ayrıca antimikotik ve antiviral etkilere de sahiptir. Bakteriler, bakteriyel ürünler, toll – benzeri reseptörler (TLR) AMP'lerin sunumunu sitokinler aracılığıyla tetikleyebilir. Enflamatuvar hücre göçü ve sitokin salınmasında da rol oynarlar. İnsan β -Defensinleri (HBD) düşük moleküler ağırlıklı, sistinden zengin, katyonik antimikrobiyal peptidlerdir. HBD-1 gram negatif bakterilere karşı etkilidir ve epidermiste sürekli sunulmaktadır. Transkripsiyonu inflamatuvar ajanlar tarafından etkilenmez. HBD-2 psoriasis lezyonlarında insan derisinde ilk keşfedilen AMP'dir. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* enfeksiyonunda sentezi artar. Tümör Nekroz Faktörü α (TNF- α) ve İnterlökin 1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinler keratinositlerde HBD-

2 transkripsiyonunu artırır. HBD-2 *P. aeruginosa* ve *E. coli* gibi gram negatif bakterilere karşı etkiliyken *S. aureus* üzerine etkisi zayıftır. *S. Aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus faeciuma* karşı HBD-3 ün güçlü bakterisidal etkiye sahiptir. Bakteri ve TNF- α ile temas keratinositlerden HBD-3 salınmasını uyarır. HBD-2 ve HBD-3 üretimini normal şartlar altında çok azken enfeksiyon, enflamasyon ve yaralanma ile artar. HBD'ler ayrıca Kemokin Reseptör (CCR) -6 aracılığı ile olgunlaşmamış dendritik hücreler, monositler ve hafıza T hücrelerini enfeksiyon bölgesine çekerek monosit ve epitel hücrelerden sitokin salınmasını uyaramaktadır.

C-terminal ucunda yapısal olarak değişken antimikrobiyal bölge içeren katelisidinler katyonik peptidlerdir. İnsan ve farede sadece bir tane gen bulunurken domuz ve sığır gibi memelilerde pek çok katelisidin geni (CAMP) bulunmaktadır. Deride bulunan keratinosit, mast hücresi, nötrofil ve ekrin bezlerin duktal hücreleri insan katelisidin antimikrobiyal protein 18 (hSAP18)i üretir. Nötrofil proteazları hSAP18'i ekstrasellüler olarak etken molekül olan Katelisidin (LL-37) 'e parçalar. LL-37 olarak isimlendirilmesinin sebebi, proteinin C-terminal ucundan salınan ve 37 aminoasit içeren iki lörin ile başlayan aktif antimikrobiyal peptid yapısındanadır. Belirgin antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkileri sebebiyle LL-37 kutanöz konak savunmasında rol oynar (Aksoy, 2013).

Atopik dermatiti olan hastalardan alınan iltihaplı deri lezyonlarının, sedef hastalarının deri lezyonlarına göre anlamlı derecede daha düşük HBD-2 ve LL-37 konsantrasyonlarına sahip olduğu görölmüştür. Her ikisi de atopik ciltte bol miktarda bulunan interlökin-4 ve interlökin-13'ün inhibitör etkileri bu bulgudan sorumlu olabilir. Ayrıca, AD'li hastalarda düşük HBD-2 ve LL-37 konsantrasyonları *S. aureus*'u öldürememiştir. Bu nedenle, enflamasyonla indüklenen antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonundaki bir eksiklik, AD'li hastaların deri enfeksiyonlarına duyarlılığını açıklayabilir. AD'de deri lokalize immün yetmezliğin varlığını ve yetersiz antimikrobiyal peptid ekspresyonu ile enfeksiyon arasındaki korelasyon, klinik hastalıkta antimikrobiyal-peptid fonksiyonunun rolüne işaret etmekte ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimi dikkate almanın önemini vurgulamaktadır (Ong ve diğeri, 2002).

Normal şartlar altında üretimi çok az olan LL-37, enfeksiyon, enflamasyon ve yaralanma ile artarken mediatör salınmasını başlatarak derinin doğal bağışık yanıtında yardımcı rol oynar. Anjiogenez ve reepitelizasyonu uyarıcı etkileri sebebiyle yara iyileşmesinde rol alır. Katelisidinler ve HBD'ler psoriaziste artmıştır. Bu antimikrobiyal

peptidlerin psoriazisdeki artmış, AD'deki azalmış üretimi süperenfeksiyonların neden psoriazisde çok ender ve AD'de çok sık görüldüğünü açıklar. Bir diğer önemli insan antimikrobiyal peptidi olan psoriasin (S100A7) bakteriyel zarların geçirgenliğini bozarak antimikrobiyal etki gösterir. Çoğunlukla seboreik ciltteki keratinositlerden salınan psoriasin bağırsak bakterisi olan *E. coli*'nin öldürülmesinde önemli rol oynar. *E. coli* flajeli tarafından TLR5 uyarılması keratinositlerden psoriasin salgılanmasını artırmaktadır. RNaz 7'nin antimikrobiyal etkisi ise ilk olarak sağlıklı insan derisinde stratum korneumdan izole edilmiştir. Sağlıklı keratinositlerde RNaz aktivitesi RNaz inhibitör proteinler tarafından engellenir. Stratum korneumdan salınan serin proteazları inhibitör proteinin ayrılmasına ve RNaz 7'nin aktive olmasına neden olur. RNaz 7 güçlü ribonukleaz etkisi vardır. *S. aureus*, *Propionibacterium acnes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *C. albicans* gibi mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye de sahiptir. İnsan keratinosit kültürlerinde IL-1 β , IFN- γ ve bakteriler RNaz 7 üretimini tetikleyebilir. Dermisidin insan ter bezleri tarafından salgılanan antimikrobiyal bir peptiddir. Dermisidin salındıktan sonra terde proteolize uğrayarak anyonik ve katyonik dermisidin peptidleri oluşur. Bu peptidler *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* ve *C. albicans*'a karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. (Aksoy, 2013).

Son çalışmalar, AD'li hastalarının derisinde HBD-2, psoriasin ve RNase 7 gibi çeşitli AMP'lerin indüklenen ekspresyonunu doğrulamaktadır. Deri yüzeyindeki AMP'lerin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla arttığı gösterilmiştir. Bu aynı zamanda immünohistokimya ile de doğrulanmıştır. Atopik lezyonlarda yüzeysel bariyer bozulması, AMP'lerin salınmasını tetikleyebilir, çünkü bant sıyrılmasına bağlı bariyer bozulması üzerine psoriasin, hBD-3 ve RNase 7 ekspresyonu artmıştır. Deneysel epidermal bariyer bozulmasından 1 saat sonra artmış psoriasin ve RNase 7 sekresyonu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, LL-37 durumunda, yakın zamanda yapılan bir çalışma, yaralı AD lezyonlarında LL-37'nin yaranalanmaya bağlı normal indüksiyonunun bastırıldığını göstermektedir. Bu, AD hastalarının cildinin, kutanöz yarananma üzerine LL-37'yi yeterince yukarı regüle edemediğini gösterir. Diğer AMP'lerin benzer şekilde davranıp davranmadığı araştırılması gereken konulardandır. AD'de indüklenmiş HBD-2 üretimi, SC'da HBD-2 varlığını araştıran iki çalışma tarafından da bildirilmiştir. Asano ve diğerleri (2008) AD hastalarının SC'da artmış miktarlarda HBD-2 tespit etti. *S. aureus* koloni sayıları ve beta-Defensin-2 seviyelerinin karşılaştırılması, pozitif bir korelasyon gösterdi, bu da azalmış HBD-2 seviyesinin *S. aureus* kolonizasyonuna karşı savunmasızlık ile ilişkili olduğunu gösterdi. Clausen ve diğerleri (2013) ayrıca AD hastalarının SC'da artmış HBD-2

konsantrasyonları tespit etmiş ve en yüksek miktarlar lezyonel deride bulunmuştur (Kopfnagel ve diğerleri, 2013).

Atopik dermatitte katelisidin, HBD-2 ve HBD-3'ün sentezlerindeki değişiklik neden *S. aureus* kolonizasyonunun sık olduğunu ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu açıklayabilir. Buna karşın bazı yazarlar tarafından atopik deride RNaz 7 ve psoriasin antimikrobiyal peptidlerinin üretiminin arttığı gösterilmiştir. LL-37 konağın DNA'sına bağlanarak kompleksler oluşturabilir, IFN üretimini tetikleyen yapıtaşları oluşturarak psoriaziste ve sistemik lupus eritematozusta plazmositoid dendritik hücre aktivasyonuna aracılık edebilir. AMP'ler otoenflamatuvar etkileriyle kutanöz enflamasyonu arttırıp hastalığı ilerletirler. Rozaseaya yatkın kişilerde keratinositlerde artmış katelisidin öncüsü hSAP18 ve stratum korneumda artmış serin proteaz enzimi bulunur. LL-37 antimikrobiyal etkilerinin yanında etkilenen cilt bölgesinde bölgesel damar genişlemesi, anjiogenez ve enflamatuvar hücrelerin uyarılması ile perivasküler ödeme neden olarak rozasea bulgularının ortaya çıkmasına ve artmasına neden olur. Ultraviyole (UV) radyasyonunun antimikrobiyal peptidlerin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum UVB radyasyonunun immünsupresif etkisine rağmen UVB ilişkili bakteriyel enfeksiyonların neden görülmediğini açıklamaktadır (Aksoy, 2013).

Tablo 2. Deri kaynaklı antimikrobiyal peptidler (Aksoy, 2013).

Antimikrobiyal peptid	Hücresel kaynak	Antimikrobiyal Etkinlik			Tetiklenebilme (örn, bakteri, sitokinler ile)
		Bakteri		Fungus	
		Gram +	Gram -		
HBD-1	Keratinositler	-	++	-	-
HBD-2	Keratinositler Havayolu epiteli Bağırsak sistemi	(+)*	+++	++	+

HBD-3	Keratinositler Havayolu epiteli	+++	+++	+++	+
HBD-4	Keratinositler Havayolu epiteli (mRNA)	++	++	+	+
LL-37	Keratinositler Havayolu epiteli Ürogenital sistem Granülositler	++	++	++	+
Psoriasin	Keratinositler Sebositler	(+)*	(++)**	(+)*	+
RNaz 7	Keratinositler Havayolu epiteli	+++	+++	+++	+
Dermsidin (DCD)-1	Ter bezleri	+++	+++	++	-
Lizozim	Keratinositler Havayolu epiteli	++	++	-	-
*Yüksek konsantrasyonda **E. coli, diğerleri yüksek konsantrasyonlarda					

Tüm bu bilgiler ele alındığında, AMP'lerin AD'deki rolü hala tartışmalıdır. AMP'lerin AD'de indüklendiğine dair net kanıtlar vardır. Bazı çalışmalar, AD'de bazı AMP'lerin indüksiyonu, salınımı veya mobilizasyonunun, kutanöz mikrobiyal kolonizasyonun yeterli

kontrolünü sağlamak için yeterli seviyelere ulaşamayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle, birkaç AMP için tanımlanan artan sayıdaki immün düzenleyici fonksiyonlar ve bunların deri hastalığının klinik seyri üzerindeki etkisi hala belirsizdir. Açıkça, AMP'lerin AD'de rolünü netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Kopfnagel ve diğerleri, 2013).

2.8. Reseptörlerin Etkisi

Deri, kirleticileri, özellikle lipofilik molekülleri emebilir. Pestisitler ve PCB'ler, ev tozunda birikebilir, bu da cilt temasının birincil yolunu temsil eder. Cilt, faz I ve faz II enzimlerine, ilaç taşıyıcılarına ve yukarı akış reseptörlerine sahip olduğu için kirleticileri metabolize etmek için tam donanımlıdır; ksenobiyotik reseptörler AHR (aril hidrokarbon reseptörü), PXR (pregnane X reseptör) ve PPAR'lar (peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptörler) ve bunların eşleri, LXR'ler (Karaciğer X reseptörleri) mevcuttur. Birçok çevresel toksik madde AHR'yi hedef alır, bu da AD'yi ortaya çıkaran potansiyel bir mekanizma olabilir. Bununla birlikte, çok sayıda çevresel kirleticisi de PXR'ye bağlanır ve onu etkinleştirir. Buna göre, araştırma grubumuz FLG (filaggrin geni) durumundan bağımsız olarak AD hastalarının cildinde ksenobiyotik metabolizmanın tetiklendiğini bulmuştur. Bununla tutarlı olarak, AD derisinde indüklenen birkaç anahtar gen, PXR ve AHR hedef genleridir. Dahası, cilt mikropları tarafından salınan metabolitler, AD semptomlarını hafifletebilecek AHR'yi de tetikleyebilir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

2.8.1. AHR (Aril Hidrokarbon Reseptörü) ve Atopik Dermatit

AHR, ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Ligandların yokluğunda AHR, sitoplazmada yer alır ve burada ısı şoku proteini 90, hepatit B virüsü X ile ilişkili protein 2 (XAP-2) ve p23 ile bir protein kompleksi oluşturur. Ligand bağlanmasından sonra AHR, sitoplazmik kompleksten ayrılır ve AHR'nin bir nükleer translokasyon sahası açığa çıkar. Daha sonra, AHR, AHR'nin AHR-nükleer translokator (ARNT) ile dimerleştiği, ksenobiyotik

duyarlı ögeler (XRE'ler) olarak adlandırılan DNA'ya yanıt veren ögeleri bağladığı ve faz I metabolize edici enzim sitokrom P450 (CYP) gibi hedef genlerin transkripsiyonunu yukarı düzenlediği çekirdeğe yer değiştirir. Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) gibi tehlikeli dioksinler, AHR'yi aktive eder ve CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1 ekspresyonunu yükseltir. Keratinositler normal şartlarda bol miktarda CYP1A1'i ve daha az oranda CYP1B1'i eksprese eder, ancak CYP1A2'yi eksprese etmez. CYP1A1, TCDD'yi metabolize etmeye çalışır, ancak CYP1A1'in sürekli çabaları başarısızdır çünkü TCDD yapısal olarak stabildir. CYP1A1'in metabolize etme süreci aşırı miktarda ROS üretir ve hücrede oksidatif hasarı tetikler. Oksidatif stres sırasında hayatta kalmak için, antioksidatif mekanizma, hücrelerde AHR aktivasyonundan sonra eşzamanlı olarak aktive edilir. AHR ligasyonu ayrıca antioksidatif transkripsiyon faktörü NRF2'yi aktive eder ve faz II antioksidatif enzimlerin (yani, glutatyon S-transferazları, hem oksijenaz 1 (HMOX1), NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1 (NQO1), glutatyon S-transferazlarının ekspresyonunu yukarı düzenler ve üridin 5'-difosfoglukuronosiltransferazlar AHR-CYP1A1-ROS indüksiyonundan sonraki proinflamatuvar sonuçların tersine, AHR-NRF2 eksenini muhtemelen antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltır. Önemli bir kemosenör olarak AHR aktivitesi, bağışıklık fonksiyonunu modüle eder. AHR ve immünolojik önemi en iyi intestinal immünolojide karakterize edilir. Enflamatuvar bağırsak hastalıklarında lezyonlu bağırsakta AHR ekspresyonu azalır. Bu bulgu, bağırsak yolunun diyet materyalleri ve mikrobiyal biyo ürünlerden türetilen zengin bir AHR ligand kaynağı olduğu gerçeğiyle güçlü bir şekilde ilişkili olabilir (Furue ve diğerleri, 2019).

AD cilt, bozulmuş bir bariyer işlevi, iltihaplanma ve disbiyoz ile karakterizedir. AHR, KC'ler (keratinositler), LC'ler (Langerhans hücreleri), T hücreleri, melanositler, fibroblastlar, mast hücreleri ve sebositler dahil olmak üzere çeşitli deri hücrelerinde ifade edilir. AHR aktivasyonunun AD'yi desteklediği veya hafiflettiği tersine gösterilmiştir. Bu nedenle AHR'nin AD patogeneziindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. AHR'nin AD'de anti-inflamatuvar etkilere karşı pro-karşıt anti-inflamatuvar etkileri, aslında, bağlama, türe ve liganda bağlı olabilir. Bazı yazarlar, AHR sinyalinin aktivasyonunun normal iltihapsız ciltte zararlı olabileceğini, ancak iltihaplı ciltte faydalı olabileceğini düşünmektedir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

AHR ve AD'deki genetik polimorfizmler arasındaki ilişkiler ile ilgili yakın zamanda yapılan bir çalışmada, iki AHR tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) (rs10249788 ve rs2066853) daha yüksek bir AD riski ile ilişkilendirilmemiştir. Bununla birlikte, bu SNP'leri taşıyan AD hastaları, ciddi kuru cilt ve alerjik rinit açısından önemli ölçüde daha yüksek bir

risk sergilediler, bu da bunların anormal bariyer işlevine katkıda bulunabileceğini ve atopinin ilerlemesinde potansiyel bir role sahip olabileceklerini düşündürmektedir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

LC' ler (Langerhans hücreleri), TSLP(timik stromal lenfopoietin) alarına yanıt olarak epidermiste bir Th2 bağışıklık tepkisi başlatarak veya alerjenler veya mikroptan türetilmiş antijenler tarafından aktivasyondan sonra AD'nin erken gelişiminde yer alan anahtar bağışıklık hücreleridir. AHR, yükseltici bölgesine doğrudan bağlanarak TSLP'nin ekspresyonunu teşvik eder ve nihai olarak AD'nin başlamasına yol açabilecek LC aktivasyonunu artırır. AHR, LC'lerde ifade edilir ve LC'ler üzerindeki etkilerine, çevreleyen KC'ler (keratinositler) tarafından TSLP veya GM-CSF'nin (granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör) salınmasından daha fazlası aracılık edebilir. LC'de AHR aktivasyonu ve PAH metabolizması DNA hasarını indükleyebilir. DNA'daki bu hasar, NF- κ B (nükleer faktör kappa B, transkripsiyon faktörü) ve COX2'nin (siklooksijenaz-2) aktivasyonunu artırarak ve AD'li hastaların epidermisinde gözlenen hücrel anormallikler olan KC'lerde IL-6 ve IL-1 α üretimini teşvik ederek anormal epidermal bariyer fonksiyonuna ve inflamasyona katkıda bulunabilir. Ayrıca, PAH'lar, partikül maddesinin neden olduğu inflamasyonun ana itici güçlerinden biri olarak tanımlanmıştır (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

PAH' lar, AHR için yüksek afiniteye sahip lipofilik moleküllerdir. Canlı epidermal katmanlara ulaşmak için stratum corneum'u kolayca geçebilirler ve burada Th2-çarpık bir enflamatuar yanıt başlatabilirler. Bu, proinflamatuvar mediyatörlerin KC' ler tarafından salınması ve LC' lerin aktivasyonu yoluyla ve AD' nin başlamasına, alevlenmesine veya semptom alevlenmesine katkıda bulunan ek immün anormallikler yoluyla olabilir. Ayrıca, AHR susturma teknolojisini ve çeşitli AHR ligandlarını kullanan çeşitli çalışmalar, AD dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda IL-22 üreten T hücrelerinin gelişiminde AHR'nin baskın rolünü göstermiştir ki bu da anormal epidermal bariyer işlevini sürdürmektedir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

AD hastalarının derisine kömür katranının topikal olarak uygulanmasının, AHR' ye bağlı bir şekilde antimikrobiyal peptitlerin yukarı regülasyonu yoluyla Staphylococcus bolluğunu azalttığını ve dolayısıyla epidermal antimikrobiyal bariyerde AHR' nin yeni bir rolü ortaya konmuştur. Dahası, bağırsak mikrobiyotası tarafından triptofan katabolizmasının bir indol türevi olan fakat aynı zamanda deri yüzeyinde bulunan indol-3-aldehit ile AHR aktivasyonunun, MC903 (kalsipotriol) tarafından indüklenen bir AD fare modelinde AD

benzeri semptomları hafiflettiği gösterilmiştir. Bu fare modelinde AD semptomlarının gelişmesine KC'lerde TSLP üretimindeki ilk artış aracılık eder, bu da LC'leri Th2 baskın deri iltihabını başlatmak için hazırlar. Indol-3 aldehitin, TSLP promotörüne AHR bağlanması yoluyla KC'lerde MC903 ile indüklenen TSLP ekspresyonunu in vivo ve in vitro inhibe ettiği bulunmuştur. Bu nedenle TSLP promotörüne AHR bağlanması, alternatif olarak TSLP ekspresyonunu teşvik edebilir veya azaltabilir, AHR'nin enflamatuvar cilt reaksiyonlarındaki ikili rolünü vurgulayabilir ve bağlamanın önemini, ligandların doğasını ve ligand afinitesini vurgular (Minzagli ve diğerleri, 2019).

AD derisinde daha düşük miktarlarda AHR anti enflamatuvar ligandları bulunduğu ve sağlıklı cildin korunmasında bu tür ligandlar tarafından AHR'nin kronik aktivasyonunun varsayılan gereksinimini ortaya koyulmaktadır. AHR aktivasyonundan sonra ciltte Th2 hücreleri tarafından IL-22 üretiminin mikrobiyal enfeksiyona karşı korunmada etkili olabileceği düşünülmektedir (Minzagli ve diğerleri, 2019).

2.8.2. Atopik Dermatitte PXR (Pregnane X Reseptör)

PXR'nin 1998'de ilk tanımlanmasından bu yana, bir ksenobiyotik reseptör olarak kanonik işlevi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. PXR, steroid, retinoid ve tiroid hormonu reseptörlerini içeren nükleer reseptör (NR) süper ailesinin bir üyesidir. NR süper ailesinin üyeleri, ligandla düzenlenen transkripsiyon faktörleri olarak işlev görür. PXR bir ksenobiyotik sensör olarak rolü iyi bilinmektedir ve PXR, ksenobiyotik metabolizmanın ana düzenleyicisi olarak kabul edilmiştir. PXR'nin bir ksenobiyotik sensör olarak tanımlanması, vücudun toksik bileşiklere karşı savunma mekanizmasının anlaşılması için çok önemli olduğunu kanıtladı ve ksenobiyotik maruziyetin farklı hastalık durumlarını nasıl etkilediğini incelemek için temel oluşturdu. Bununla birlikte, son yıllarda, PXR için kanonik ksenobiyotik algılama işlevinin ötesinde artan sayıda yeni rol tanımlanmıştır. PXR ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundaki kanonik rolünün ötesinde iltihaplanma, proliferasyon, göç, apoptoz ve DNA hasarına katılımı gibi daha az tartışılan konularda da görev almaktadır (Oladimeji ve Chen, 2018).

Derinin bozulmuş bariyer işlevi, lipofilik kirleticiler tarafından artan penetrasyona yol açabilir, böylece keratinositlerde PXR'yi tetikleyebilir ve bağışıklık hiper duyarlılığı ve bozulmuş bariyer işlevinin kısır döngüsünü sürdürür. Bu nedenle, AD özelliklerinin

tetiklenmesi, ksenobiyotik reseptörlerin sadece toksin klirensinde değil, aynı zamanda iltihaplanma ve lipid metabolizmasındaki rolü nedeniyle kirletici metabolizmasının yukarı regülasyonunun bir yan etkisi olarak ortaya çıkabilir (Elentner ve diğerleri, 2017). Derideki doğal PXR ligandları bilinmemektedir ancak progesteron ve kolesterol ve bunların türevleri, safra asitleri ve kortikosteron içerebilir. Deri, potansiyel PXR ligandları olan su, cilt bakım ürünleri ve havada bulunan çeşitli zararlı moleküllerle (örneğin pestisitler) günlük temas halindedir. PXR ligandları içeren artan hava kirletici konsantrasyonları AD ile pozitif bir şekilde ilişkilidir ve AD'li çocukların yatak odalarından toplanan tozda ftalatlar gibi endokrin bozucuların seviyeleri yükselir. Birçoğu lipofilik olan hava kirleticileri, PXR'yi etkinleştirmek için cilde nüfuz edebilir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

2.8.2.1. Yapısal PXR Aktivasyonu Epidermal Bariyerin İşlevini Bozar

Ftalatlar, pestisitler, bisfenol A ve PAH'larla cilt teması, KC'lerde oksidatif strese yol açar ve bu da cilt hastalığına dönüşebilir. Dahası, bazal KC'ler topikal olarak uygulanan kimyasalların ana hedefidir ve bu moleküllerin çoğu PXR'yi aktive eder. Böylece ciltteki PXR aktivasyonu sonuçta cilt hastalıklarına yol açabilir. Bir başka olası hipotez, AD'li derideki artmış ksenobiyotik metabolizmasının, iltihabın nedeni değil, iltihabın bir sonucu olmasıdır. Bununla birlikte, anormal epidermal bariyer işlevine sahip başka bir yaygın enflamatuvar deri hastalığı olan sedef hastalığında ilaç, kirletici veya kimyasal metabolizmada yer alan anahtar genlerin yukarı regülasyonu rapor edilmemiştir ve bu nedenle bu hipotezi ortadan kaldırmıştır. İlginç bir şekilde, ciltteki aşırı PXR ekspresyonu veya kronik aktivasyonu, CYP24'ün((25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase) yukarı regülasyonu yoluyla lokal enflamasyonu teşvik edebilir ve bu da D vitamini aktif formunun katabolizmasını artırarak AD'ye benzer bir bağışıklık tepkisini destekler (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

PXR, LC'lerde ifade edilir ve PXR eksikliğinin, LCR7'nin yukarı regülasyonu yoluyla DMBA ile topikal uygulamadan sonra lenf düğümlerini boşaltarak LC'lerin cilde geçişini teşvik ettiğini ve bunun da KC'lere daha az hasarla sonuçlandığını gösterdik. Bu sonuçlar, PXR aktivasyonunun, özellikle zararlı moleküller tarafından aktivasyondan sonra KC'ler için zararlı olabileceğini göstermektedir. Bununla tutarlı olarak, DMBA ile tedavi edilen LC'lerin CYP1B1 ve Epxh1'i düzenlediği, böylece aktif DMBA metabolitleri ürettiği ve çevreleyen KC'ler

üzerindeki toksisitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, zehirli moleküller tarafından LC'lerde PXR'nin aktivasyonunun, CYP3A4 ve CYP1B1 gibi faz I enzimlerinin yukarı regülasyonu yoluyla biyolojik aktivasyonunu tetikleyebileceği tahmin edilebilir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

PXR aktivasyonu, LC göçünü bloke ederek epidermiste aktive edilmiş moleküllerin birikmesine yol açabilir ve bunların toksisitesini artırabilir, böylece KC'ler tarafından pro-enflamatuar faktörlerin salınımı teşvik edebilir. Bu, AD için geçerlidir, çünkü hastaların serumunda ve idrarında artan 8-OHdG seviyeleri ile kanıtlandığı gibi, AD'de KC'lerde artmış DNA hasarı gözlenmiştir. Bu nedenle, çevresel kirleticiler tarafından PXR'nin aktivasyonu, epidermal bariyer fonksiyonunu bozarak ve enflamasyonu teşvik ederek AD semptomlarının gelişmesine katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, PXR'nin AD'yi tetiklediği mekanizma açıklanmayı beklemektedir ancak oksidatif stres, D vitamini, bağışıklık ve lipid metabolizması üzerindeki etkileri içerebilir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

2.8.3. Atopik Dermatitte PPAR'lar (Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptörler)

PPAR, nükleer reseptörler ve transkripsiyon faktörleridir. Bunlar PPAR α , PPAR β / δ ve PPAR γ içerir. Bu transkripsiyon faktörleri, lipidlerin oksidasyonundan sorumlu genleri kontrol eder. PPAR α , asil-CoA oksidaz ve karnitin palmitoiltransferaz I' in, yani β -oksidasyona dahil olan enzimlerin gen ekspresyonunu artıran bir transkripsiyon faktörüdür. PPAR γ , adiponektin konsantrasyonunu ve GLUT1 ve GLUT4 taşıyıcılarının ekspresyonunu artırır. PPAR β / δ , piruvat dehidrojenaz kinaz-4 ve yağ asidi oksidasyonunun yoğunluğunu artıran karnitin palmitoiltransferaz 1A ekspresyonunu artırır (Korbecki ve diğerleri, 2019).

PPAR'ların ciltteki rolü kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir. PPAR α , farklılaşma ve lipid metabolizmasına katılabileceği suprabazal KC'lerde mevcuttur. Bununla birlikte, çoğu sonuç, PPAR α ligandlarının suprafizyolojik dozları ile tedavi edilen farelerde veya insan KC'lerinde elde edilmiştir. PPAR γ ve PPAR β / δ ile ilgili benzer ifadeler yapılabilir. Çeşitli PPAR α ligandlarının topikal uygulamasının, tutarlı terapötik etkiler göstermemiş olan PPAR γ ve PPAR γ / γ ligandlarının tersine, AD hastalarında deri iltihabının azaltılmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır. AD'de PPAR α ligandlarının faydalı etkilerine, lipid metabolizması üzerindeki etkiler, KC hiperproliferasyonunun normalleşmesi ve geç KC farklılaşmasının,

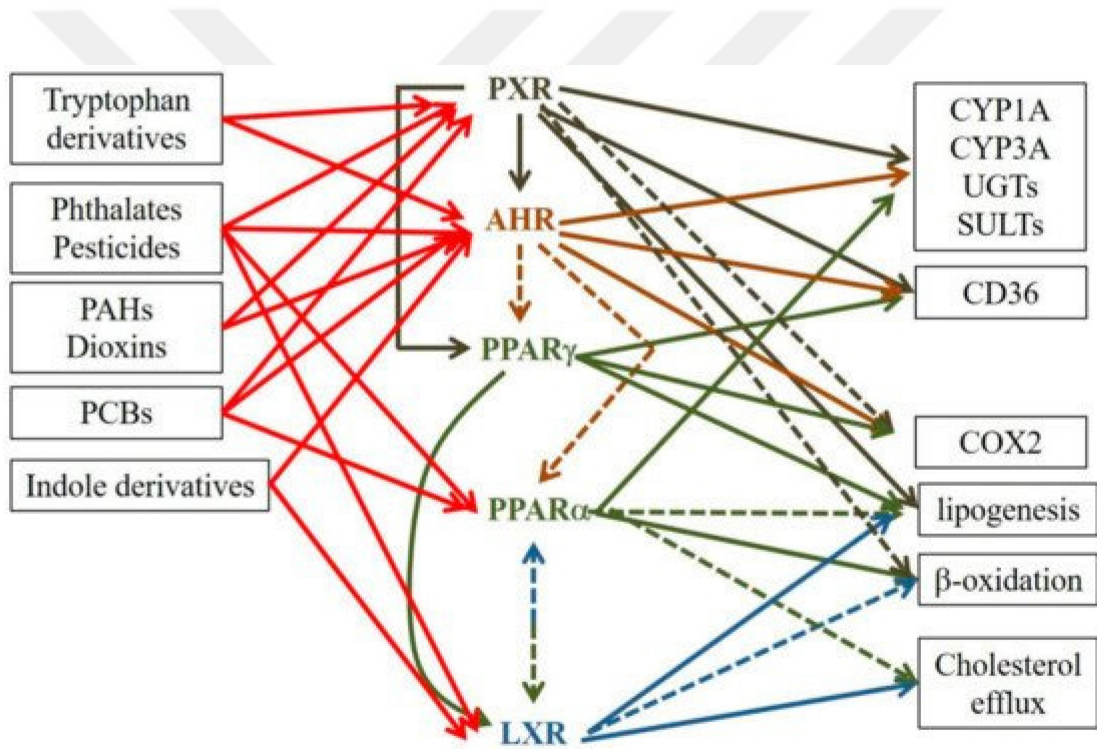
özellikle de FLG'nin artmasıyla aracılık edilir. Tüm bu süreçler ve potansiyel anti-enflamatuar etkiler epidermal bariyerin yenilenmesine katkıda bulunur. PPAR α mRNA seviyeleri, PPARG'ye benzer şekilde, sağlıklı ve lezyonsuz cilt ile karşılaştırıldığında lezyonel AD'li deride azalmıştır. Gerçekte, PPAR α hasarlı KC'lerde DAMP'ler (örneğin, HMGB1) tarafından TLR sinyalinin aktivasyonu (örn., TLR2 ve TLR4) ve ardından NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla sönümlenebilir ve bu da PPAR α ekspresyonunu inhibe ettiği bilinen proinflamatuvar mediyatörlerin salınmasına yol açar (Örneğin, IL-1p) Ayrıca, PPAR α eksikliğinin, çeşitli inflamatuvar araçların KC'ler ve bağışıklık hücreleri tarafından ekspresyonunu teşvik ederek ve Treg genişlemesini bozarak proinflamatuvar olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, lezyonel AD'deki lokal ve geçici PPAR α aşağı regülasyonu, KC'ler üzerindeki hasardan kaynaklanabilir, ancak daha sonra KC proliferasyonunu ve epidermal bariyer iyileşmesinde rol oynayan inflamatuvar araçların salınmasını destekleyerek doku rejenerasyonunu teşvik edebilir. Ancak bu etkiler, epidermiste PPAR α 'nın tüm rolünü kapsamayabilir. Ayrıca, bu bağlamda kalıcı PPAR α aşağı regülasyonunun uzun vadede cilt için zararlı olması muhtemeldir. İlginç bir şekilde, PPAR α , peroksizom proliferasyonunu indüklemek ve hücreler üzerinde zararlı etkiler uygulamak için ftalatlar, tribütin, PCB'ler, bisfenoller, DDT, perflorooktanoik asit ve perflorooktan sülfonik asit gibi ksenobiyotikler tarafından aktive edilebilir. Ayrıca, ksenobiyotik metabolizmaya dahil olan birkaç gen, PPAR α tarafından düzenlenir. Dahası, AHR ve PXR'ye benzer şekilde, PPAR ligand özellikleri, ko-aktivatörlerin görevlendirilmesini belirler ve böylece farklı metabolik tepkilere yol açar. PPAR'larla başka bir karmaşıklık düzeyi, ligandlarının "hedef dışı" mekanizmalar nedeniyle metabolik yolları doğrudan düzenleme yeteneğidir. PPAR ligandları, PPAR'ları fosforile edebilen ve transkripsiyonel aktivitelerini değiştirebilen kinazları aktive edebilir. Ayrıca, PPAR ligandları, pro-enflamatuar enzimleri (örneğin, miyeloperoksidaz) ve modülatörleri (örneğin COX-2 ve TNF-a) doğrudan inhibe ederek ciltte anti-enflamatuar etkiler uygulayabilir. Bu son nokta maalesef genellikle ihmal edilmektedir. Bu nedenle, PPAR α ligandları, AD'de sadece PPAR α 'nın aktivasyonu yoluyla değil, aynı zamanda muhtemelen tanımlanacak olan yollarda (orantısal katkısı belirlenecek olan) doğrudan etkiler yoluyla da faydalı etkiler gösterir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).

2.8.4. AD'de Ksenobiyotik Reseptör Eşleri: LXR'ler (Karaciğer X reseptörleri)

Karaciğer X reseptörleri α ve β (LXR α ve LXR β), lipid metabolizmasının transkripsiyonel kontrolünde çok önemli rollere sahip nükleer reseptörlerdir. LXR'lerin transkripsiyonel aktivitesi, yüksek hücresele kolesterol seviyelerine yanıt olarak indüklenir. LXR'ler, kolesterol emilimi, taşınması, dışarı akması, boşaltımı ve safra asitlerine dönüştürülmesinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ifadesini bağlar ve düzenler. LXR yolunun koordineli, dokuya özgü eylemleri, sistemik kolesterol homeostazını korur ve immün ve inflamatuvar yanıtları düzenler. LXR'ler ayrıca lipojenik transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1c'yi kontrol ederek yağ asidi metabolizmasını düzenler ve yağ asidi uzaması ve desatürasyonunda yer alan proteinleri kodlayan genleri düzenler. LXR'ler, fosfolipidlerin metabolizması üzerinde önemli etkiler gösterir; kolesterol ile birlikte hücresele zarların temel bileşenleridir. LXR yolunun, hücre sterol seviyelerini membran fosfolipidlerindeki yağ asitlerinin doygunluğu ile eşleştirme yeteneği, çeşitli fizyolojik süreçler için etkilere sahiptir. lipoprotein üretimi, diyetle lipid absorpsiyonu ve bağırsak kök hücre proliferasyonu dahil. LXR'lerin membran bileşimini ve işlevini nasıl düzenlediğini anlamak, düzensiz lipid metabolizması ile ilişkili hastalıklara yeni terapötik anlayışlar sağlayabilir (Wang ve Tontonoz, 2018).

Hem LXR α hem de LXR β , rollerinin daha önce gözden geçirildiği deride ifade edilir. Doğal LXR ligandları arasında ciltte bulunan oksisteroller, PUFA'lar, araşidonik asit ve PGF2 α yer alır. LXR'ler proliferasyonu inhibe eder ve KC'lerin farklılaşmasını destekler. Ayrıca, LXR aktivasyonu, anti-enflamatuvar ve anti-oksidan etkiler uygular. Bununla birlikte, epidermal bariyer işlevi ve iltihaplanma üzerindeki yararlı etkileri, şimdiye kadar lipid metabolizması üzerindeki etkilere atfedilmiştir. Bununla birlikte, insan bağışıklık hücrelerinde LXR'lerin rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve yakın zamanda gözden geçirilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, AD derisinde artmış LXR β seviyeleri olduğu, ancak LXR α seviyelerinin değişmemiş olduğu görüldü, bu da AD'de LXR β 'nın rolünü ancak LXR α 'nın olmadığını düşündürüyor. LXR'ler birincil ksenobiyotik reseptörler değildir, ancak AHR ve PXR ile etkileşimler göstermişlerdir ve bir dereceye kadar çevresel kirleticiler tarafından aktive edilirler. Ftalatlar, organofosfatlar ve fibratlar, doğal LXR ligandları olan oksisterollere benzer afinitelerle LXR α 'yı aktive edebilir ve LXR α hedef genlerinin ekspresyonunda değişiklikleri indükleyebilir. Dahası, ozon zirveleri (O₃) potansiyel olarak AD semptomlarının alevlenmesi ve astım ile ilişkilidir. Akciğerlerde O₃, LXR ile lipid-protein eklentilerinin oluşumu yoluyla proinflamatuvar etkileri en azından kısmen aracılık edilebilen O₃ türevli oksisteroller üretmek için kolesterol ile etkileşime girer. Bu, LXR sinyali azaltabilir ve anormal lipid

metabolizmasına ve olumsuz sağlık etkilerine yol açabilir. O₃'ün akciğerlerdeki etkilerinin gözlemlenmesi ciltte ve AD'de de geçerli olabilir. Bu nedenle, AD'de LXR β ekspresyonu, potansiyel olarak lipid metabolizması üzerindeki etkiler yoluyla bariyeri yeniden sağlamayı amaçlayan bir karşı etki mekanizması olarak artar. Ayrıca, LXR'yi hedefleyen ilaçlar, düşük ila hafif AD üzerinde yararlı etkiler gösterebilir ve epidermal bariyerin kalitesini iyileştirerek hastalık alevlenmelerinin önlenmesine katkıda bulunabilir (Minzaghi ve diğerleri, 2019).



Şekil 4. Reseptörler ve etkileri (Minzaghi ve diğerleri, 2019)

2.9. Plazmanın Genel Özellikleri

Fizikte plazma terimi, genellikle gaz olmak üzere kısmen iyonize bir ortamı ifade eder. Önemli olan, plazma sadece elektronlar ve çeşitli iyonlar üretmekle kalmaz, aynı zamanda yüksek kimyasal reaktiviteye ve UV yayma kabiliyetine sahip serbest radikaller ve elektronik olarak uyarılmış atomlar gibi nötr (yüksüz) atomlar ve moleküller de üretir. Gazın sıcaklığı ve bileşenleri ile elektrik alanının gücü ve darbe süresi plazmanın tam bileşimini belirler. Plazma genellikle elektrik deşarjları ile üretilir ve genellikle gaz sıcaklığına göre sınıflandırılabilir. Termal plazmada gaz sıcaklığı birkaç bin Kelvin dereceye ulaşabilir. Klinik olarak canlı dokuları dağlamak için kullanılan argon plazma pıhtılaştırıcıları gibi cihazlar, tipik olarak oda sıcaklığını çok aşan sıcaklıklarda plazmalar üretir (Kalghatgi ve diğerleri, 2011).

Plazma, uygun sıcaklık ve enerji seviyesinde uygulandığında terapötik uygulamalara sahiptir. Plazma, birçok serbest radikalin rastgele yönlerde hızla hareket etmesiyle yüksek oranda iyonize hale gelmek için moleküllerin bileşimini değiştirebilen, maddenin diğer durumlarından daha yüksek miktarda enerji içerir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Termal olmayan ya da soğuk atmosferik plazmalarda (SAP) gaz, oda sıcaklığına yakın tutulabilir. Termal olmayan plazma oluşturan elektriksel deşarjlar uzun süredir bilinmesine rağmen, klinik potansiyelleri büyük ölçüde göz ardı edilmiştir ve yakın zamana kadar uygulamalar inert yüzeylerin sterilizasyonu ile sınırlandırılmıştır (Kalghatgi ve diğerleri, 2011).

SAP'de büyük ölçüde nitrojen ve oksijen bazlı türler olan bu reaktif türlerin prokaryotik türleri inaktive ettiği ve büyük veya küçük bir hava hacminin ve onu çevreleyen yüzeylerin bütününde hızla meydana geldiği bilinmektedir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Düşük sıcaklıklarda yarı nötr iyonize gaza dayalı bir teknoloji olan SAP, şu anda mevcut kanser tedavilerine ek olarak oldukça seçici yeni bir alternatif olarak değerlendiriliyor (Volotskova ve diğerleri, 2012).

Son zamanlarda, yüzey modifikasyonu yoluyla termal olmayan atmosferik basınçlı plazmanın, canlı hücrelere ve dokulara doğrudan uygulanabileceği, bakterileri öldürdüğü ve önemli bir ısıtma olmaksızın kan pıhtılaşmasını indüklediği gösterilmiştir. Termal olmayan plazma tedavisinin ayrıca hücre proliferasyonunu desteklediği, hücre transfeksiyonunu

geliştirdiği, kök kanallarını sterilize ettiği ve muhtemelen yara iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir (Kalghatgi ve diğerleri, 2011).

SAP üretmenin bazı yollarının, havada çalıştırılırsa elektrik alanları ve akımların yanı sıra antimikrobiyal özelliklere sahip ultraviyole radyasyon ürettiği de bilinmektedir. SAP, göreceli üretim kolaylığı (belirli bir gaz gereksinimi veya basınç yeniden dağılımı olmaksızın) ve geniş spektrumlu terapötik uygulamaları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Termal olmayan plazma oluşturmak ve dokulara uygulamak için gereken cihazların basitliği ve esnekliği özellikle çekicidir. Bununla birlikte, klinik uygulamalarını tam olarak geliştirmek için termal olmayan plazmanın canlı hücreler ve dokularla etkileşime girdiği mekanizmaların anlaşılması gerekir (Kalghatgi ve diğerleri, 2011).

SAP oluşturmanın birkaç yöntemi vardır; bunlar arasında, yalıtkan bir dielektrik bariyerle birbirinden ayrılan iki elektrotun, plazma oluşturmak için havaya enerji veren bir elektrik boşalması oluşturduğu dielektrik bariyer boşalması; atmosferik basınçlı plazma jetleri, plazma oluşturmak için elektrik deşarjını taşıyan elektrotlarla çevrili bir odacıktan gazı akıtan ve bir alanda gruplandırılmış milyonlarca küçük bireysel elektrik deşarjından oluşan yüzey mikro deşarj plazmaları bulunur. Soğuk plazma oluşturmaya yönelik bu yöntemlerin her biri, yara bakımı da dahil olmak üzere belirli tıbbi uygulamalara yönelik avantajlara sahiptir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

2.10. Termal olmayan veya Soğuk Atmosferik Basınçlı Plazmanın Üretimi

Atmosferik basınçta termal olmayan plazma üretiminin birkaç farklı yöntemi bilinmektedir.

2.10.1. DBD Plazma Jeti

Bir dielektrik bariyer deşarj konfigürasyonunda üretilen bir helyum atmosferik basınçlı plazma jetidir. Alüminyum bant elektrotlar, 10 mm boşlukla ayrılmış küçük çaplı (iç çap için 2 mm ve dış çap için 4 mm) kuvars tüp üzerine sarılır. Helyum taşıyıcı gaz, kuvars tüp içinden birkaç L/dk'lık bir akış hızıyla akmaktadır. Güçlendirilmiş elektrot üzerine değişken büyüklük, tekrarlama oranı ve darbe genişliği ile yüksek voltajlı monopolar kare darbeler uygulanır. Darbeli voltaj üreten güç kaynağı, DC yüksek voltaj üreticinin çıkışında uygun bir itme-çekme katı hal devresi kullanır. Ortaya çıkan yüksek voltajlı puls üretici, yarı kare bir pozitif voltaj palsı verebilir. Yüksek voltaj sinyalinin tipik özellikleri, yükselme ve düşme süreleri için 80 ns ila birkaç yüz nanosaniye, darbe yüksekliği için 10 kV'a kadar, tekrarlama oranı için 1 Hz ila 10 kHz ve darbe genişliği için 500 ns ila 500 μ s'dir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Dielektrik Bariyer Deşarjı (DBD) en az bir elektrot olmak üzere iki elektrot arasına zamanla değişen yüksek voltajlı dalga biçiminde uygulandığında havada atmosfer basıncı oluşur, yalıtımlı akım birikmesini önler, önemli miktarda gaz ısıtması olmadan elektriksel olarak güvenli plazma oluşturur. Bu yaklaşım, termal hasar olmadan canlı dokuların doğrudan tedavisine izin verir. Plazma, yüklü parçacıklardan (elektronlar, iyonlar), elektronik olarak uyarılmış atomlardan ve moleküllerden, radikallerden ve UV fotonlarından oluşan iyonize bir gazdır. Plazma tedavisi, hücreleri veya doku yüzeyini, ozon (O₃), NO, OH radikalleri ve tekli oksijen (O₂ 1 Δ g) dahil olmak üzere aktif kısa ve uzun ömürlü nötr atomlara ve moleküllere ve hem süper oksit radikalleri gibi negatif iyonlar elektronlar hem de pozitifler dahil olmak üzere önemli miktarda yüklü parçacık akışına maruz bırakır. Termal olmayan plazma yoğunluğu, sıcaklığı ve bileşimi, plazma ürünlerini kontrol etmek için değiştirilebilir (Kalghatgi ve diğerleri, 2011).

2.10.2. Corona Plazma Jeti

Plazma jetlerinin çoğunda, plazma, sürekli bir gaz akışının ardından kurulumda enjekte edilen bir taşıyıcı gaz yardımıyla üretim bölgesinin (yani elektrotlar arası boşluk) dışına fırlatılır. Bu plazma jeti, atmosferik basınçta doğrudan ortam havasında üretilir ve herhangi bir

harici gaz giriş besleme sistemi olmadan kendi kendine fırlatılır, bu da gaz şişesine veya gaz pompalamaya gerek olmadığı için onu çok kolay taşınabilir hale getirir. Yaklaşık 1 cm uzunluğa sahip bu özel plazma jetinin tepesinde ölçülen plazma sıcaklığı 27 °C'yi geçmez (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Korona deşarjının bireysel Çin hamsteri yumurtalık CHO-K1 hücreleri ile etkileşimi, hücre yapışmasını etkiler ve hücre ayrılması 0,1 mm çap kadar küçük bir alanda yüksek hassasiyetle sağlanır. Plazma iğnesi dokudaki hücreleri manipüle etmek için kullanılabilir ve nekroz olmadan hücre apoptozisine neden olur. Enflamasyon yoktur ve bu nedenle bu yaklaşım gelecekte kanser tedavisi olarak uygulanabilir (Tanaka ve diğerleri, 2017).

Korona deşarjı, bir nokta ve bir düzlem gibi oldukça asimetric elektrotlar kullanılarak elde edilir ve anot veya katot yakınında yüksek bir elektrik alanı içerir.

Yüksek voltajlı bir güç kaynağı altında yaklaşık 20 kHz frekansta doğal tekrarlayan deşarj akımı veren özel bir korona deşarj tasarımı ile üretilir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

2.10.3. Yüzen Elektrot Olarak Canlı Doku Kullanan DBD

Başka bir taşıyıcı gaz eklenmeden ortam havasında düşük sıcaklıkta plazma üretme olasılığı daha vardır. Canlı dokuyu yüzen elektrot olarak kullanarak dielektrik bariyer deşarjlarının kurulumudur (FE-DBD kurulumu) (Yousfi ve diğerleri, 2014).

FE-DBD, elektrotlardan birinin dielektrik korumalı bir elektrot olduğu ve ikinci aktif elektrotun bir insan veya hayvan derisi veya organı olduğu koşullar altında çalışır. İnsan veya hayvan derisi veya doku yüzeyi olmadan mevcut deşarj oluşmaz. FE-DBD kurulumunda, ikinci elektrot (doku) topraklanmaz ve yüzer bir potansiyelde kalır. FE-DBD'nin çalışma prensibi son zamanlarda yazarlar tarafından detaylı olarak tartışılmıştır. Dikkat edilmesi gereken nokta, FE-DBD'nin elektriksel açıdan tamamen güvenli olduğu ve hayvan veya insan derisine uygulama için zarar vermediği gerçeğidir (Fridman ve diğerleri, 2006).

Bu kurulum, aynı zamanda elektrot görevi gören canlı dokuyu doğrudan modda (plazma jetinde olduğu gibi uzak modda değil) açığa çıkarma özelliğine sahiptir. Bu, canlı dokunun düşük sıcaklıklı plazmayı oluşturan deşarj elektrotlarından uzak olduğu önceki

plazma jet kurulumlarına karşılık gelen dolaylı maruz kalma durumundan daha yüksek bir elektrik alanı büyüklüğüne ve yüklü parçacık yoğunluğuna doğrudan maruz kaldığı anlamına gelir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

2.10.4. Yüksek Frekanslı Deşarj

Sürüş frekansı yükseltildiğinde, deşarj modu bir dielektrik bariyerden kapasite olarak eşleştirilmiş deşarlara geçer. Baskın iyonizasyon mekanizmaları, hacimsel iyonizasyon tarafından sürdürülen deşarj ile sonuçlanır ve ' α modu' olarak adlandırılır. Elektrot yüzeyinden gelen ikincil elektronlar, ağırlıklı olarak ' γ modu' adı verilen bir iyonizasyon işleminde sürdürülür (Tanaka ve diğerleri, 2017).

Tıbbi tedavi için 'KINPen' adı verilen kalem tipi, termal olmayan atmosferik basınçlı bir plazma jet kaynağı geliştirilmiştir. Plazma, topraklanmış bir halka elektrotla bağlı bir dielektrik kuvars kılcal damar tarafından korunan monte edilmiş bir iç çubuk elektrotla 1 MHz frekanslı bir sinüzoidal voltaj (2-6 kV P-P) uygulanarak üretilir. Bu plazma kaynağı, baş ve boyun tümörlü hastaları tedavi etmek için kullanılır (Tanaka ve diğerleri, 2017).

Yukarıda bahsedilen yüksek frekanslı deşarjın bir türü, hacimsel iyonizasyon ile çalıştırılır. Sürüş frekansının arttırılması, ' γ modu'na karşı ' α modu' oranını artırma eğilimindedir. Kapasitif olarak bağlı deşarjlar, elektrotların önünde kılıf oluşumu ile karakterize edilir. Esasen kılıf, bir elektrik akım sınırlayıcı olarak arkı ortadan kaldırmak için bir dielektrik görevi görür. Büyük bir ikincil elektron olan bir çalışma rejiminde ' γ moduna' geçiş, kapasitif kılıfı kırar. Bu, sabit parlama benzeri deşarj yerine kararsız bir deşarj elde eder.

Endüktif olarak kuplajlı deşarjlar da mümkündür. Atmosferik basınçlarda, kısa Debye uzunlukları ve deşarj karakteristik ölçeği küçülür. Endüktansın ölçeklendirilmesiyle, çok yüksek frekanslı 100 MHz aralıkları gibi nispeten yüksek frekanslı uyarım, endüktif kuplaj deşarjlarının üretilmesi için tipik olarak yararlıdır. Tipik olarak, 100 MHz mertebesi, deşarj için ağırlıklı olarak endüktif kuplaj için faydalıdır (Tanaka ve diğerleri, 2017).

2.10.5. Kayma Ark Deşarjları

Prensipte kayan ark deşarjları, farklı bir konfigürasyonda elektrotlar arasında bir gaz akışında hareket eden translasyonel ark deşarjlarıdır. Çevirme sırasında gaz, termal olmayan özellikler gösterene kadar soğutulur. Kayan ark deşarjları genellikle yüzeysel işlemler için veya sıvılarla temas halinde kullanılır.

2.10.6. Kalem Tipi Tsukuba Hafif Plazma

Tıp alanında hafif plazmalar açıklanmadan önce, esas olarak yaraları dağlamak için bir argon plazma pıhtılaştırıcısı kullanılarak üretilen termal plazmalar geliştirildi. Akım darbelerini kullanarak dokuyu kesmek için darbeli elektron çığ bıçağı (PEAK) adı verilen bir cerrahi alet geliştirildi. Bu cihaz, fışkırtarak aşırı kan kaybını önlemek adına sızmayı kontrol etmek ve yaradaki görünürlüğü iyileştirmek için cerrahi hemostatlarla birlikte kullanılır. Doku koterizasyonunun altında yatan fiziksel mekanizma, kanamayı durdurmak için stromal dokulardan akan bir elektrik akımı kullanmaktır. Bu, doku pıhtılaşmasını azaltarak postoperatif komplikasyonları önlemek için hafif bir plazma kaynağı kullanan minimal invaziv bir yaklaşımdır. Kalem tipi plazma kaynakları tıpta pratik kullanım için önemlidir (Tanaka ve diğerleri, 2017).

2.10.7. Nagoya Denge Dışı Atmosferik Basınç Plazması (NEAPP)

Deşarjın, dielektrik duvarların metal elektrotları sıkıştırdığı dielektrik duvarlarla çevrenmesiyle denge dışı bir atmosferik basınç plazması (NEAPP) kaynağı geliştirilmiştir. Elde edilen yüksek elektron yoğunluklu termal olmayan atmosferik basınçlı plazma kaynağı 60 Hz AC güç kaynağı tarafından uyarılır. Elektron yoğunluğu ana deşarj bölgesinde yayılan hidrojen Balmer hattının Stark genişlemesinden hesaplanır ve geleneksel plazma kaynaklarından çok daha yüksektir (Tanaka ve diğerleri, 2017).

NEAPP'nin yumurtalık kanseri hücrelerini seçici olarak öldürdüğü bildirilmiştir. Kanser tedavisi için, klinik deneylerde kullanılacak farklı tiplerde soğuk atmosferik basınçlı plazma ekipmanı geliştirilmektedir. Avantajları tanısall yaklaşımlarla kanıtlanmıştır.

Özetle, plazma kaynağı için, birçok araştırmacı tarafından bildirildiği gibi çeşitli plazma kaynağı türleri geliştirmeye devam etmektedir. Burada sınıflandırma maksimumunda plazma yoğunluğu bazında yapılmıştır. Her plazma kaynağında aslında uzay-zamansal davranışların da sergilendiğini belirtmeliyiz. Plazmanın biyomedikal uygulamalar için bir etkisini düşünmek için, plazma tanı yöntemleri davranışları iyi anlaşılması gerekir. Bu bakış açısıyla, gelecekteki araştırmalarda ileri tanı yöntemleri temelinde plazmanın bir kategorizasyonuna da ihtiyaç duyulmaktadır.

2.11. Termal Olmayan veya Soğuk Atmosferik Basınçlı Plazmanın Sağlık Sektöründeki Kullanım Alanları

Termal olmayan atmosferik basınçlı plazma, ilk geliştirilmesinden bu yana tıbbi amaçlar için uygulandı ve sterilizasyon ilk uygulama oldu. Plazma genellikle sadece yüzeyleri etkiler ve bu nedenle deri gibi insan vücudunun yüzeyi plazma için ilk insan hedefiydi. Yara iyileşmesi ve kan pıhtılaşması da plazma tıbbının uygulamalarıdır. Gen transfeksiyonu, modern moleküler biyolojide önemli bir tekniktir ve invaziv ve yüksek verimli gen transfeksiyonu yoluyla indüklenmiş pluripotent kök (iPS) hücrelerini indüklemek için termal olmayan atmosferik basınçlı plazma kullanılır. Plazma, rejeneratif tıp için de kullanılabilir.



Resim 1. Soğuk atmosferik plazma cihazı, plazma pen.

Tıbbi tedaviler için atmosferik basınçta düşük sıcaklıklı plazmaların kullanımı henüz ilk deneylerinde ve adımlarındadır. Plazma ve tıp toplulukları üzerine araştırmaları içeren çeşitli araştırmalar, örneğin yara iyileşmesi, kan pıhtılaşması ve homeostaz ve ayrıca malign hücre inaktivasyonu gibi birkaç yıldan beri başlamıştır. 'Plazma tıbbı' konusundaki bu yeni alanda yapılan bu tür araştırmalardan önce, düşük sıcaklıklı plazmanın bakterisit özelliklerinden yararlanan inert yüzeylerin sterilizasyonu ve dekontaminasyonuna ayrılmış çok sayıda araştırma çalışması vardır. Bu literatür çalışmalarının çoğu planktonik mikroorganizmaların inaktivasyonuna, bir kısmı da biyofilm tedavisine ayrılmıştır. Biyomalzeme ve doku mühendisliği alanında, örneğin plazmanın yüzey özelliklerini değiştirme ve yüzeyleri işlevselleştirme yeteneğinden yararlanan çok sayıda araştırma çalışması da vardır (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Atmosferik basınçta düşük sıcaklıklı plazmalar, canlı hücrelerle kimyasal olarak etkileşime girebilen birçok aktif türü (yükü parçacıklar, radikaller, atom ve molekül ajanları, UV radyasyonları) içerebilir. Bu tür aktif türlerle eşzamanlı olarak, örneğin canlı dokuda bulunan iyonların iyon hareketliliğini değiştirebilen ve böylece olası bir hücre tahribatına yol açan plazma tarafından kendiliğinden üretilen elektrik alanlarına sahip olmak da mümkündür. Düşük sıcaklıklı plazmaların, belirli bir yoğunlukta ve belirli bir elektrik alanı büyüklüğü altında seçici olarak şu tür türleri üretmek için ayarlanabileceğini ve/veya tasarlanabileceğini belirtmekte fayda vardır (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Aktif türler bir gaz fazında üretildiğinden, canlı dokunun tedavisinde, düşük sıcaklıklı plazmalar (daha özel olarak, yarı kararlı durumlar, UV ve ayrıca yeniden birleştirilmemiş yükü parçacıklar ve elektrik alanı gibi uzun ömürlü türler) nüfuz edebileceğinden, zorunlu olarak optimaldir. Küçük gözenekler (nano ölçekli boyuta kadar), pürüzlü yüzeylere yayılır ve hem prokaryotik hücrelere (bakteri olarak) hem de ökaryotik hücrelere (memeli hücreleri gibi bir nükleer zara sahip) ulaşır. Ayrıca, canlı dokunun düşük sıcaklıktaki plazmaya maruz kalması, yükü parçacıkların ve elektrik alanının varlığı nedeniyle gözeneklerin elektro-deformasyonuna ve hatta membran bozulmasına yol açabilir. Bu, bazı aktif farmasötik ilaçları, yararlı etkilerini verimli bir şekilde geliştirebilecekleri hücre içine doğrudan transfer etmek için ilginç bir araştırma alanı açar (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Termal olmayan plazmanın terapötik etkileri, hemostaz, vaskülarizasyon, organ yapışmasının önlenmesi ve hücre proliferasyonu dahil olmak üzere tıbbi alanlarda beklenmektedir. Kanser vücuttaki normal dokudan kaynaklanan bir iç düşmandır. Tıptaki

ilerlemelere rağmen metastatik ve tekrarlayan kanserlerin prognozu hala kötüdür. Kanser tedavisinde termal olmayan plazma uygulamasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Plazmanın proliferasyon inhibitör etkisinin mekanizması, hücrelerde reaktif nitrojen oksit türleri/reaktif oksijen türleri üretimidir. İntrinsik reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri süpürücülerinin varlığı ve tümör yüzeyinde plazmanın sığ infiltrasyonu gibi üstesinden gelinmesi gereken birkaç problem vardır. Mevcut incelemeler, şimdiye kadar netleştirilen plazma tedavisinin çalışma sonuçlarına, gelecekte uygulama olasılığına atıfta bulunmaktadır (Kajiyama ve diğerleri, 2017).

Plazma, hücrelere nüfuz etmek için yeterince enerjik parçacıklar veya fotonlar üretmediğinden, hücresel genetik materyalin etkilenmeyeceği varsayılmıştı; bununla birlikte, hücre içi ROS oluşumu, iyonlaştırıcı radyasyonun DNA hasarı ürettiği ana mekanizmadır. ROS'tan kaynaklanan DNA hasarı, bazlarda, zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlarda küçük veya hacimli modifikasyonların yanı sıra tek zincirli ve çift zincirli kırılmaları (DSB) içerir (Kajiyama ve diğerleri, 2017).

DNA hasarı, fosfatidilinositol 3-kinaz ile ilişkili kinazlar (PIKK), özellikle ataksi-telanjiectazi mutasyona uğramış (ATM), DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PK) ve ATM ve Rad3- dahil olmak üzere hücresel kinazların aktivasyonu yoluyla bir sinyaller dizisini indükler. Termal olmayan plazmanın memeli hücreleri üzerinde artan hücre proliferasyonundan apoptoza kadar çeşitli etkilere neden olduğunu ve hücre içi ROS oluşumu yoluyla DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Termal olmayan plazma tedavisi ile aktive edilen DNA hasar sinyalleme kaskadı, iyonlaştırıcı radyasyon (IR), ultraviyole (UV) veya H₂O₂ ile ilişkili olandan farklıdır (Kajiyama ve diğerleri, 2017).

Son yıllarda, bir manyetik alan ve SAP'ın biyolojik sistemlerle ayrı ayrı etkileşimleri hakkında çok sayıda rapor bulunmaktadır.

SAP, dikkat çekici özelliklerinden dolayı çok çeşitli bilimsel alanlarda kullanılmaktadır. Son on yılda, aktif türler (pozitif/negatif iyonlar, radikaller), UV radyasyonu ve geçici elektrik alanını içeren SAP'ın canlı malzeme ile kimyasal ve fiziksel reaksiyonları, agresif olmayan yeni bir tedavi olarak tıpta büyük ilgi görmüştür. Plazmanın biyotıpta en belirgin kullanım alanları bakteriyel ve fungal dekontaminasyon, kontamine dokuların sterilizasyonu, diş beyazlatma, yara iyileşmesi, dermatoloji uygulamaları ve mikrobiyal dekontaminasyondur (Pucci ve diğerleri, 2019).

2.11.1. Hastane Hijyeni

Özellikle dirençli bakterilerin (örn. MRSA) üremesi, hızlı ve verimli sterilizasyon gerektiren bir sorun teşkil etmektedir. Bunu yapabilen plazma cihazları geliştiriliyor ve beklenti, bunların büyük bir fark yaratacağı yönünde. Tabii ki, plazma sterilizasyonu hastanelerle sınırlı değil, hastane kaynaklı (hastane kaynaklı) olanların aksine toplumla ilişkili enfeksiyonlar da hızla büyüyor. Bu nedenle tüm kamu binaları, çocuk yuvaları, bakım evleri vb. böyle bir cihazdan faydalanacaktır (Kong ve diğerleri, 2009).

2.11.2. Sterilizasyon

Sterilizasyon bakterileri, virüsleri ve mantarları hedefler ve örneğin ısı, kimyasallar, ışınlama ve filtrasyon yoluyla gerçekleştirilebilir. Otoklavlar, tıbbi ve biyolojik aletleri sterilize etmek için yaygın olarak kullanılır ve yüksek basınç altında (tipik olarak 121 °C, 100 kPa'da) ısıtılmış buhar kullanır. Etilen oksit gazı yaygın bir kimyasal sterilizasyon yöntemidir ve bakterileri, virüsleri ve mantarları öldürür, ancak aynı zamanda insanlar için toksiktir ve bu nedenle kalıntı etilen oksit seviyeleri mümkün olduğunca düşük olmalıdır (Tanaka ve diğerleri, 2017).

2.11.3. Antimikrobiyal Etki

Soğuk atmosferik plazmalar (SAP) birçok tıbbi alanda kullanılmış ve umut verici bir tıbbi teknoloji haline gelmiştir. SAP üreten cihazlar güvenli ve kullanımı kolaydır ve elektronik ve mikroçiplerdeki gelişmeler sayesinde artık düşük maliyetle üretilebilir. SAP'ın birincil uygulaması, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal teknolojidir. İlaça dirençli mikroorganizmaların neden olduğu yüksek enfeksiyon insidansı ile, SAP gibi antibiyotik bazlı olmayan bir tedavi yöntemi, özellikle yara bakımı alanında büyük terapötik umut vaat ediyor (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

SAP'ın çeşitli patojenleri ortadan kaldırmadaki etkinliği üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Plazma tedavisinin uzunluğu arttıkça canlılığını kaybeden *Bacillus stratosphericus* gibi birçok bakteri plazma tedavisine tabi tutulmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda beş dakika içinde canlılığını kaybettiği ve 10 dakika sonra hiçbir eklenmiş biyofilm hücresi görülmediği ortaya konmuş; *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* ise hem planktonik hem de biyofilm formlarında önemli popülasyon azalması ve yaygın inaktivasyon göstermiştir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Candida albicans, *Candida krusei* ve *Candida glabrata*, yaygın antifungal tedavilere dirençli bazı suşları olan mantar türleridir. Plazmaların mantar hastalıklarıyla mücadelede verimli bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Plazma etkisi çoraplarda bile yayılır. Avrupa, ABD ve Japonya'da nüfusun %25-40'ını etkilediğine inanılan tinea pedis (atlet ayağı) gibi yaygın hastalıklar bu nedenle evde veya tıbbi uygulamalarda uygun plazma cihazları kullanılarak oldukça etkili bir şekilde tedavi edilebilir (Kong ve diğerleri, 2009). SAP tedavisi, hem su hem de hava ortamlarında bu mantar ajanlarına karşı önemli etkinlik göstermiştir. SAP'nin ayrıca insan norovirüsü ve MS2 virüslerini havada ve suda etkisiz hale getirmede etkili olduğu gösterilmiştir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Planktonik formda veya biyofilm olarak gruplandırılmış bakterilerin inaktivasyonuna veya öldürülmesine adanmış birçok literatür çalışması vardır. Plazma dozunun (zamanla maruz kalma gücü) ve inaktivasyon ajanlarının (UV, radikaller, yüklü parçacıklar, vb.) etkileri de literatürde tartışılmaktadır. Atmosferik basınçta düşük sıcaklıklı plazmalar tarafından üretilen aktif türlerin, öncelikle kullanılabilecek bir bakterisit veya mikrop öldürücü etkilere sahip olduğu açıktır. Şu an için, düşük sıcaklıkta plazma tedavisi kullanıldığında bakteriyel inaktivasyon durumunda eşdeğer direnç gözlenmemektedir. Atmosferik basınçtaki düşük sıcaklıklı plazmalar, ya UV yardımıyla (örneğin, taşıyıcı gazın helyum olduğu durumda) ya da UV'siz (taşıyıcı gazın hava olduğu durumda) bakteri inaktivasyonu için çok etkilidir. Ancak, inaktivasyon mekanizmaları halen araştırılmaktadır (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Ek olarak, Ebola virüsünün yayılmasıyla mücadelede askeri kullanımı araştırılmıştır ve SAP'nin böcek popülasyonlarını kontrol etmede faydalı olabileceğine dair ön kanıtlar vardır. Doğru konfigürasyonla plazma, canlı doku dahil hemen hemen her yüzeyde kullanılabilir ve hastaneler, spor salonları ve kışlalar gibi enfeksiyona açık yerlerde sayısız uygulamaya sahip olabilir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

2.11.4. Kronik Yaralar

Antimikrobiyal özelliklerine ek olarak, SAP tedavisi kutanöz mikrosirkülasyonu, monosit stimülasyonunu ve keratinosit proliferasyonunu artırarak yara iyileşmesini artırır (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Gelişmiş ülkelerdeki nüfusun yaklaşık %1'i kronik yaralardan muzdariptir. Farklı nedenler vardır, örneğin venöz hastalıklar, arter hastalıkları, diabetes mellitus, pyoderma gangraenozum, karsinom. Nüfus yaşlandıkça, görülme ihtimali artar. Yine plazmalar tedaviye yardımcı olabilir, tabii plazmaların altta yatan hastalığı tedavi etmesi pek olası değildir. Ancak bakteri ve mantar enfeksiyonlarını ortadan kaldırarak, plazmalar acıyı azaltabilir, tedaviyi destekleyebilir ve iyileşmeyi hızlandırabilir (Kong ve diğerleri, 2009).

Standart tedaviler ilk olarak mekanik irrigasyon, mekanik, antiseptik veya anti-enfektif ajanla bağlantılı kimyasal debridmandan oluşur. Ek olarak, bir yapışkan veya örtücü olmayan, genellikle açık bir yarayı desteklemek için çok verimli olmayan topikal ilaçlarla birleştirilebilir.

İkinci aşamada, yara onarımı kenarların yakınlaştırılmasına, yeniden epitelizasyona ve son olarak bir granülom tomurcuğu görünümüne dayanır. Bu granülom, yaranın iyileşmesini sağlamak için alttaki bağ dokusundan 5 ila 7 gün sonra gelişir. Konular genel iyileşmeyi teşvik etse de bu, bazen amputasyon veya sepsis gibi sistemik komplikasyonların ortaya çıkması gibi müdahalelere yol açan nihayetinde daha fazla başarısızlığı içeren tartışmalı bir yol olmaya devam etmektedir. Literatür verileri, topikal kullanımın ya etkisiz olduğunu ya da en kötü iyileşme engelleyici olduğunu göstermektedir. Yaralar, ideal tedavisi fizyolojik evrim sırasında farklı dizileri hesaba katması gereken çok faktörlü ve dinamik lezyonlardır. Bu nedenle, patofizyolojinin unsurlarını dikkate alan, bilimsel olarak sağlam yeni yaklaşımlar önermek esastır. Düşük sıcaklıklı plazmaların pleiotropik etkisi bu nedenle etkili bir yenilikçi yol oluşturabilir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Gerçekten de literatürde plazma yara iyileşmesine ayrılmış bazı ilginç makaleler vardır. Heinlin ve diğerleri (2010) venöz ülseri olan 61 yaşındaki bir hastanın düşük sıcaklıkta mikrodalga plazması ile yapılan kısa periyodik tedavinin (2 dakika/gün) sonucu gösterilmiştir. 23. günden sonra, kronik yaradan alınan sürüntü örneğinin steril çıkmasına yol açan önemli bir azalma ile sonuç muhteşemdi. Heinlin ve diğerleri (2010), bilinen bakterisit etkisi olan plazmaların, iyileşmeyi kolaylaştıran dermal ve epidermal etkilere de sahip olduğu

görülmektedir. Bununla birlikte, ne plazmalar ve canlı hücreler arasındaki etkileşim mekanizmaları ne de hücre onarımı üzerindeki plazma katalitik etkisi henüz net olarak tanımlanmadı ve analiz edilmedi. Bu, plazma dozu ve toksisitenin etkilerine ilişkin araştırmalarla birlikte daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyar (Yousfi ve diğerleri, 2014).

2.11.5. Diş Bakımı

SAP diş hekimleri tarafından dişlerin dezenfeksiyonu, dişeti fibroblast aktivitesinin arttırılması ve hatta diş beyazlatma için kullanılmıştır (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

65 yaşın üzerindekiilerin %23'ü ve hamile kadınların %75'inden fazlası periodontal enfeksiyonlardan muzdariptir. Bu enfeksiyonlar, sırayla, kalp hastalıkları ve diğer tıbbi komplikasyon riskini artırır. Plazmalar, diş ve diş eti arasındaki mikroskobik açıklıklara nüfuz etme yetenekleriyle, normal diş bakımına ek olarak profilaktik tedavi için ideal adaylar gibi görünmektedir (Kong ve diğerleri, 2009).

2.11.6. Deri Hastalıkları

Dermatolojik problemlerin çoğu bakteri veya mantar (yan) etkilerle ilişkilidir. Akneiform döküntüler, dermatit, melanositik, kaşıntılı ve vasküler ile ilgili rahatsızlıklara kadar değişen binin üzerinde cilt hastalığı vardır. Plazmaların (mevcut teknolojiye dayanarak) bu tür hastalıkları iyileştirme olasılığı düşük olsa da, bakteri ve mantarlar yoluyla komplikasyonları azaltmaya yardımcı olabilirler. Gelecekte, plazmaların "moleküler ilaç taşıyıcı ajan" haline gelmesiyle, bazı hastalıkların tedavileri bile mümkün hale gelebilir (Kong ve diğerleri, 2009).

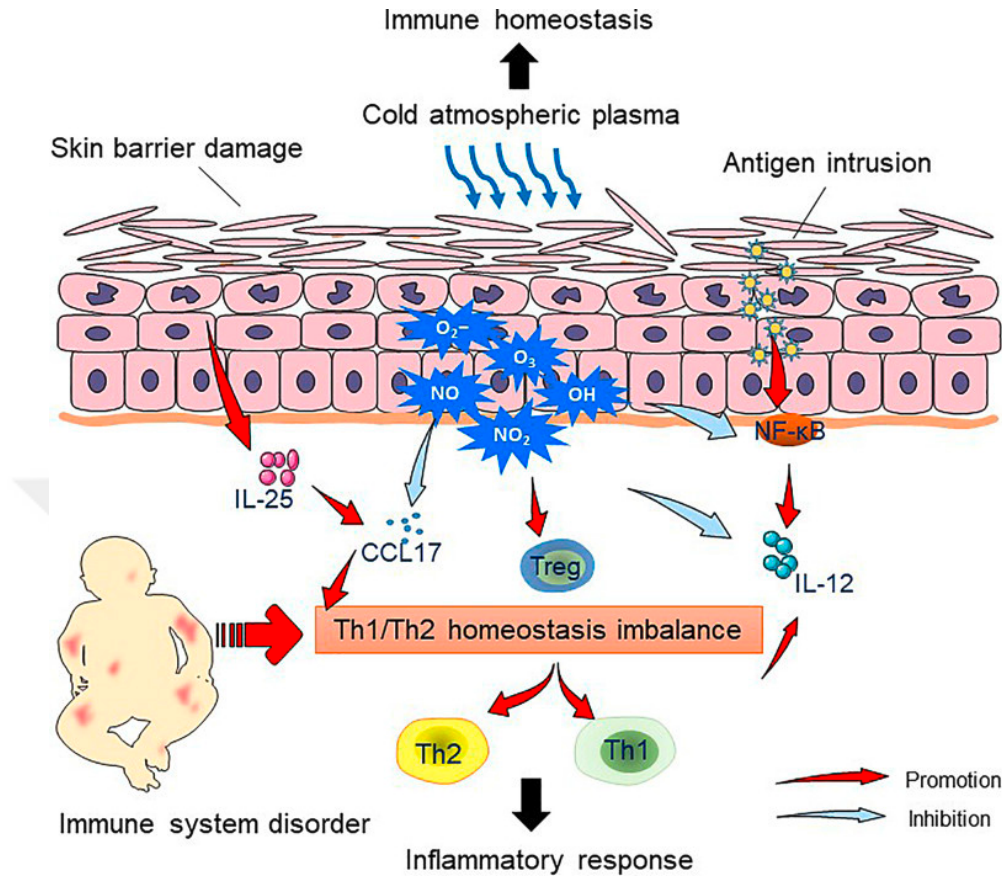
SAP'ın insan derisinin lipid bileşimi üzerindeki etkileri en son X-ışını fotoelektron spektroskopisi teknolojisi kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar SAP'ın deri bariyerinin lipid stokiometrisini önemli ölçüde değiştirebileceğini, toplam karbon içeriğini %76,7'ye düşürebileceğini ve oksijen içeriğini %16,5'e çıkarabileceğini göstermiştir. Azot içeriği de %6,8'e hafifçe artmıştır. Değişiklikler iktiyozis veya AD gibi bozulmuş deri bariyeri

hastalıklarının tedavisinde faydalı olabilir. Diğer çalışmalar insan derisinin soğuk plazmaya toleransını araştırmış ve plazmanın deri bariyer fonksiyonu üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Üç farklı plazma kaynağının (darbeli, darbesiz APPJ ve DBD) deri tarafından iyi tolere edildiği ve deri bariyerine zarar vermediği bulunmuştur. Dokuya dayanıklı elektriksel plazmanın in vivo uygulanmasından sonra 7 sağlıklı gönüllünün deri fizyolojik parametreleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar TEWL'nin geri dönüşümlülüğünün plazma tedavisinden sonra arttığını göstermiştir; ancak, dokuya dayanıklı elektriksel plazmanın SC'nin derin tabakasındaki su içeriği üzerinde neredeyse hiç etkisi olmadı. Ek olarak, SAP ön işleminden sonra, ilaçlara karşı cilt geçirgenliği arttı. Cilt bariyeri üzerine yapılan SAP çalışmalarının sayısı sınırlı olsa da, mevcut sonuç plazmanın cilt bariyerinde kesin bir hasara neden olmadığı ve cilt bariyeri işlevi bozulmuş hastalıkların iyileşmesi için faydalı olabileceğidir (Bai ve diğerleri, 2023).

Tıbbi Yenilik ve Teknoloji Derneği'nin (SMIT) 2008 20. Uluslararası Konferansı'nda sunulan bir vaka çalışması, 30 günlük bir süre boyunca sağ kola uygulanan temel tedaviye kıyasla sol kola günlük bir dakikalık SAP tedavisinden sonra kaşıntıda dört saat boyunca bir azalma ve genel olarak kaşıntıda 0 ila 10 arasında bir ölçekte 8'den 3'e kadar bir azalma gösterdi. Hiçbir yan etki gözlenmedi ve genel olarak, bu hastanın egzaması -5 ila +5 arasındaki bir ölçekte iki puan azaldı. Bununla birlikte, toplam 46 hastada kaşıntı için atmosferik termal olmayan argon plazmasının etkinliği ve güvenliği üzerine randomize, iki taraflı plasebo kontrollü bir çalışma, plazma ile tedavi edilen ve plasebo ile tedavi edilen gruplar arasında kaşıntı açısından benzer bir iyileşme gösterdi. Bu çalışmada, hastalara günlük olarak iki dakika boyunca plazma veya sadece argon (plasebo) tedavisi uygulandı. Çalışmanın sonunda, muhtemelen standart tedaviye bağlı olan kaşıntıda bir azalma gözlemlendi. Bu çalışmalar göz önüne alındığında, SAP'ın atopik egzama, kaşıntı ve ağrı üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmektedir (Bernhardt ve diğerleri, 2019).

Bir dizi in vitro ve in vivo deney yoluyla, SAP'nin güçlü anti-enfeksiyon, bağışıklık düzenleme ve cilt bariyeri iyileştirme işlevlerinin potansiyel değeri kademeli olarak doğrulandı ve tıbbi-biyolojik toplulukta bir araştırma merkezi haline geldi. SAP tarafından aracılık edilen inflamatuvar faktörleri, hücreler arası iletişimi, bağışıklık tepkisini ve sinyal iletimini engellemenin etkileri yaygın olarak incelendi ve kullanıldı. Ek olarak, SAP tarafından ilaca dirençli bakteri ve mantarların inaktivasyonu yara iyileşmesinde benzersiz bir rol oynar. Kronik inflamatuvar bir cilt hastalığı olan AD hastaları cilt mikrobiyal enfeksiyonu, bağışıklık bozukluğu, cilt bariyeri kaybı ve diğer sorunlardan muzdariptir. Bu nedenle, SAP'nin AD'nin

klirik tedavisinde kullanılabileceği makul bir şekilde tahmin edilmektedir (Bai ve diğerleri, 2023).



şekil 5. SAP'nin AD üzerindeki olası immünomodülatör etkisi. SAP, ROS ve RNS gibi çeşitli aktif partiküller üreterek bağışıklık fonksiyonlarını düzenler. NF-κB aktivitesini inhibe eder, sitokin veya kemokin ekspresyonunu azaltır ve düzenleyici T hücrelerinin fonksiyonunu artırarak bağışıklık homeostazını ve toleransını korur.

2.11.7. Kozmetik

Dokunun kozmetik olarak yeniden yapılandırılması için plazma tedavisinin yanı sıra nitrojen plazmaları kullanılarak cilt gençleştirme tartışıldı. Diş beyazlatma, esas olarak yerinde hidrojen peroksit üretimi nedeniyle plazmalar tarafından da artırılır (Kong ve diğerleri, 2009).

2.11.8. Koagülasyon

Son çalışmalar, düşük sıcaklıklı plazma cihazlarının hem in vitro (bir kan damlası kullanarak) hem de in vivo SKH1 fareleri kullanılarak hayvan deneyi) trombosit aktivasyonunu tetikleyerek kan pıhtılaşmasını hızlandırmak için kullanılabileceğini göstermiştir. Düşük sıcaklıktaki plazma ile kan pıhtılaşmasının çeşitli senaryolarını araştırılmış ve plazma kan pıhtılaşmasının, daha önce pıhtılaşmayı başlattığı düşünülen faktörler olan kalsiyum iyonlarının salınımını içermediği veya kanın pH seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, düşük sıcaklıklı plazmaların desteklediği ayrıntılı pıhtılaşma mekanizmalarının büyük ölçüde bilinmediğini de vurgulanmaktadır (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Ayrıca hedeflenen uygulama sonrasında hem pıhtılaşmanın hem de antikoagülasyonun hızlandırılması gerekebilir. Örneğin bir yaralanma durumunda öncelikle kan akışının durdurulması gerekir. Ancak, depolanan kan durumunda, pıhtılaşmanın önlenmesi, depolanan kanın olası bakteriyel veya viral enfeksiyonu ile birlikte bir ön koşuldur. Örneğin NO türlerinin trombosit aktivasyonunu engelleyebilecek antikoagülasyon özellikleri bulunurken, diğer aktif türlerin (UV, radikaller, uyarılmış türler) bakterisit etkileri olduğu bilinmektedir. Düşük sıcaklıklı plazmaları, depolanan kanın hem pıhtılaşmasını hem de enfeksiyonunu önlemek için böyle bir rol oynamalarına izin verecek şekilde ayarlamak mümkün müdür? Taşıyıcı gaz olarak helyum veya argon kullanan plazma jeti iyi bir aday olabilir mi, çünkü örneğin oksijen atomları açıkça tespit edilirken NOc (UVC yayan) ve ayrıca OH(A-X) (UVB yayan) söndürülmez (Yousfi ve diğerleri, 2014).

İn vitro ve in vivo SAP tedavisine hücre yanıtında reaktif oksijen türleri (ROS) önemli rol oynamaktadır. SAP'ın canlı doku üzerinde sterilizasyon, yara iyileşmesi, hücre göçü değişiklikleri, protein ifadesindeki değişiklikler gibi farklı düzeyde etkileri gösterilmiştir. Plazmanın farklı etkilerinin çeşitliliği, SAP'ın karmaşık kimyasal bileşimi ve SAP'nin oluşturulma şeklindeki varyasyonlarla açıklanabilir. Aslında SAP, çeşitli ROS, reaktif nitrojen türleri, yük parçacıkları vb. içeren bir kokteyldir. Bu çeşitlilik, yukarıda bahsedilen sayısız etkiye yol açar. Çoğu çalışma, belirli bir ilgi konusu uygulama ile ilgili bireysel etkileri ele

alırken, hücre tepkileri ve hücre içi dinamikleri ilişkilendiren az sayıda çalışma vardır (Volotskova ve diğerleri, 2012).

Plazmadaki düşük sıcaklıktaki aktif türlerin, biyo-ortam ile kimyasal reaksiyonlar yoluyla çok çeşitli uygulamalar sağladığına inanılmaktadır. Son yıllarda, yaygın anti-kanser modalitelerinin büyük yan etkileri ve düşük etkinliği, yeni agresif olmayan kanser tedavi yöntemlerine yönelik araştırmaları motive etmiştir. Bu alanda kanser hücrelerinin plazma sitotoksik potansiyeli ve seçici etkisi son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. SAP'ın hava ile etkileşimi ile oluşturulan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) biyolojik sistemde gözlenen etkilere neden olduğu varsayılmıştır. Bu reaktif türlerin proteinler ve lipidlerle etkileşime girdiği bilinmektedir (Pucci ve diğerleri, 2019).

2.11.9. Kanser Tedavisi

Kanser, tedavisi çok zor olan, zaman zaman komplike tedavi yöntemleri uygulanmasına karşın sonuç alınamayan üstüne üstlük bu tedavi yöntemlerinden kaynaklı sağlıklı doku ve hücrelerin zarar görmesine yol açan bir hastalıktır.

Kanser tedavisinde amaç, "hücre ölüm yolu" veya apoptoz olarak adlandırılan mekanizmayı yürütmek için hücreleri tetiklemektir. Kanser tedavisinde büyük bir engel, bir tümör içindeki kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklerken çevreleyen normal dokuyu korumaktır. Kanser hücreleri için seçici olan tedavilerin geliştirilmesinde ilerleme kaydedilirken, kanser tedavisinin dokulardaki normal hücrelere verdiği hasar onkolojide önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda, yeni geliştirilen soğuk atmosferik veya termal olmayan plazmaların (SAP'ler) kanser için alternatif tedaviler olarak kullanılabileceği bildirildi. SAP tedavisi lokal olarak uygulandığında tümör boyutunun küçülebileceği in vivo olarak gösterilmiştir. SAP etkisinin in vitro analizi, kanser hücrelerinin apoptoz nedeniyle öldüğünü ortaya çıkarmıştır (Volotskova ve diğerleri, 2012).

SAP, antitümör terapötik ajanların etkinliğini artırarak, apoptotik yolları yeniden etkinleştirerek veya büyüme ile ilgili gen bölgelerini aşağı regüle ederek tümör büyümesiyle mücadele edebilir (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Literatürde gösterilen düşük sıcaklıklı plazmaların pro-apoptotik kapasitesi, altıdan bir kanserin bakterisit veya viral kökenli olduğunu bilerek, bu tür plazmaları, potansiyel bir inflamatuvar olmayan antikanser tedavisi veya önleme aracı olarak teşvik eder. Aslında, birkaç pilot araştırma çalışması, düşük sıcaklıktaki plazmaların apoptozu ve ayrıca kültürlenmiş melanom hücrelerinin ve karaciğer kanseri hücrelerinin nekrozunu indüklemeye kabiliyetini göstermiştir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

FE-DBD plazması kullanılarak insan melanom cilt kanseri hücrelerinin etkisiz hale getirildiğini gösterilmiştir, düşük plazma dozlarının, hücreleri çevreleyen çözeltiyi 'zehirleyerek' değil, doğrudan hücreler üzerindeki plazmanın doğrudan etkisiyle apoptotik davranışı teşvik etmek için yeterli olduğunu görülmüştür. Ortam havasında belirli bir DBD tasarımı ile üretilen düşük plazma dozunu kullandılar. Küçük bir moleküler oksijen katkı maddesi ile argon taşıyıcı ile çaprazlanmış bir DBD plazma iğnesi kullanarak, kültürlenmiş karaciğer kanseri hücrelerinin canlılığının oksijen konsantrasyonuna bağlı olduğunu gösterilmiştir. Bu analizlerden, OH ve O radikalleri, malign karaciğer hücrelerinin apoptozundan sorumlu plazma türleridir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Statik manyetik alanın (SMF) biyolojik sistem üzerindeki etkisi, yıllardır biyofizik araştırmacılarının ilgilendiği bir konu olmuştur. Eşsiz bir özellik olarak, SMF'lerin korunması kolay değildir ve herhangi bir biyolojik sisteme kolayca nüfuz edebilir. Manyetik alanın iyileştirici özellikleri, yara iyileşmesi ve bakteriyel deaktivasyon dahil olmak üzere çeşitli tıbbi alanlarda görülmüştür. Sadri ve diğerlerinin bulgusuna dayanarak, 24 mT'ye kadar SMF'ye maruz kalma (yerel olarak tasarlanmış bir SMF üretici kullanılarak) mezenkimal kök hücre hizalamasını ve çoğalma hızını etkiler. Manyetik alanın kanser hücreleri üzerindeki terapötik etkisi de son on yılda incelenmiştir. Artık alanın yoğunluğunun ve eğiminin tedavi sonuçlarını etkileyen iki ana faktör olduğuna inanıyoruz. Öte yandan, C vitamini insan diyetinde çok önemli bir besin maddesi olarak bilinir ve hücre aktivitesini detoksifiye etme gibi biyolojik fonksiyonlarda anahtar aktif madde olarak görev yapar. Önceki çalışmalar, C vitamininin hem antioksidan hem de prooksidatif aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir. Askorbik asit, hücre durumuna bağlı olarak ROS ve RNS'yi söndürerek veya uyararak oksidatif stres seviyesini kontrol eder. Önceki çalışmalar, askorbik asidin H₂O₂ oluşumu için bir ön ilaç olarak ve kansere bağlı hastalığa karşı terapötik bir ajan olarak hareket ettiğini ileri sürdü. (Pucci ve diğerleri, 2019)

2.12. Termal olmayan veya Soğuk Atmosferik Basıncılı Plazmanın In-Vitro Çalışmalarda Kansere Hücre Hattına Etkileri

Plazmanın terapötik etkisi, belirli bir kanser türü ile sınırlı değildir ve tüm tümör türleri için sabittir. Dış uyarıya yanıt olarak pasif hücre ölümü olan nekrozun aksine, apoptoz aktif hücre ölümüdür. Apoptotik hücre ölümü, proliferasyon kontrol sisteminde yönetilen ve ayarlanan bir mekanizma olarak kabul edildiğinden, çevreleyen dokunun iltihaplanması eşlik etmez (Kajiyama ve diğerleri, 2017).

Soğuk atmosferik plazmanın (SAP) kanser tedavisi için alternatif bir araç olarak kullanılabileceği hücresel düzeyde gösterilmiştir. SAP'nin hücreler üzerindeki etkisi, hücrelerin belirli bir güçle işlendiği sürenin uzunluğuna, kimyasal bileşime (helyum akışına dayalı jet) ve tedavi edilen popülasyon içindeki S-fazında olan hücre sayısına bağlıdır. Normal cilt hücrelerinin, kanser hücrelerine kıyasla hücre döngüsünün S fazında olma olasılığı daha düşüktür. Ne olursa olsun, hafif SAP tedavisi ile göç hızları ve canlılıkları geçici olarak azalır (Volotskova ve diğerleri, 2012).

Çeşitli kanser türlerinde yürütülen in-vitro çalışmalarda meme kanseri, skuamöz hücreli karsinoma, kolon kanseri, pankreas kanseri, servikal tümörler, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, melanoma, glioblastoma, lenfoma, akciğer kanseri, osteosarkomlar, mide kanseri, tiroid kanseri, oral tümörler, lösemi, baş ve boyun tümörleri, karaciğer kanseri ve mesane tümörü gibi hastalıklar üzerinde SAP etkisine bakılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda SAP'nin antitümöral etkinliğinin olduğu ve onkolojide bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

2.13. Düşük Sıcaklıkta Plazma Toksisitesi ve Yan Etkileri

UVC maruziyetinin Avrupa Birliği tarafından izin verilen maksimum 30 lW/cm² değeriyle düzenlendiğini belirtmek önemlidir, çünkü 260 nm civarında UVC radyasyonunun aynı DNA zincirinde bitişik iki bitişik molekül arasında reaksiyonları başlattığı bilinmektedir. Yüksek UV dozu için, bu tür reaksiyonlar, hücre replikasyonu sırasında mutasyona neden olabilen dimer oluşumu nedeniyle DNA hasarına yol açar.

Düşük plazma sıcaklığının canlı doku ile etkileşime girmesi durumunda, memeli hücrelerini herhangi bir potansiyel hasardan korumak için karşılaştırılabilir bir düzenleme yoktur çünkü araştırmalar halen devam etmektedir. Aslında, her spesifik biyomedikal uygulama için plazma dozunu ayarlamak için dikkatli ve kapsamlı testler gerekir; bu, örneğin yara iyileşmesi durumunda, bir yandan bakterisit etkiyi diğer yandan rejenerasyon etkisini akılcıca birleştirebilir. Bu yazarlar hiçbir zaman yan etki gözlemlenmediğini ve plazma tedavisinin hastalar tarafından iyi tolere edildiğini bildirmektedir. Ayrıca, hayvan derisi üzerinde düşük sıcaklıkta plazma maruziyetinin olası hasarını gözlemlemek için tüysüz fareler üzerinde bir dizi test bildirilmiştir. Histolojik çalışmalardan, 0,6 W/cm²'de 10 dakikalık bir dozun tüysüz fareler için kabul edilebilir olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Yousfi ve diğerleri, 2014).

Atmosferik plazma kullanılan sağlık hizmetleriyle ilgili araştırmaların çoğu son 15 yılda yapılmıştır; alan nispeten genç ve ek araştırmaya ve mevcut destekleyici literatürün doğrulanmasına ihtiyaç duyuyor (Izadjoo ve diğerleri, 2018).

Bu alanda yapılmış çok sayıda çalışmadan yola çıktığımızda görüyoruz ki termal olmayan ya da soğuk atmosferik plazma, sağlık sektöründe gelişmekte olan bir tedavi yöntemi olabilir. Hayvan sağlığı alanında SAP'ın etkileriyle ilgili çalışmaların artırılması ve veteriner sağlık sektöründe kullanımının yaygınlaşarak hem hayvanlara hem veteriner hekimlere yarar sağlaması olasıdır.

Tüm bunlardan yola çıkarak bu çalışmada deneysel olarak Atopik Dermatit (AD) oluşturulan ratlarda SAP uygulamasının bazı moleküler belirteçler üzerindeki etkisini incelemek amaçlanmıştır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Bu çalışmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (HADYEK) 64583101/2022/82 sayı ve 18.08.2022 tarihli etik kurul onayı alındı. Deneyler, Ekim 2023 ve Ocak 2024 tarihlerinde gerçekleştirildi. Uygulama için yeni doğmuş ratlar kullanıldı. Deney sürecinde hayvanlar ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi' nde bulunan, uygun ortam koşullarını taşıyan odalarda (Isı $24\pm$ °C; ışık 12 saat aydınlık/12 saat karanlık) tutuldu. Ratların yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Her bir kafeste, rastgele seçilen 7'şer rat olacak şekilde yerleştirildi. Ratların günlük bakımları her gün 10:30-12:00 saatlerinde yapıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Atopik Dermatitin İndüklenmesi: 9 Ekim 2023 tarihinde dişi ratlar gebe bırakılmak üzere 3 erkek rat ile aynı kafese konulup gebelik süreci için gözlem ve takip başlatıldı.

Sırasıyla 1 Kasım 2023, 4 Kasım 2023, 5 Kasım 2023, 11 Kasım 2023 ve 22 Kasım 2023 tarihlerinde doğumu gerçekleşen bebek ratlara ilk 24 saat içerisinde subkutan yolla boynunun orta hattından ve arkaya doğru kapsaisin enjeksiyon uygulaması yapıldı. Kapsaisin çözeltisi, Han ve diğerlerinin (2017) tanımladığı metoda uygun olarak 5 mg/mL hazırlandı. 15 mL'lik tüpe 1 mL Tween 80 ve 1 mL %100 etanole 50 mg kapsaisin eklendi, 8 mL fizyolojik tuzlu su ilave edilip iyice karıştırılarak elde edildi.

Şiddetli solunum depresyonuna neden olabileceği için anestezi yapılmadan uygulamalar gerçekleştirildi. Solunum baskılanması riskine yönelik tüm uygulamalar oksijen kabininde gerçekleştirildi. Yapılan uygulamalar sonrasında lezyon oluşumu için gözlem sürecine girildi, bu süreçte yenidoğan ratların rutin bakımları yapıldı. 6 hafta sonra lezyonlar şekillendi. AD'nin şiddeti, eritem/hemoraji, ödem, pul/kuruluk ve ekskoriasyon/erozyon derecesinden oluşan bir Dermatit Şiddet Skoru (DSS) kullanılarak değerlendirildi. Her kategori için 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) puanları gözlemci tarafından verildi. Her rat için, DSS üç bağımsız araştırmacı tarafından değerlendirilerek ortalaması kullanıldı.

Çalışmada üç deneme grubu bulunmaktadır.

1-Normal Kontrol Grubu: (NK) (N=8)

2-Atopik Dermatit Grubu: (AD) (N=8)

3-Atopik Dermatit+Soğuk Atmosferik Plazma Grubu: (AD+SAP) (N=8)

SAP cihazı: PetCellpen® (ActivCell Group; Lenzburg, Switzerland) isimli direkt SAP cihazı kullanıldı.

SAP Tedavisi: AD oluşturulan 3. gruptaki ratlara 26 Aralık 2023 günü ilk SAP uygulaması gerçekleştirildi. Tedaviler dorsal bölgede iki farklı alanda ve baş bölgesi dahil kulak çevrelerinde 3 er dakikalık uygulamalar şeklinde yapıldı. 26, 28, 30 Aralık ve 1, 5 Ocak tarihlerinde olmak üzere 5 kez SAP uygulaması gerçekleştirildi. Son uygulama sonrası 4. Günde 9 Ocak 2024 tarihinde kan ve doku örnekleri alındı.

3.2.2. Serum ve doku örneklerinin hazırlanması

Uygulamalar tamamlandığında tüm gruplardaki ratlardan kan örnekleri genel anestezi altında kalp içi enjeksiyonla toplandı. Servikal dislokasyonla ötenazi uygulandı. Uygun şekilde çıkarılan deri dokusu örnekleri, gen ekspresyonu (mRNA izolasyonu) analizlerinde kullanılmak üzere RNeasy solüsyonu içeren tüplerde -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

Ratlardan alınan kan örnekleri bekletilmeden 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu örnekler Elisa analizleri için porsiyonlara ayrıldı. Analiz yapılmaya kadar -20° C'de bekletildi. Her analiz için dondurulmuş serum örnekleri 1 kez çözündürüldü.

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

IgE, IL-4 ve IL-13 rat spesifik ELISA kitleriyle Microplate Reader Optic Ivymen System 2100-C, İspanya cihazında yapıldı.

3.2.3.1. Kontrol, AD, SAP Gruplarındaki Ratlardan Alınan Kan Örneklerinden Yapılan IgE Analizi

Bu analizde uygulanan test prensibi Sandwich enzim immünoassay'dir. Bu analizde sağlanan mikrotitre plakası, Rat IgE'ye özgü bir antikora önceden kaplıdır. Standartlar veya örnekler uygun mikrotitre plakası kuyularına eklendi ve ardından Rat IgE'ye özgü bir biyotin-konjuge antikor eklendi. Daha sonra, her bir mikro plaka kuyusuna Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin eklendi ve inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, yalnızca Rat IgE, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyular renk değişikliği gösterdi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk değişikliği 450nm±10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Daha sonra örneklerdeki Rat IgE konsantrasyonu, örneklerin optik dansitesinin standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlendi.

Reaktif Hazırlama

1. Kullanmadan önce tüm kit bileşenleri ve numuneleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Analize başlamadan hemen önce tüm bileşenler çözündürülüp iyice karıştırıldı.
2. 25× Yıkama Tamponu çift damıtılmış Su ile 1× Yıkama Tamponuna seyreltildi.
3. Standard çalışma solusyonu 1000g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Standart 1,0 mL Standart Diluent Buffer ile sulandırıldı, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilip, köpürmeyecek

şekilde çalkalandı. 0,5 mL Standart Seyreltici Tamponu içeren 7 tüp hazırlandı ve seyreltme serisi hazırlandı. Seyreltilmiş Standart için 2000 ng/mL, 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL olarak ayarlandı ve Standart Seyrelticili son tüp boş olarak 0 ng/mL kabul edildi.

4. Stok Biyotinil Antikor ve Streptavidin-HRP kısa süre vortekslendi. Sırasıyla Biyotinil Antikor Seyreltici ve HRP Seyreltici ile çalışma konsantrasyonunun 100 katına kadar seyreltilti.

5. TMB Substrat Solüsyonu -Sterilize uçlarla solüsyonun gerekli dozajı aspire edilip hazırlandı.

Örnekleri Hazırlama

Önceden porsiyonlanmış örnekler oda sıcaklığına getirilip çözündürüldü.

Test Prosedürü

1. Seyreltilmiş Standart, Boş ve Numune için kuyucuklar belirlendi. Uygun kuyucuklara her birinden 100 µL Standart Çalışma Çözeltisi veya 100 µL numune eklendi. Plaka Kapağı ile kapatılıp 37°C'de 80 dakika inkübe edildi.

2. Kuyucuktaki sıvı boşaltıldı. Çözelti aspire edildi ve her kuyucuk 200 µL 1× Yıkama Çözeltisi ile yıkandı ve 1-2 dakika bekletildi. Plakada kalan sıvı tüm kuyucuklardan tamamen çıkarıldı. 3 kez tamamen yıkama uygulandı. Son yıkamadan sonra Plaka ters çevirildi ve emici kağıda bastırıldı.

3. Her kuyuya 100 µL Biyotinlenmiş Antikor Çalışma Çözeltisi eklendi, kuyuları Plaka ile örtülüp 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

4. 2. adımda yapıldığı gibi aspirasyon ve yıkama işlemi toplam 3 kez uygulandı.

5. Her bir kuyuya 100 µL Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenilip, kuyular plaka kapatıcıyla kapatıldı ve 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

6. 2. adımda yapıldığı gibi aspirasyon ve yıkama işlemi toplam 5 kez uygulandı.

7. Her bir kuyuya 90 µL TMB Substrat Solüsyonu eklendi. Yeni bir Plaka Kapağı ile kapatılıp karanlıkta 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. Sıvı, TMB Substrat Solüsyonu eklendiğinde mavi renk oluşumu gözlemlendi.

8. Her bir kuyuya 50 µL Durdurma Reaktifi eklendi. Durdurma Reaktifi eklendiğinde sarı renk gözlemlendi.

9. Önceden çalıştırılan plaka okuyucusunda derhal 450 nm'de ölçüm yapıldı.

Sonuçların Hesaplanması

Her Standart, Kontrol ve Numune için tekrarlanan okumaların ortalaması alındı ve ortalama sıfır Standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Y ekseninde Rat IgE konsantrasyonu ve x ekseninde absorbans ile bir Standart eğri oluşturuldu.

3.2.3.2. Kontrol, AD, SAP Gruplarındaki Ratlardan Alınan Kan Örneklerinden Yapılan IL-13 Analizi

Bu analizde sağlanan mikro plaka, IL4'e özgü bir antikorla önceden kaplıdır. Daha sonra standartlar veya örnekler, IL4'e özgü bir biyotin-konjuge antikorla uygun mikro plaka kuyularına eklendi. Daha sonra, her bir mikro plaka kuyusuna Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin eklenir ve inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, yalnızca IL4, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyular renk değişikliği gösterdi. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk değişikliği 450 nm $\pm$ 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra örneklerdeki IL4 konsantrasyonu, örneklerin optik dansitesinin standart eğriyle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

Reaktif Hazırlama

1. Tüm kit bileşenlerini ve numuneleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.
2. Standard 1,0 mL Standart Seyreltici ile sulandırıldı, oda sıcaklığında 10 dakika bekletilip, hafifçe çalkalandı (köpürmeyecek şekilde). Stok solüsyonu 1.000pg/mL'ye kadar seyreltildi. Daha sonra 0,5 mL Standart Seyreltici içeren 7 tüp hazırlandı ve çift dilüsyon serisi oluşturuldu. Bir sonraki transferden önce her tüp iyice karıştırıldı. 1.000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL, 31,2pg/mL, 15,6pg/mL olarak 7 seyreltilmiş standart ayarlandı ve Standart Seyreltici son tüp boş Opg/mL olarak kabul edildi.

3. Saptama reaktifi A ve Saptama reaktifi B stokları teste başlamadan önce kısa süre santrifüj edildi ve sırasıyla Test Seyreltici A ve B ile çalışma konsantrasyonuna 100 kat seyreltildi.
4. 600 mL Yıkama Solüsyonu (1x) hazırlamak için 20 mL Yıkama Solüsyonu konsantresi (30x) 580 mL deiyonize veya damıtılmış suyla seyreltildi.
5. TMB substratı sterilize edilmiş uçlarla çözeltinin gerekli dozajı hazırlandı.

Örnekleri Hazırlama

Önceden porsiyonlanmış örnekler oda sıcaklığına getirilip çözündürüldü.

Test Prosedürü

1. Seyreltilmiş standart, kör ve numune için kuyucuklar belirlendi. Uygun kuyucuklara standart dilüsyonların kör ve örneklerin her birine 100µL eklendi. Plaka kapatıcıyla örtülüp 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Her bir kuyucuğun sıvısı boşaltıldı.
3. Her kuyucuğa 100µL Tespit Reaktifi A çalışma solüsyonu eklendi, kuyucuklar plaka kapatıcıyla kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
4. Solüsyon aspire edildi ve çok kanallı pipet kullanarak her kuyucuk 350µL 1x Yıkama Solüsyonu ile yıkandı. Plakayı emici kağıt üzerine oturtularak kalan sıvı tüm kuyucuklardan tamamen çıkarıldı. Tamamen 3 kez yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra, kalan Yıkama Tamponu boşaltarak çıkarıldı.
5. Her bir kuyucuğa 100uL Saptama Reaktifi B çalışma solüsyonu eklendi, kuyucuklar plaka kapatıcıyla kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Yıkama işlemi 4. adımda yapıldığı gibi toplam 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 90µL Substrat Solüsyonu eklendi. Substrat Solüsyonu eklendiğinde mavi renk gözlemlendi. Yeni bir Plaka kapatıcıyla örtülüp 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi. Işıktan korundu.
8. Her kuyucuğa 50µL Durdurma Solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sıvı sarıya döndü.
9. Mikroplaka okuyucuyu çalıştırıldı ve ölçümü hemen 450 nm'de gerçekleştirildi.

Sonuçların Hesaplanması

Her standart, kontrol ve numune için tekrarlanan okumaların ortalaması alındı ve ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Y ekseninde IL4 konsantrasyonu ve x ekseninde absorbans ile standart bir eğri oluşturuldu. Noktalar arasında en uygun eğri çizildi.

3.2.3.3. Kontrol, AD, SAP Gruplarındaki Ratlardan Alınan Kan Örneklerinden Yapılan IL-4 Analizi

Bu analizde kullanılan mikro plaka, IL4'e özgü bir antikorla önceden kaplıdır. Standartlar veya örnekler daha sonra IL4'e özgü bir biyotin-konjuge antikorla uygun mikro plaka kuyularına eklendi. Daha sonra, her bir mikro plaka kuyusuna Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin eklenir ve inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra, yalnızca IL4, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyularda renk değişimi görüldü. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk değişimi $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Daha sonra örneklerdeki IL4 konsantrasyonu, örneklerin optik dansitesinin standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlendi.

Reaktif Hazırlama:

1. Kullanmadan önce tüm kit bileşenleri ve örnekler oda sıcaklığına ($18-25^{\circ}\text{C}$) getirildi.
2. Standartı 1,0 mL Standart Seyreltici ile seyreltilip, oda sıcaklığında 10 dakika tutuldu, hafifçe çalkalandı. 1.000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL, 31,2pg/mL, 15,6pg/mL gibi 7 adet seyreltilmiş standart noktası ayarlandı ve Standart Seyrelticili son EP tüpleri 0pg/mL olarak boş hazırlandı.
3. Kullanmadan önce Tespit A ve Tespit B stokları kısaca santrifüj edildi. Bunlar sırasıyla Assay Seyreltici A ve B ile çalışma konsantrasyonuna 100 kat seyreltildi.
4. 20 mL Yıkama Çözeltisi konsantresini 580 mL deiyonize veya damıtılmış suyla seyrelterek 600 mL Yıkama Çözeltisi hazırlandı.
5. TMB substratı sterilize uçlarla çözeltinin gerekli dozajı aspire edildi.

Örnekleri Hazırlama

Önceden porsiyonlanmış örnekler oda sıcaklığına getirilip çözündürüldü.

Test Prosedürü

1. Seyreltilmiş standart, blank ve numune için kuyucukları belirlendi. Standart için 7 kuyucuk, blank için 1 kuyucuk hazırlandı.

Standartın, blank ve numunelerin her birinden 100 µL seyreltme eklendi ve uygun kuyucuklara konuldu. Plaka kapatıcı ile kapatılıp 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

2. Her kuyucuğun sıvısı boşaltıldı.

3. Her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent A çalışma solüsyonu eklendi, kuyucukları plaka kapatıcı ile kapatıp ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

4. Solüsyonu aspire edip her kuyucuğa 350 µL 1× Yıkama Solüsyonu ile çok kanallı pipet kullanarak yıkandı ve 1~2 dakika bekletildi. Plakayı emici kağıda vurarak kalan sıvı tüm kuyucuklardan tamamen çıkarıldı. 3 kez bu işlem uygulandı.

5. Her bir kuyuya 100 µL Detection Reagent B çalışma solüsyonu eklendi, kuyuları plaka kapatıcıyla kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

6. 4. adımda gerçekleştirildiği gibi aspirasyon/yıkama işlemi toplam 5 kez tekrarlandı.

7. Her bir kuyuya 90 µL Substrat Solüsyonu eklendi. Yeni bir Plaka kapatıcıyla kapatıp 37°C'de 10-20 dakika inkübe edildi, Sıvı, Substrat Solüsyonu eklendiğinde maviye döndü.

8. Her bir kuyuya 50 µL Stop Solüsyonu eklendi. Sıvı, Stop solüsyonu eklendiğinde sarıya dönüştü.

9. Mikro plaka okuyucuyu çalıştırılıp ve hemen 450nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

Sonuçların Hesaplanması

Her standart, kontrol ve numune için tekrarlanan okumaların ortalamasını alın ve ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Y ekseninde IL4 konsantrasyonu ve x ekseninde absorbans ile bir standart eğri oluşturuldu. Noktalar arasında en uygun eğriyi çizildi.

3.2.4. Real Time PCR Analizleri

3.2.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için aşağıda (Tablo 3) markası, adı ve katalog numarası verilen materyaller kullanılmıştır.

Tablo 3. mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri

mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri		
Kullanılan Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
GeneAll	RiboEx	301-001
GeneAll	Hybrid-R	305-101

RNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Doku örneği santrifüj edilip, süpernatantı uzaklaştırıldı. Dokular homojenize edilerek üzerine 1 mL RiboEx eklenerek vortekslendi.
2. Oda ısısında 5 dk. inkübe edildi.
3. Karışım 11.000rpm, 10 dk., 4°C koşullarında santrifüj yapıldı ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışım üzerine 200 µL kloroform eklendi karıştırıldı, 2 dk. inkübe edildi.
5. +4°C de 12.000×g'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı.
6. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılarak karıştırıldı.
7. 700 µL karışım kolona aktarıldı.
8. 10.000×g'de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
9. Karışımdan kalan miktar olması durumunda 7-8 işlemler tekrarlandı.

10. Kolon üzerine 500 µL SW1 Buffer eklendi.
11. 10.000×g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
12. Kolon üzerine 500 µL RNW Buffer eklendi.
13. 10.000×g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
14. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
15. Kolon üzerine 50 µL RNase-free su eklendi ve 1dk. oda sıcaklığında bekletildi.
16. Sonra 10.000×g de 1 dk. santrifüj yapılarak elde edilen RNA örnekleri -80°C sıcaklıkta donduruldu.

3.2.4.2. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda (Tablo 4) belirtildi.

Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan materyal bilgileri

cDNA Sentezi İçin Kullanılan Materyal Bilgileri		
Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
ABT	A.B.T. TM cDNA Synthesis Kit with Rnase Inh. (High SAPacity)	C03-01-05

1.cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri Tablo 5'te belirtildi.

Tablo 5. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri

Bileşen	Hacim
10X Reaction Buffer	2 µl
20X dNTP mix	1 µl

Random hexamer	2 µl
RTase	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
Numune	10 µl
Total	20 µl

cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. Bu işlem ProFlex Thermalcycler cihazında gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Tablo 6’da belirtildi.

Tablo 6. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları

cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları				
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk.	120 dk.	5 dk.	-

Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta donduruldu.

3.2.4.3. Real-Time qPCR

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçildi. Real-Time qPCR için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası Tablo 7’ de belirtildi.

Tablo 7. Real-Time qPCR için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası

Real-Time qPCR İçin Kullanılan Materyal Bilgileri		
Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
ABT	A.B.T. TM 2X SYBR Mastermix	Q03-01-05

Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri Tablo 8 ve Tablo 9’ da belirtildi.

Tablo 8. Kullanılan primer adı, primer dizisi ve sentezleyen firma bilgisi

Primer Adı	Primer Dizisi	Sentezleyen Firma
Camp-f	AGGACCCAGATACTCCCAAG	Bioligo
Camp-r	GTCCCCATACACTGCTTCAC	
PPAR α -f	GTGGAGTCCTGGAAGTGAAGC	
PPAR α -r	AGCACCAATCTGTGATGACAAC	
Ahr-f	GATTTTGAACGATCCCTGC	
Ahr-r	TCCCTGTAGAAAGCCCTTA	
Defensin beta 1-f	TTGGACGCAGAACAGATCAA	
Defensin beta 1-r	TCAAACCACTGTCAACTCCTG	
Defensin beta 2-f	AGGGTTCTGTCTCAATGCTG	
Defensin beta 2-r	CGTGCTTCCTTCCAATCATCT	
β -aktin-f	ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	
β -aktin-r	GGTCATCTTTTCACGGTTGG	
Gapdh-f	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	
Gapdh-r	GGTCAATGAAGGGGTCGTT	

Tablo 9. Gen isimleri ile birlikte forward ve reverse primer dizileri bilgileri

Gen adı	F primer 5'→3'	R primer 5'→3'
cathelicidin antimicrobial peptide (Camp) NM_001100724.1	AGGACCCAGATACTCCCAAG	GTCCCCATACACTGCTTCAC
peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α), NM_013196.2	GTGGAGTCCTGGAAGTGAAGC	AGCACCAATCTGTGATGACAAC
aryl hydrocarbon receptor (Ahr), NM_001308254.1	GATTTTGAACGATCCCTGC	TCCCTGTAGAAAGCCCTTA
Defensin beta 1 NM_031810.2	TTGGACGCAGAACAGATCAA	TCAAACCACTGTCAACTCCTG
Defensin beta 2 NM_001037507.2	AGGGTTCTGTCTCAATGCTG	CGTGCTTCCTTCCAATCATCT
β -aktin NM_03114 4.3	ATGGTGGGTATGGGTCAGAA	GGTCATCTTTTCACGGTTGG
glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (Gapdh) NM_017008.4	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	GGTCAATGAAGGGGTCGTT

Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri Tablo 10’da belirtildi.

Tablo 10. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bileşen ve hacimleri

Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	
MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl
ROX Dye	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA Template	4 µl
RNase-Free Distilled Water	3 µl
PLAM	20 µl

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçildi. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 11’de belirtildi. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ QuantStudio5 Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 11. Real-time qPCR reaksiyon aşamaları ve gerçekleştiği koşullar

Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları			
PCR Step	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Initial Denaturation	95	300 sn.	1
Denature	95	15 sn.	40
Anneal	60	60 sn.	

3.2.4.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması

mRNA ekspresyonları kontrol gurubuna göre normalize edildi. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi” kullanılmıştır. $\Delta\Delta C_t$ hesaplaması aşağı açıklandığı şekilde gerçekleştirildi;

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans mRNA için Real-Time PCR sonucunda C_t değerleri elde edilmiştir. Teknik tekrarlı çalışmalarda C_t değerlerinin ortalaması alınarak hesaplama devam edildi.
2. Hedef grupta hedef mRNA C_t değerinden referans RNA C_t değeri çıkarılarak hedef grup ΔC_t değerleri elde edildi.

3. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup Δ Ct değerleri elde edildi.
4. Hedef grup Δ Ct değerlerinden referans grup Δ Ct değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri elde edildi.
5. $\Delta\Delta$ Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Copy Number) hesaplanması yapıldı.
6. Fold Change değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlandı. Fold Change değeri 1'in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlandı.

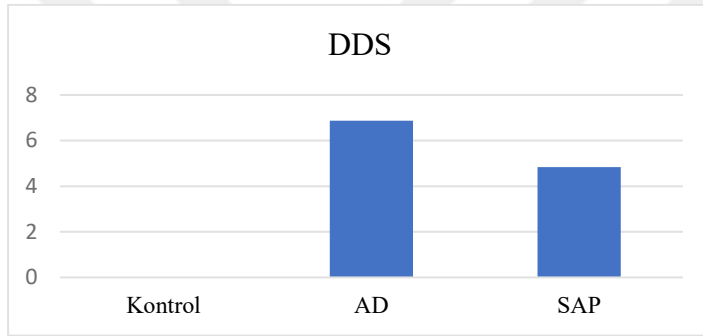
3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versiyon 26 kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak incelendi. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değerlerin analizi one-way ANOVA ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen ve skorlama yapılan değerlerin analizi ise Kruskal Wallis ile yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. Atopik Dermatit Şiddet Skoru (DSS)

AD'nin şiddeti, eritem/kanama, ödem, pullanma/kuruluk ve eksskoriasyon/erozyon derecesinden oluşan Dermatit Şiddet Puanı (DSS) kullanılarak değerlendirildi (Moon ve diğerleri 2021). Her kategori için gözlemci tarafından 0 (hiç), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) puanı verildi. Dört kategorinin toplamı genel dermatit şiddetini temsil etti. Her rat için DSS, üç bağımsız araştırmacı tarafından değerlendirildi. Analiz için ortalama toplam DSS puanları kullanıldı (Şekil 6).



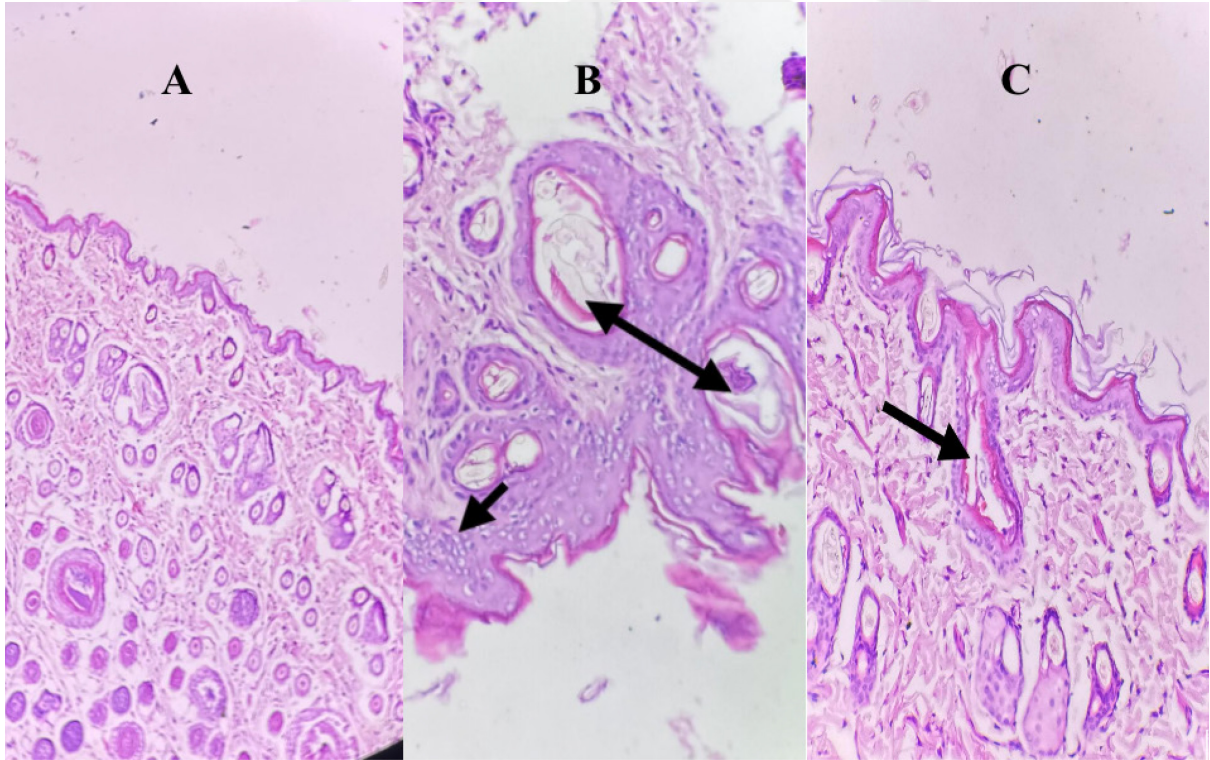
Şekil 6. Kontrol, Atopik Dermatitis (AD) ve Aoğuk Atmosferik Plazma Tedavisi (SAP) uygulanmış grupların toplam DSS sonuçları

Kontrol grubundaki (AD olmayan) grupta DSS, 0 iken; plazma tedavisi olmadan atopik dermatit oluşturulan AD grubunda 6,87 ve soğuk atmosferik plazma ile tedavi edilen SAP grubunda ise 4,83 olarak belirlendi. Ortalama DSS skorlarının SAP grubunda azaldığı görüldü.



Resim 2. Atopik dermatitli ratların lezyonları

4.2. Histopatolojik Bulgular



Şekil 7. Histopatolojik bulgular mikroskopik görüntü. A: Normal deri (Kontrol) H:E, x100 B: Atopik Dermatitis (AD). Yüzeyde ve kıl folliküllerinde keratinizasyon (çift ok), epitelde spongiöz dejenerasyon H:E, x200, C: Soğuk atmosferik plazma (SAP) Retelerde derinleşme H:E, x200.

Tablo 12. Gruplara ait deri örneklerinden yapılan histopatolojik inceleme skorları ortalaması

GRUP	Keratin artışı	Epitelde Spongioz dejenerasyon	Kıl Folliküllerinde atrofi	Retelerde derinleşme	Eozinofil lökosit
Kontrol	1	0	0	0	0
AD	1,5	1,5	1	1	0,5
SAP	1	1	0	0,5	0,5

0: Yok 1: Minimal 2: Orta 3: Şiddetli

Kontrol grubuna ait deri örneklerinden yapılan seri kesitlerde incelenen materyalde yüzeyde normal lamellar keratin, 1-2 sıralı epitelle döşeli epidermis, dermada olağan kıl follikülleri, kısa kalın kollojenler izlendi. Hücre infiltrasyonu saptanmadı. AD oluşturulmuş gruptaki örneklerde epidermisde spongioz dejenerasyon, hafif keratin artışı ve az sayıda eozinofil lökosit görüldü. Kıl kolliküllerinde hafif atrofi ve kayıp vardı. SAP grubuna ait örneklerde keratinizasyonda hafif artış, mikropapillar proliferasyonlar ve retelere derinleşme gözlemlendi. Dermisde tek tük eozinofiller lökositler seçildi Epidermisde spongioz dejenerasyon vardı.

4.3.Biyokimyasal Bulgular

Kontrol, AD, SAP grubundaki ratlardan alınan kan örneklerinden yapılan IgE, IL-13 ve IL-4 analizleri sonucu elde edilen verilerin ortalama düzeyleri Tablo 13’ de sunuldu.

Tablo 13. Kontrol, Atopik Dermatit (AD) ve Soğuk Atmosferik Plazma (SAP) gruplarının İmmunglobulin E (IgE), İnterlökin -13 (IL-13) ve İnterlökin-4 (IL4) sonuçları

Parametreler	Kontrol (n=8)	AD (n=8)	SAP (n=8)	P
IgE (ng/mL)	15,41±1,76 ^b	22,03±1,54 ^a	19,38±2,51 ^{ab}	0,082
IL-13 (pg/ml)	17,86±0,41 ^b	20,57±1,22 ^a	14,53±0,62 ^c	0,000
IL-4 (pg/mL)	37,79±3,12	44,28±6,61	42,12±2,39	0,630

(Ortalama±Standart hata), ^{ab}: aynı satırda farklı harfler taşıyan gruplar arası fark önemli.

Yapılan istatistiki değerlendirmede AD grubu ratların ortalama IgE düzeyleri kontrol ve SAP grubundan yüksek olarak belirlendi. En düşük IgE düzeyi kontrol grubu ratlarda tespit edilirken AD ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiki anlamda önemli bulundu (P=0,082). SAP tedavisi grubunda IgE konsantrasyonu kontrolden yüksek, AD grubundan düşük olarak ölçüldü ancak aradaki fark istatistiki olarak anlamlı değildi. IL-13 düzeyi AD grubundaki ratlarda kontrol ve SAP tedavisi uygulanan gruptan istatistiki olarak anlamlı (P=0,000) düzeyde yüksek olarak saptandı. IL-13 düzeyi SAP grubunda AD grubundan düşük, kontrolden ise yüksek olarak ölçüldü. Tedavi grubunda IL- 4 düzeyi en yüksek AD grubunda saptandı, tedavi grubunda IL-4 düzeyinin düşüş eğilimine geçtiği gözlemlendi ancak bu değişiklik istatistiki açıdan anlamlı bulunmadı.

4.4.Genlerin Kantitatif Ekspresyon Düzeyleri

Atopik Dermatitin patogenezinde önemli rol oynayan antimikrobiyel peptidlerden Defensin 1, Defensin-2 ve katelisidin (LL-37) ile reseptörlerden Aril Hidrokarbon reseptörü (AHR) ve lipidlerin oksidasyonundan sorumlu genleri kontrol eden Peroksizom Proliferatör ile Aktive olan reseptörlerden (PPAR) PPAR α 'nın ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu amaçla Kontrol, AD ve SAP tedavisi uygulanan ratlardan alınan deri örneklerinden mRNA izolasyonları gerçekleştirildi bunlardan elde edilen cDNA örneklerinden spesifik primerler kullanılarak Syber green metodu ile gen ekspresyonları belirlendi. Genlerin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri sonucu belirlenen Ct değerleri Pfaffl metodu kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları hesaplandı ve sonuçlar Tablo 14' de sunuldu.

Tablo 14. Kontrol, Atopik Dermatit (AD) ve Soğuk Atmosferik Plazma (SAP) gruplarının LL-37, AHR, Defensin-1, Defensin 2 ve PPAR α gen ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

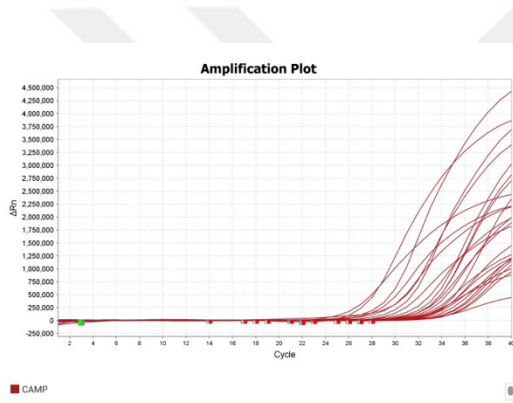
Parametreler	Kontrol (n=8)	AD (n=8)	SAP (n=8)	P
LL-37 (Katelisidin antimikrobiyel peptid-KAMP)	1,41 $\pm$ 0,39	1,45 $\pm$ 0,50	0,49 $\pm$ 0,10	0,131
Arilhidrokarbon reseptörü (AHR)	1,63 $\pm$ 0,43 ^a	0,30 $\pm$ 0,09 ^b	0,89 $\pm$ 0,16 ^{ab}	0,009
Defensin-1	1,35 $\pm$ 0,33	0,90 $\pm$ 0,16	0,91 $\pm$ 0,29	0,439
Defensin-2	1,26 $\pm$ 0,24 ^a	0,44 $\pm$ 0,12 ^b	1,04 $\pm$ 0,14 ^{ac}	0,012
PPAR α	1,35 $\pm$ 0,30 ^{ab}	2,72 $\pm$ 0,79 ^a	0,66 $\pm$ 0,24 ^b	0,029

(Ortalama $\pm$ Standart hata), ^{abc}: Aynı satırda farklı harfler taşıyan gruplar arası fark önemli.

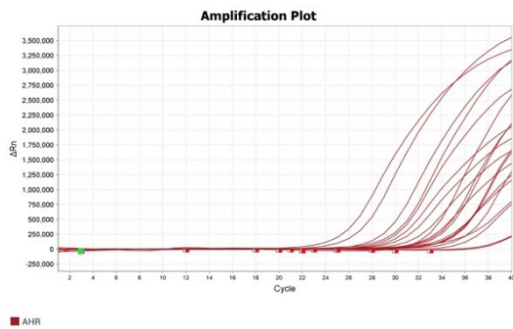
AD, SAP ve kontrol grubunda LL-37 (KAMP) geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde gruplar arası istatistiki bir fark saptanamadı. AHR gen ifadenmesinin AD uygulanan grupta anlamlı derecede azaldığı ve kontrol grubundan daha düşük ifadelendiği

belirlendi. SAP tedavi grubu ile kontrol grubu AHR ifadenmesi arasında fark bulundu. Defensin-1 geninin gruplar arası ifadenme düzeyleri arasında fark bulunamadı. Defensin-2 gen ekspresyonu ise AD grubunda kontrol ve SAP tedavi grubundan düşük belirlendi. SAP grubu ve AD grubu arasında gen ekspresyonları arasında da fark belirlendi. PPAR α geninde ise SAP tedavi grubunda diğer gruplardan düşük ifadelendiği belirlendi. AD grubu PPAR α gen ekspresyonunun diğer gruplardan yüksek olduğu görüldü.

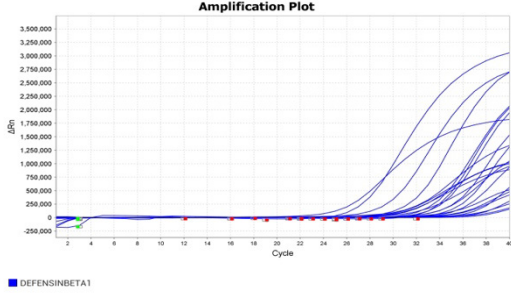
Atopik dermatit oluşturulan, Plazma tedavisi yapılan ve kontrol grubu ratlarda LL-37(CAMP), AHR, Defensin-1, Defensin-2, PPAR α ve GAPDH genlerinin ekspresyon değişimleri sırasıyla Şekil 8, 9, 10, 11, 12, 13' de verildi.



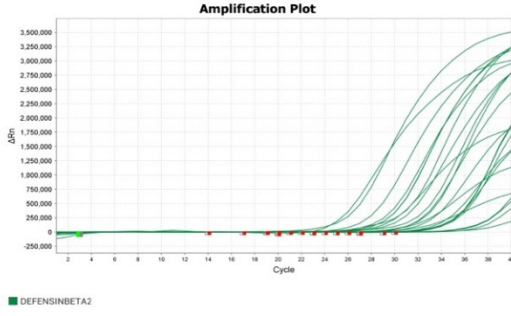
Şekil 8. LL-37 (KAMP) geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).



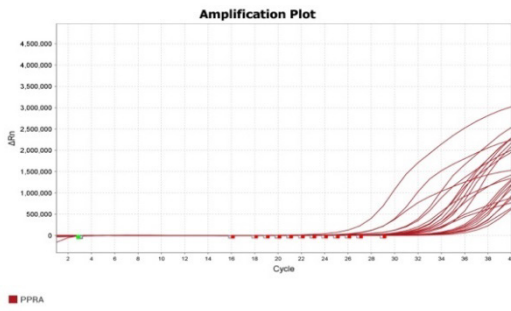
Şekil 9. AHR geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).



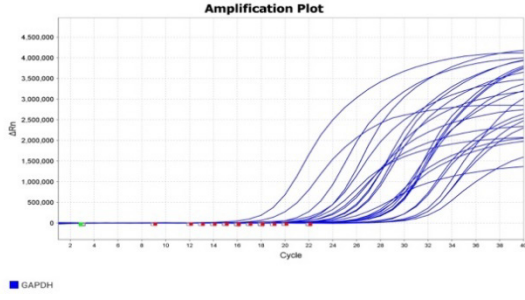
Şekil 10. Defensin 1 geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).



Şekil 11. Defensin2 geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).



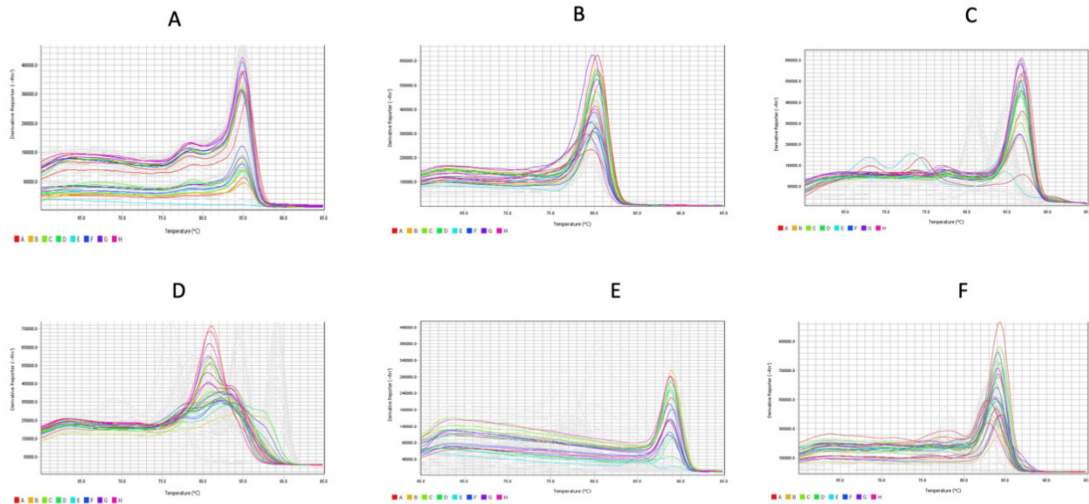
Şekil 12. PPAR α geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).



Şekil 13. GAPDH geninin gruplarda kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (Yatay ekseninde Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal bulunmaktadır).

Melting Point Analizleri

Yapılan qRT-PCR analizlerinde hedeflenen gen bölgelerinin her örnekte aynı gen bölgesinden çoğaltılıp çoğaltılmadıkları, primer dimerlerinin oluşup oluşmadığı ve Ct değerlerinin hedeflenen bölgeye ait olup olmadıklarının anlaşılabilmesi amacıyla melting point analizi yapıldı ve sonuçları Şekil 14’te sunuldu.



Şekil 14. Real time PCR analizinde mRNA ekspresyonlarının saflığının belirlenmesinde kullanılan melting point (T_m)grafikleri. A: LL-37 (CAMP) geni; B: AHR geni; C: Defensin-1 geni; D: Defensin-2 geni; E: PPAR α geni; F: GAPDH geni (referans gen).

Melting point analizinde elde edilen görüntüler sayesinde piklerin aynı yerlerde olduğu belirlendi. Böylece hedeflenen gen bölgelerinin çoğaltıldığı ve primer dimeri oluşmadığı ortaya konmuş oldu. Pik seviyelerindeki farklılıklar ise gruplardaki hayvanların ekspresyon düzeylerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Bu grafiklerden de kullanılan primerlerle genler çoğaltılabilmiş ve herhangi bir girişim şekillenmediği anlaşıldı. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler ışığında Ct değerlerinin ekspresyon düzeylerinin hesaplanmasında güvenilir oldukları gösterildi.



5.TARTIŞMA

Bu çalışma, hem insanlarda hem de hayvanlarda belli bir dönemi kapsamaksızın çok yaygın ve çözümsüz bir deri hastalığı olan AD'de, son yıllarda birçok deri hastalığı, yara tedavisi ve komplike enfeksiyonlarda kullanılmaya başlanan soğuk atmosferik plazmadan yararlanarak hastalığın patogeneğinde rol oynayan çeşitli moleküler biyobelirteçlerin düzeylerinin belirlenmesine ve tedavi sürecinin moleküler düzeyde nasıl etkisi olduğunu anlamaya odaklanmaktadır.

Atopik dermatit, kaşıntıyla karakterize tekrarlayan, kronik, enfeksiyöz olmayan inflamatuvar bir dermatozdur. Klinik tablo, hastanın yaşına ve çeşitli cilt kuruluk derecelerine bağlı olarak eritem, papüller, belirli bir yerde eksüdatif lezyonlar gibi egzama benzeri döküntüleri ve çeşitli cilt kuruluk derecelerini içerir. Hastalığın uzun vadeli seyri nedeniyle kronik veya tekrarlayan iltihaplanma, kaşıntı, cilt kalınlaşmasına ve likenifikasyona neden olur. Patofizyolojisi karmaşık ve çok faktörlü olan AD'de genetik bozukluklar, epidermal bariyerdeki bir kusur, değişmiş bir bağışıklık tepkisi ve derinin mikrobiyal dengesinin bozulması bulunur. Genetik düzeydeki sayısız karmaşık değişiklik ile doğuştan ve adaptif bağışıklık, AD'nin çeşitli fenotiplerini ve endotiplerini karakterize etmenin temelini oluşturur. Hastalığın tedavisinde kullanılan yöntemlerin çoğu patogeneşte rol oynayan belirli moleküllerin etkisine dayandırılır (Sroka-Tomaszewska ve Trzeciak, 2021).

Plazma, katılar, sıvılar ve gazlardan farklı özellikler gösteren maddenin dördüncü halidir. Gaz, radyo frekansı, mikrodalga frekansları, yüksek voltajlı alternatif akım veya doğru akım (DC) ile iyonize edildiğinde üretilebilir. Plazmanın elektron sıcaklığına (Te) göre, yüksek sıcaklık plazması (109 K'ye kadar) ve düşük sıcaklık plazması (≤ 104 K) olarak ayrılabilir. Düşük sıcaklık plazması kısmen iyonize bir durumdadır (iyonizasyon derecesi 10^{-7} ~ 10^{-4}), bu nedenle kısmen iyonize plazma olarak adlandırılabilir ve elektron sıcaklığı nispeten düşüktür (Bai ve diğerleri, 2023). Son yıllarda, plazma biyoloji ve tıp alanında büyük ilgi görmüştür. Plazmanın insan dokularıyla daha iyi ve daha doğrudan temas kurmasını ve bir dizi biyomedikal etki üretmesini sağlamak için, ortaya çıkan SAP teknolojisi hızla gelişmiş ve böylece yeni bir disiplinlerarası alan olan “plazma tıbbi” türetilmiştir (Bai ve diğerleri, 2023).

Plazma, çeşitli tıbbi alanlarda uygulanma potansiyeli olan bir teknoloji olarak, doku çıkarma, yakma veya tıbbi aletlerin sterilizasyonunda kullanılmıştır. Özellikle, SAP olarak da bilinen termal olmayan atmosferik plazma, insan vücuduyla doğrudan temas etme olasılığı nedeniyle ilgi görmektedir. Bu bağlamda, SAP, herhangi bir özel ekstra soğutma olmaksızın

düşük sıcaklıklarda ısıya duyarlı hedefleme uygulamalarına izin verir. Yukarıda belirtildiği gibi, SAP, geçici elektrik alanları veya UV radyasyonu ile kombinasyon halinde reaktif oksijen türleri veya azot oksijen türleri de dahil olmak üzere serbest radikallerin üretilmesi yoluyla dezenfekte edici ve ağartıcı olarak farklı tıbbi amaçlara hizmet eder. Son çalışmalar, SAP'nin iltihabı ve oksidatif stresi azaltarak yara iyileşme sürecini desteklediğini güncellemiştir. Anjiyogenezi teşvik etme, proliferasyonu, doku oksijenasyonunu ve keratinositler ile fibroblastların göçünü teşvik etmedeki potansiyel rolleri de belgelenmiştir (Kim ve diğerleri, 2021).

SAP, çok sayıda reaktif molekül, elektrik alanı, ultraviyole (UV) radyasyonu ve ısı eşliğinde uyarılmış türler yayması nedeniyle dermatoloji tedavisinin uygulanmasında büyük bir potansiyele ve geniş beklentilere sahiptir (Bai ve diğerleri, 2023).

Atopik dermatit tedavisinde SAP'nin potansiyelini ve AD patogenezindeki biyobelirteçleri klinik öncesi aşamada incelemek için uygun bir hayvan modeli gerekmektedir. Ratlarda oluşturulacak bir AD modelinde AD benzeri semptomların tutarlı bir şekilde ortaya çıkması, AD hastalığı patogenezinin incelenmesi için faydalıdır. Bu çalışmada tercih ettiğimiz neonatal kapsaisin uygulanmasıyla elde edilen AD modeli, DNCB tedavi modeli ve epikutanöz duyarlılık modeli gibi diğer AD modellerden daha basit bir prosedüre dayanır. Prosedürün prensibi, yenidoğan ratlara 12 ila 48 saat arasında boyunlarının orta hattından deri altı yolla kapsaisin solüsyonunu (10 µL/g) enjekte edilmesi ve uygulamadan 6 hafta sonra ratlarda AD benzeri lezyonların görülmesi şeklindedir. Kapsaisin solüsyonu 5 mg/mL kapsaisin olacak şekilde, 15 mL konik tüpte 1 mL Tween 80 ve 1 mL %100 etanole 50 mg kapsaisin ilave edilmesi ve 8 mL fizyolojik tuzlu su eklenmesiyle elde edilir. İyice çalkalanarak katmanlar oluşmayacak hale getirilir.

Bu çalışmada yeni doğan ratların kapsaisin enjeksiyonu nedeniyle solunum durmasını önlemek adına uygulama oksijen kabininde ve yenidoğan ratların solunumunu uyarıcı masajla beraber yapıldı ve ratların solunumlarının tamamen normal olduğuna ve baskılanmadığına emin olunana kadar ratlar oksijen kabininde tutuldu. Genel anestezi uygulaması solunum depresyonunu tetikleyebileceğinden enjeksiyonlar herhangi bir anestezi uygulaması olmadan gerçekleştirildi. Bu modelde kritik nokta, enjeksiyonun tam olarak ratların doğumundan sonraki 12-48 saat aralığında uygulanmasıdır. Birkaç günden fazla gecikilirse, dermatit gelişmeyebilir ya da enjeksiyon çok erken yapılırsa, şiddetli ağrı nedeniyle şiddetli solunum depresyonu riski artar (Han ve diğerleri, 2017). Çalışmamızda kapsaisin uygulamalarından 7

hafta sonrasında lezyonlar belirgin olarak görülmeye başlandı ve sonrasında gruplara ayırıp SAP uygulanacak grubun uygulamalarını tamamladı. Tüm hayvanlara lezyonlu bölgelere 1 hafta boyunca gün aşırı SAP uygulaması gerçekleştirildi. Uygulamalar tamamlandıktan sonra kan ve doku örnekleri alındı.

SAP grubundaki uygulamalar sırasında her bir rat için her uygulama öncesinde Dermatit Şiddet Skoru (DSS) belirlenmiştir. AD'nin şiddeti, eritem/kanama, ödem, pullanma/kuruluk ve ekzoriyasyon/erozyon derecesinden oluşan DSS üç bağımsız araştırmacı tarafından değerlendirildi. Analiz için ortalama toplam DSS puanları kullanıldı. Kontrol grubundaki (AD olmayan) grupta DSS, 0 plazma tedavisi olmadan AD oluşturulan yapıldığı AD grubunda 6,87 ve soğuk atmosferik plazma ile atopik dermatitin tedavi edildiği (SAP) grubunda ise 4,83 olarak bulunan ortalama DSS skorlarının SAP grubunda azaldığı görüldü. Bu sonuca bağlı olarak SAP tedavisinin AD şiddetini azaltmada olumlu etkisi olduğu belirlendi.

Buna ek olarak alınan doku örneklerinde yapılan histopatolojik incelemelerde üç grupta da keratin artışı, epitelde spongiöz dejenerasyon, kıl folliküllerinde atrofi, retelerde derinleşme ve eozinofil lökosit skorları analiz edildi. AD grubunda bahsedilen parametrelerde artış meydana gelirken, SAP grubunda bu parametrelerde kontrol grubuna yakın bulgular elde edilmiş ve SAP'nın AD'teki olumlu etkisi histopatolojik olarak da ortaya konmuş oldu.

Atopik dermatitin patogenezinde IgE, IL-13 ve IL-4 de önemli ölçüde rol oynamaktadır.

AD genellikle Th2 aracılı bir hastalık olarak kabul edilir. AD patogenezinin "dışarıdan içeriye" teorisine uygun olarak, değişmiş bir epidermal bariyer bağlamında antijenler, epidermal Langerhans hücreleri ve inflamatuvar epidermal dendritik hücreler gibi epidermal antijen sunum hücreleriyle (APC'ler) karşılaşır ve bu da olgunlaşmalarına ve Th-2 hücre aracılı inflamasyona yol açar. APC'ler ayrıca, AD'ye yol açan patojenik mekanizmaların bir parçası olarak IgE aracılı duyarlılıkları indükleyen IgE için trimetik yüksek afiniteli reseptörler taşır. Epidermal bariyer disfonksiyonunun şiddetlenmesi; B hücrelerinde IgE antikor üretimini düzenler, duyuşal nöronlar üzerinde doğrudan etki ederek kaşıntıyı teşvik eder. IL-4 ve IL-13'ün B hücrelerinde IgE antikor üretimini düzenlemenin dışında, kaşıntıyı teşvik etmek için doğrudan kaşıntı duyuşal nöronlar üzerinde etki ettiği bildirilmiştir. Akut fazda, Th2 lenfositleri, keratinositlerde FLG seviyelerini aşağı düzenleyen ve epidermal bariyer

disfonksiyonunu şiddetlendiren IL-4 ve IL-13 gibi tip-2 sitokinlerin salgılanmasıyla güçlü inflamatuvar yanıtlar oluşturur (Fania ve diğerleri, 2022).

Bu çalışma sonucu aldığımız kan örneklerinden yaptığımız Elisa testleri sonucunda AD grubu ratların ortalama IgE düzeyleri kontrol ve SAP grubundan yüksek olarak belirlendi. IL-13 düzeyi AD grubundaki ratlarda SAP tedavisi uygulanan gruptan istatistiki olarak anlamlı ($P=0,029$) düzeyde yüksek olarak saptanırken IL-4 düzeyi en yüksek AD grubunda saptandı, tedavi grubunda ise IL-4 düzeyinin düşüş eğilimine geçtiği gözlemlendi. Han ve diğerlerinin (2017) yaptığı çalışmada da kaspaisinle oluşturulmuş AD modelinde IL-4 ve IL-13 mRNA ekspresyonlarının yaptığımız çalışmadakine benzer şekilde artışa geçtiği görülmektedir. Çalışma bulgularımızdaki IL-4 ve IL-13 teki düşüş eğiliminin, SAP uygulamasıyla beraber düzelme gösteren epidermal bariyer ve buna bağlı olarak epidermal bariyer geçirgenliğinin azalmasıyla giriş yapan antijenlerin ekarte edilmesi ile IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin salgılanmasının azalmasından kaynaklı olabileceği ve bu doğrultuda da IgE üretiminin de önüne geçilmiş olabileceği düşünülmektedir.

AD patogenezinde antimikrobiyel peptidlerden Defensin 1, Defensin-2 ve katelisidin (LL-37) ile reseptörlerden Aril Hidrokarbon reseptörü (AHR) ve lipidlerin oksidasyonundan sorumlu genleri kontrol eden Peroksizom Proliferatör ile Aktive olan reseptörlerden (PPAR) PPAR α 'nın ekspresyon düzeyleri de önemli rol oynayan faktörlerdendir. Bir dizi endojen antimikrobiyal peptidin doğuştan gelen bağışıklıkta ayrılmaz bir rol oynadığı gösterilmiştir. Memeli derisindeki iki ana peptid sınıfı, β -Defensinler ve katelisidinler, bakteriyel, fungal ve viral patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Deride keratinositler tarafından üretilir. İnsan β -Defensin 1 (HBD-1) gibi bu peptidlerden bazılarının ekspresyonu yapısaldır, oysa insan β -Defensin 2 (HBD-2) ve bir katelisidin olan LL-37 dahil olmak üzere diğerlerinin ekspresyonu, cildin yaralanması veya iltihaplanmasıyla tetiklenir. Hayvan modelleri, antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunun veya aktivasyonunun, cildin bakteriyel enfeksiyona direnme yeteneği için gerekli olduğunu göstermiştir (Ong ve diğerleri, 2002).

AD'li hastalardan alınan iltihaplı deri lezyonlarının, sedef hastalarının deri lezyonlarına göre anlamlı derecede daha düşük Defensin-2 ve katelisidin (LL-37) konsantrasyonlarına sahip olduğu görülmüştür. AD'li ciltte bol miktarda bulunan IL-4 ve IL-13'ün inhibitör etkileri bu bulgudan sorumlu olabilir. Ayrıca, AD'li hastalarda düşük HBD-2 ve LL-37 konsantrasyonları *S. aureus*'u öldürememiştir. Bu nedenle, enflamasyonla indüklenen

antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonundaki bir eksiklik, AD'li hastaların deri enfeksiyonlarına duyarlılığını açıklayabilir (Ong ve diğerleri, 2002).

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgularda LL-37 ve Defensin-1 ekspresyon seviyelerinde istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık belirlenmedi. Defensin-1 ekspresyonu AD ve SAP grubunda kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlemlendi. LL-37 ekspresyon düzeylerinin ise SAP tedavi grubunda düşüşe geçtiği belirlendi. AD gibi inflamatuvar deri hastalıklarında LL-37 cilt bariyerinin düzelmesi ve mikroorganizmalara karşı savunmada önemli görevlere sahiptir. Bu çalışmada SAP tedavisi AD'li deride yangıyı hafifletici etkiler göstermiştir. Bu etki hem makroskobik, hem histopatolojik hemde IgE, IL-13 ve IL-4 düzeylerinden ortaya çıkmıştır. SAP tedavi grubunda LL-37 ekspresyonunda ortaya çıkan düşüşün nedeninin de SAP tedavisiyle yangısal sürecin azalması ve derideki bakteriyel yükün azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünüldü.

Defensinler vücudun doğal bağışıklık yanıtının önemli bir parçasıdır ve AD'de Defensin-2 önemli bir antimikrobiyal peptid olarak rol oynar. AD'li bireylerde cilt bariyerinin bozulması ve inflamatorik yanıtın artması nedeniyle Defensin-2 ve diğer AMP'lerin ekspresyonlarında değişiklikler görülür. Buda derinin enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmesine ve patojenik bakterilerin aşırı artışına neden olabilir (Ong ve ark, 2002). Yaptığımız çalışmada da AD grubu Defensin-2 ekspresyonunun kontrol grubundan önemli düzeyde düşük olduğu ancak SAP tedavisi ile düzeyin tekrar yükseldiği belirlendi. SAP tedavisi Defensin-2 ekspresyonunu yukarı yönde düzende düzenleyerek AD sürecinde eksikliği ortaya çıkan bu antimikrobiyal peptidin düzeyinin artışına neden olarak iyileşmeye yardımcı olabileceği kanısına varıldı. Bu sonucun hastalığın tedavisini yürütürken antimikrobiyal peptidleri hedefleyen tedavi stratejileri arasına SAP uygulamalarının da eklenebileceği düşüncesini ortaya koydu.

Çevresel toksinler, dioksinler, poliklorlu bifeniller gibi kimyasal maddelere yanıt veren AHR, bu kimyasalların algılanmasına ve bunlara karşı tepki verilmesine olanak sağlar. Bağışıklık sistemi, hücresel gelişim ve homeostaz gibi süreçlerde de rol oynayan AHR, immun yanıtların düzenlenmesinde de görev alır. Aynı zamanda hücre büyümesi ve farklılaşmasında görev alan AHR'nin, bazı kanser türlerinde ekspresyonunun arttığı ve bununda kanser gelişimine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Mingazhi ve diğerleri, 2021). AHR, cilt bariyer fonksiyonunun korunmasına katkıda bulunan fillagrin ve lorikrin gibi cilt bariyer proteinlerinin üretimini artırır. Bu proteinler bariyeri güçlendirerek nem kaybını önler. AD'li

hastalarda AHR ekspresyonundaki azalma cilt bariyerinin bozulması nem kaybına ve derinin daha kuru ve hassas olmasına neden olabilir. AD hastalarının cildinde ksenobiyotik metabolizmanın tetiklenmesiyle tutarlı olarak, AD derisinde indüklenen birkaç anahtar genden birisi de AHR hedef genleridir. Atopik cilt, bozulmuş bir bariyer işlevi, iltihaplanma ve disbiyoz ile karakterizedir. AHR keratinositler, fibroblastlar gibi deri bariyerinin önemli bileşenleri tarafından ifade edilmektedir ve yaptığımız çalışmada da AD grubunda keratinositler vb. hücreler zarar gördüğü için AHR aşağı regüle edilmiş ve ekspresyonunda azalım göstermiştir. AD'li grupta gözlenen AHR ekspresyonundaki azalma hem derinin bariyerinin bozulmasına hem de Th2 hücre odaklı bağışıklık yanıtının değişmesine ve buna bağlı olarak inflamasyonun artmasına neden olabilir. Dolayısıyla AHR aktivasyonunun artışı ve bunu hedefleyen tedaviler AD semptomlarının azalmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmada da SAP tedavisi uygulanan grupta kontrol grubundaki ekspresyon seviyesine doğru artış göstermesi, SAP' ın deri bariyerini onarırken keratinositleri de düzenlemesi ve buna bağlı olarak AHR seviyelerinin normale yaklaşmasını sağlamış olabilir. AD'de AHR için yapılmış olan çeşitli immünohistolojik ve q-Real time PCR çalışmaları bulunmaktadır. Hong ve diğerleri (2016), sağlıklı deri ile karşılaştırıldığında AD'li, deride AHR artmış ekspresyonunu göstermiştir. Ancak, Kim ve diğerleri (2021), lezyonlu AD derisinde AHR ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Yu ve diğerleri (2019) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, Th2'den sapmış ortamın cilt mikrobiyotası endojen AHR ligandının üretimini azaltma olasılığını göstermiştir. Bu bulgular toplu olarak, çoğu AD'de AHR ligantlarının yoksun olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla AHR ekspresyonunun azaldığını; bunu uyaran durumların AHR/ARNT/FLG eksenini uygun şekilde aktive ederek AD tedavisinde faydalı olabileceğini söylenebilir (Frue ve diğerleri, 2019). AD'de AHR nin rolü düşünüldüğünde ve bu çalışma sonucunda elde edilen bulgulardan yola çıkarak SAP uygulamaların cilt bariyerini düzelttiği ve AHR ekspresyonunu olumlu etkilediği ve AD'nin semptomlarının iyileştirilmesine katkıda bulunacağı söylenebilir.

Peroksisom proliferatör-aktifleştirilmiş reseptörler (PPAR'lar), nükleer reseptör süper ailesine ait olan üç ligand-indüklenbilir transkripsiyon faktörünün üyeleridir. PPAR'lar, glikoz ve lipidin metabolik homeostazisi, adipogenez ve inflamasyonla ilgili çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar (Minzaghi ve diğerleri, 2019). Bu çalışmada PPAR- α ekspresyon düzeyi SAP tedavisi uygulanan grupta AD grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur. PPAR- α lipid metabolizmasını ve inflamasyonu düzenleyen bir nükleer reseptördür ve cildin bariyer fonksiyonunda önemli görevi vardır. Bu çalışmada

Kontrol ve AD grubu karşılaştırıldığında istatistiki önemde bir fark belirlenememişken, SAP uygulamalarının PPAR- α düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Daha önce yapılmış çalışmalarda PPAR α ekspresyonu azalmasının keratinositlerde ve bağışıklık hücrelerinde çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonlarını teşvik edici etkisi olduğu ve T hücre genişlemesini bozarak proinflamatuvar olduğu gösterilmiştir (Mingazhi ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, SAP tedavisi uygulanan grupta ortaya çıkan PPAR- α aşağı düzenlemesi, KC'lere etki eden hasardan kaynaklanabilir, ancak daha sonra KC proliferasyonunu ve epidermal bariyer iyileşmesinde rol oynayan inflamatuvar mediyatörlerin salınımını destekleyerek doku rejenerasyonunu teşvik edebilir. Bu çalışmada ortaya çıkan SAP tedavisi ile ekspresyon azalması uygulanan tedavinin hastalığın seyrini düzeltilmesinde destek olabileceği düşüncesini ortaya koymuştur.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Soğuk atmosferik plazma tedavi uygulamalarının çeşitli deri hastalıkları ve AD'de kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu tedavi uygulamalarının, AD'in patogenezinde geçerli çeşitli moleküler mekanizmalar üzerinden değerlendirildiği çalışmalara çok fazla rastlanmamaktadır. Bu kapsamda hem insan hem veteriner hekimliğinde sık rastlanılan kronik bir deri problemi olan AD nin tedavisinde SAP uygulamaları kullanılması ve tedavi etkinliğinin AD'nin patogenezinde görevli çeşitli belirteçler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre SAP tedavisi, deneysel oluşturulan AD modelinde ratlarda IgE, IL-13 ve IL-4 düzeylerinde değişikliğe neden oldu. Aynı zamanda düzelme hem makroskobik, hem de mikroskobik olarak doğrulandı. Bu bağlamda seçilen deneysel model çalışmanın amacına uygun şekilde kullanılmış oldu. SAP tedavisinin ardından hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak iyileşmenin gösterilmiş olması SAP uygulanmasının AD tedavisinde etkinliğini ortaya koydu.

Deneysel AD oluşturulan deneme, SAP tedavi ve kontrol gruplarında deri örneklerinde yapılan mRNA izolasyonu ve arkasından gerçekleştirilen qRtPCR çalışmaları sonucunda önemli antimikrobiyel peptidlerden Defensin-1, Defensin-2 ve katelisidin (CAMP, LL-37); reseptörlerden Aril hidrokarbon reseptörü ve lipid oksidasyonundan sorumlu genleri kontrol eden Peroksizom proliferatif aktive edici faktör (PPAR α)'nın ekspresyon düzeylerine bakıldı. AD patogenezinde önemli rol oynayan bu genlerin SAP tedavisiyle değişimlerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmadı. Dolayısıyla bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgulara göre plazma tedavisinin moleküler düzeyde etkileri olduğu gözlemlendi. Bu kapsamda SAP uygulamasının antimikrobiyel peptidlerin ekspresyonlarında görülen değişikliklere neden olarak AD tedavisine yardımcı olabileceği öngörüldü. AHR ekspresyon düzeylerinin AD modellerinde arttığını ve azaldığını bildiren çalışmalar bulunsa da bizim çalışmamızda AD grubunda yükseldiği ve tedaviyle ekspresyonun azaldığı gözlemlendi. SAP tedavisinin deri bariyeri ve keratonisitler üzerinde iyileştirici etkisinin AHR ekspresyonunda da gözlemlendiği şeklinde yorumlandı. PPAR- α ekspresyonunda AD grubunda artan ekspresyonun SAP grubunda tekrar azaldığı ve normal düzeye geldiği belirlendi. AD etkisiyle lipid peroksidasyonundan sorumlu bir gen olan PPAR- α , diğer çalışmalardakinin aksine azalma göstermedi. Önce istatistiki önemde olmayan bir artış sonrasında anlamlı bir azalma gösterdi

ki bu azalmanın düzeyi de kontrol grubu ile farklı değildi. Dolayısıyla bu gen ekspresyonu üzerinde SAP'ın etkisiyle ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması kanısına varıldı.

Hem insan hem de veteriner hekimliğinde dermatolojik olarak sık rastlanılan problemlerden bir olan AD kronik ve rahatsızlık veren patolojik bir durumdur. AD tedavisinde sürecin yönetilmesi ve hasta konforu ön plandadır. İnvaziv olmayan, zararlı etkileri görülmeyen, uygulaması kolay ve yeni gelişmiş bir teknoloji olan SAP tedavileri giderek artan bir ilgiyle kullanılmaktadır. Ayrıca bu konuyla ilgili çalışmalar da hızla sürmektedir. Dolayısıyla bu çalışma hem tedavinin etkinliğinin gösterilmesi hem moleküler düzeyde AD patogeneziyle ilgili genleri ekspresyonlarına odaklanması yönleriyle hem bilimsel anlamda yapılacak çalışmalara referans olma değerinde hem de klinik uygulamalarda destek tedavisi olarak önerilme potansiyelindedir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, B. (2013). Derinin doğal bağışıklık sistemi. *Türkderm-Türk Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*; 47: Özel Sayı 1: 2-11 doi: 10.4274/turkderm.47.s1
- Asano, S., Ichikawa, Y., Kumagai, T., Kawashima, M., Imokawa, G. (2008). Microanalysis of an antimicrobial peptide, beta-defensin-2, in the stratum corneum from patients with atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 159(1), 97–104. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08613.x
- Bai, F., Ran, Y., Zhai, S., Xia, Y. (2023). Cold Atmospheric Plasma: A Promising and Safe Therapeutic Strategy for Atopic Dermatitis. *International Archives Of Allergy and Immunology*, 184(12), 1184–1197. doi:10.1159/000531967
- Barılı, Ö. Pekmezci, D. (2018). Köpek Atopik Dermatitisinde Teşhis ve Alerjen Tayinindeki Güncel Yaklaşımlar. *Journal of Health Sciences*, 27: 176-181
- Batista, D. I., Perez, L., Orfali, R. L., Zaniboni, M. C., Samorano, L. P., Pereira, N. V., Sotto, M. N., Ishizaki, A. S., Oliveira, L. M., Sato, M. N., Aoki, V. (2015). Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(6), 1091–1095. doi:10.1111/jdv.12753
- Bernhardt, T. Semmler, M. L. Schäfer, M. Bekeschus, S. Emmert, S. Boeckmann, L. (2019). Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3:2019:3873928 doi: 10.1155/2019/3873928.
- Boeckmann, L., Bernhardt, T., Schäfer, M., Semmler, M. L., Kordt, M., Waldner, A. C., Wendt, F., Sagwal, S., Bekeschus, S., Berner, J., Kwiatak, E., Frey, A., Fischer, T., & Emmert, S. (2020). Aktuelle Indikationen der Plasmatherapie in der Dermatologie [Current indications for plasma therapy in dermatology]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 71(2), 109–113. doi:10.1007/s00105-019-04530-0

Buzoğlu, H. (2020) Cilt Bariyer Sistemi ve Cilt Bakımı, Dermatoloji, Medikal Estetik ve Lazer, www.hakanbuzoglu.com.tr/yuz-cilt-bakimi/202-dermatoloji/kozmetik-danismanlik-unitesi/1545-deri-bariyer-sistemi adresinden erişildi.

Chermprapai, S., Broere, F., Gooris, G., Schlotter, Y. M., Rutten, V. P. M. G., Bouwstra, J. A., (2017). Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochimica et Biophysica acta. Biomembranes*, 1860(2), 526–533. doi:10.1016/j.bbamem.2017.11.013

Chieosilapatham, P., Ogawa, H., Niyonsaba, F. (2017). Current insights into the role of human β -defensins in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 190(2), 155–166. doi:10.1111/cei.13013

Clausen, M. L., Jungersted, J. M., Andersen, P. S., Slotved, H. C., Krogfelt, K. A., Agner, T. (2013). Human β -defensin-2 as a marker for disease severity and skin barrier properties in atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 169(3), 587–593. doi:10.1111/bjd.12419

Criado, P. R., Miot, H. A., Bueno-Filho, R., Ianhez, M., Criado, R. F. J., de Castro, C. C. S. (2024). Update on the pathogenesis of atopic dermatitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 99(6), 895–915. doi:10.1016/j.abd.2024.06.001

Eckert, R.L., Crish, J.F., Efimova, T., Dashti, S.R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R., Balasubramanian, S. (2004). Regulation of Involucrin Gene Expression. *The Journal of Investigative Dermatology* vol. 123,1 (2004): 13-22. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22723.x

Elentner, A., Schmuth, M., Yannoutsos, N., Eichmann, T. O., Gruber, R., Radner, F. P. W., Hermann, M., Del Frari, B., Dubrac, S. (2018). Epidermal Overexpression of Xenobiotic Receptor PXR Impairs the Epidermal Barrier and Triggers Th2 Immune Response. *The Journal of Investigative Dermatology*, 138(1), 109–120. doi:10.1016/j.jid.2017.07.846

Emmert, S., van Welzen, A., Masur, K., Gerling, T., Bekeschus, S., Eschenburg, C., Wahl, P., Bernhardt, T., Schäfer, M., Semmler, M. L., Grabow, N., Fischer, T., Thiem, A., Jung, O., Boeckmann, L. (2020). Kaltes Atmosphärendruckplasma zur Behandlung akuter und chronischer Wunden [Cold atmospheric pressure plasma for the treatment of acute and

chronic wounds]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 71(11), 855–862. doi:10.1007/s00105-020-04696-y

Ertam, İ., Su, Ö., Alper, S., Sarıcaoğlu, H., Karadağ, A.S., Odyakmaz Demirsoy, E., Borlu, M. (2018). Diagnosis and management of atopic dermatitis. *Turkderm-Turk Arch Dermatol Venereology* 2018; 52:6-23 doi: 10.4274/turkderm.87143

Fania, L.; Moretta, G.; Antonelli, F.; Scala, E.; Abeni, D.; Albanesi, C.; Madonna, S. (2022) Multiple Roles for Cytokines in Atopic Dermatitis: From Pathogenic Mediators to Endotype-Specific Biomarkers to Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23,5 2684. 28 Feb. 2022, doi:10.3390/ijms23052684

Franco, J., Ferreira, C., Sobreira, T.J.P., Sundberg, J.P., Hogenesch, H., (2018). Profiling of epidermal lipids in a mouse model of dermatitis: Identification of potential biomarkers, *PLoS ONE* Nisan 26, 2018 13,4 doi:10.1371/journal.pone.0196595

Fridman, G., Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Ayan, H., Fridman, A., Gutsol, A., Brooks, A. (2006). Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* vol. 26, sf. 425 doi:10.1109/plasma.2006.1707305

Furie M. (2020). Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5382. doi:10.3390/ijms21155382

Furie, M., Hashimoto-Hachiya, A., Tsuji, G. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20,21 5424. 31 Ekim 2019, doi:10.3390/ijms20215424

Furie, M., Hashimoto-Hachiya, A., Tsuji, G. (2018). Antioxidative Phytochemicals Accelerate Epidermal Terminal Differentiation via the AHR-OVOL1 Pathway: Implications for Atopic Dermatitis. *Acta Dermato-venereologica*, 98(10), 918–923. doi:10.2340/00015555-3003

Gan, L., Jiang, J., Duan, J. W., Wu, X. J. Z., Zhang, S., Duan, X. R., Song, J. Q., Chen, H. X. (2021). Cold atmospheric plasma applications in dermatology: A systematic review. *Journal of Biophotonics*, 14(3), e202000415. doi:10.1002/jbio.202000415

Han, R. T., Back, S. K., Lee, J., Kim, H. y., Kim, H. J., Na, H. S. (2017) Effects of Exposure of Formaldehyde to a Rat Model of Atopic Dermatitis Induced by Neonatal Capsaicin Treatment. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* ,127 55987. doi:10.3791/55987

Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J. L., Shimizu, T., & Karrer, S. (2010). Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 8(12), 968–976. doi:10.1111/j.1610-0387.2010.07495.x

Hong, C. H., Lee, C. H., Yu, H. S., Huang, S. K. (2016). Benzopyrene, a major polyaromatic hydrocarbon in smoke fume, mobilizes Langerhans cells and polarizes Th2/17 responses in epicutaneous protein sensitization through the aryl hydrocarbon receptor. *International Immunopharmacology*, 36, 111–117. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.017

Izadjoo, M., Zack, S., Kim, H., Skiba, J. (2018). Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the science. *Journal of Wound Care*, 27(Sup9), S4–S10. doi:10.12968/jowc.2018.27.Sup9.S4

Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B., Agner, T., Weidinger, S. (2010). Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*, 65(7), 911–918. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x

Kalghatgi, S., Kelly, C. M., Cerchar, E., Torabi, B., Alekseev, O., Fridman, A., Friedman, G., Azizkhan-Clifford, J. (2011). Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*, 6(1), e16270. doi:10.1371/journal.pone.0016270

Khalaf, A. T., Abdalla, A. N., Ren, K., Liu, X. (2024). Cold atmospheric plasma (CAP): a revolutionary approach in dermatology and skincare. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 487. doi:10.1186/s40001-024-02088-9

Kim, H. O., Kim, J. H., Chung, B. Y., Choi, M. G., Park, C. W. (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology*, 23(4), 278–281. doi:10.1111/exd.12350

Kim, Y. J., Lim, D. J., Lee, M. Y., Lee, W. J., Chang, S. E., Won, C. H. (2021). Prospective, comparative clinical pilot study of cold atmospheric plasma device in the treatment of atopic dermatitis. *Scientific Reports*, 11(1), 14461. doi:10.1038/s41598-021-93941-y

Koh, L. F., Ong, R. Y., Common, J. E. (2022). Skin microbiome of atopic dermatitis. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 71(1), 31–39. doi:10.1016/j.alit.2021.11.001

Kong, M.G., Kroesen, G., Morfill, G., Nosenko, T., Shimizu, T., Van Dijk, J., Zimmermann, J.L. (2009) Plasma medicine: an introductory review, *New Journal of Physics (NJP)*. 11, 115012 doi:10.1088/1367-2630/11/11/115012

Kopfnagel, V., Harder, J., Werfel, T. (2013). Expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and possible immunoregulatory functions. *Current Opinion in Allergy And Clinical Immunology*, 13(5), 531–536. doi:10.1097/ACI.0b013e328364ddfd

Korbecki, J., Bobiński, R., Dutka, M. (2019). Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflammation Research: Official Journal of The European Histamine Research Society* 443-458. doi:10.1007/s00011-019-01231-1

Leung, D. Y., ve Guttman-Yassky, E. (2014). Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), 769–779. doi:10.1016/j.jaci.2014.08.008

Metelmann, H.R, Adamovich, I., Baalrud, S.D., Bogaerts, A., Bruggeman, P.J., Cappelli, M., Colombo, V., Czarnetzki, U., Ebert, U., Eden, J.G., Favia, P., Graves, D.B., Hamaguchi, S., Hieftje, G., Hori, M., Kaganovich, I. D., Kortshagen, U., Kushner, M.J., Mason, N.J., Mazouffre, S., Mededovic Thagard, S., Mizuno, A., Moreau, E., Murphy, A. B., Niemira, B. A., Oehrlein, G. S., Lj Petrovic, Z., Pitchford, L.C., Pu, Y-K, Rauf, S, Sakai, O., Samukawa, S., Starikovskaia, S., Tennyson, J., Terashima, K., Turner, M. M., Van de Sanden, M. C. M., Vardelle, A. (2017). The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 50 323001 (46pp) doi:10.1088/1361-6463/aa76f5

Minzaghi, D., Pavel, P., Dubrac, S. (2019). Xenobiotic Receptors and Their Mates in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4234 doi:10.3390/ijms20174234

Mulla, A. (2020) *Atopik Dermatitli Köpeklerde Derinin Biyofiziksel Parametrelerinin Değerlendirilmesi*, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın

Nuttall, T. J., Marsella, R., Rosenbaum, M. R., Gonzales, A. J., & Fadok, V. A. (2019). Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 254(11), 1291–1300. doi:10.2460/javma.254.11.1291

Oh, M. J., Cho, Y. H., Cha, S. Y., Lee, E. O., Kim, J. W., Kim, S. K., & Park, C. S. (2017). Novel phytoceramides containing fatty acids of diverse chain lengths are better than a single C18-ceramide *N*-stearoyl phytosphingosine to improve the physiological properties of human stratum corneum. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 10, 363–371. doi:10.2147/CCID.S143591

Oladimeji, P. O., ve Chen, T. (2018). PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor. *Molecular Pharmacology*, 93(2), 119–127. doi:10.1124/mol.117.110155

Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L., Leung, D. Y. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 347(15), 1151–1160. doi:10.1056/NEJMoa021481

Pucci, C., Martinelli, C., Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. doi:10.3332/ecancer.2019.961

Rawlings, A. V., ve Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, 17 Suppl 1, 43–48. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x

Schuler, C. F., Billi, A. C., Maverakis, E., Tsoi, L. C., Gudjonsson, J. E. (2023). Novel insights into atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 151(5), 1145–1154. doi:10.1016/j.jaci.2022.10.023

Shirley, S. N., Watson, A. E., Yusuf, N. (2024). Pathogenesis of Inflammation in Skin Disease: From Molecular Mechanisms to Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 10152. doi:10.3390/ijms251810152

Sroka-Tomaszewska, J., Trzeciak, M. (2021). Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4130. doi:10.3390/ijms22084130

Sullivan, M., Silverberg, N. B. (2017). Current and emerging concepts in atopic dermatitis pathogenesis. *Clinics in Dermatology*, 35(4), 349–353. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.03.006

Tanaka, H., Hori, M. (2017). Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 60(1), 29–32. doi:10.3164/jcbtn.16-67

Tanaka, H., Ishikawa, K., Mizuno, M., Toyokuni, S., Kajiyama, H., Kikkawa, F., Metelmann, H.R., Hori, M. (2017). State of the art in medical applications using non-thermal atmospheric pressure plasma. *Reviews of Modern Plasma Physics* volume 1. doi:10.1007/s41614-017-0004-3

Temizel, E. M., Aytug, N. (2010). Köpeklerde Atopik Dermatitisin Tanısında İntradermal Deri Testi ve Alerjen Spesifik Ig E Düzeylerinin Karşılaştırılması. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 29(1), 11-16.

van den Bogaard, E. H., Elias, P. M., Goleva, E., Berdyshev, E., Smits, J. P. H., Danby, S. G., Cork, M. J., & Leung, D. Y. M. (2023). Targeting Skin Barrier Function in Atopic Dermatitis. *The journal of Allergy and Clinical Immunology. In practice*, 11(5), 1335–1346. doi:10.1016/j.jaip.2023.02.005

van Smeden, J., Bouwstra, J. A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology*, 49, 8–26. doi:10.1159/000441540

Volotskova, O., Hawley, T. S., Stepp, M. A., Keidar, M. (2012). Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific Reports*, 2, 636. doi:10.1038/srep00636

Wang, B., Tontonoz, P. (2018). Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(8), 452–463. doi:10.1038/s41574-018-0037-x

Yang, G., Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S., Lee, J. Y. (2020). Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2867. doi:10.3390/ijms21082867

Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A., Eichwald, O. (2014) Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine, *Fundamental and Clinical Pharmacology* vol 28,2, df.123-135. doi: 10.1111/fcp.12018

Yu, J., Luo, Y., Zhu, Z., Zhou, Y., Sun, L., Gao, J., Sun, J., Wang, G., Yao, X., Li, W. (2019). A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), 2108–2119.e12. doi:10.1016/j.jaci.2018.11.036